

**Aus dem Institut für Klinische Chemie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. D. Seidel**

Nukleosomen als Zelltodparameter bei Patienten mit malignen Tumoren

Dissertation

**zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

vorgelegt von

Stefan Holdenrieder
aus Jettingen-Scheppach

2004

II

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. D. Seidel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. C. Nerl

Mitberichtersteller: Priv. Doz. Dr. R. Holle
Prof. Dr. J. P. Johnson

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Frau Dr. Petra Stieber

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2004

Meinen Eltern gewidmet

Vorveröffentlichungen:

Patentanmeldung:

Roche Diagnostics, Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, Busch M, Fertig G, Schalhorn A

Follow-up of therapy in patients in which apoptosis is induced as a result of disease or therapy, by the detection of apoptotic products.

Patentnummer: 4918 / OA / WO - Ts

Originalarbeiten:

Holdenrieder S, Stieber P, Förg T, Kühl M, Schulz L, Busch M, Schalhorn A, Seidel D

Apoptosis in serum of patients with solid tumours

Anticancer Res. 19: 2721-2724 (1999)

Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, Fertig G, Fürst H, Schmeller N, Untch M, Seidel D

Nucleosomes in serum as a marker for cell death

Clin Chem Lab Med 39: 596-605 (2001)

Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, Busch M, Fertig G, Fürst H, Schalhorn A, Schmeller N, Untch M, Seidel D

Nucleosomes in serum of patients with benign and malignant diseases

Int J Cancer (Pred Oncol) 95: 114-120 (2001)

Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, Busch M, v Pawel J, Schalhorn A, Nagel D, Seidel D

Circulating nucleosomes in serum

Ann N Y Acad Sci 945: 93-102 (2001)

Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmüller H, Busch M, Fertig G, Fürst H, Schalhorn A, Schmeller N, Untch M, Seidel D

Quantification of nucleosomes in serum by the Cell Death Detection – ELISA^{plus}

Biochemica 1 (2002): 25-27

Beiträge auf internationalen Kongressen in Form von Abstracts:

- 09/1997 XXV. Meeting of the International Society for
Oncodevelopmental Biology and Medicine, ISOBM,
in Montreux, Schweiz (Poster)
- 12/1997 IX. Hamburg Symposium on Tumor Markers, HSTM,
in Hamburg (Vortrag)
- 06/1998 XXV. Meeting of the International Academy of Tumor Marker Oncology,
IATMO, in Lugano, Schweiz (Vortrag)
- 09/1998 XXVI. Meeting of the International Society for
Oncodevelopmental Biology and Medicine, ISOBM,
in Umea, Schweden (Vortrag)
- 11/1999 XXVII. Meeting of the International Society for
Oncodevelopmental Biology and Medicine, ISOBM,
in Kyoto, Japan (Vortrag)
- 12/1999 X. Hamburg Symposium on Tumor Markers, HSTM,
in Hamburg (Vortrag)
- 09/2000 XXVIII. Meeting of the International Society for
Oncodevelopmental Biology and Medicine, ISOBM,
in München (Vortrag, Poster)
- 02/2001 2nd Symposium on Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum,
CNAPS-2, in Hongkong, China (eingeladener Vortrag)
- 09/2001 XXIX. Meeting of the International Society for
Oncodevelopmental Biology and Medicine, ISOBM,
in Barcelona, Spanien (Vortrag, Poster)
- 01/2002 X. Hamburg Symposium on Tumor Markers, HSTM,
in Hamburg (Vortrag, Poster) **Posterpreis**
- 03/2002 83rd Meeting of the American Association for Cancer Research, AACR,
in San Francisco, USA (Poster)
- 05/2002 Meeting of the Clinical Ligand Assay Society, CLAS,
in Houston, USA (Poster)
- 02/2003 IX. Simposio Internacional sobre Biología y Utilidad Clínica de los
Marcadores Tumorales, in Barcelona, Spanien (Vortrag)
- 02/2003 4th Central European Conference on Human Tumor Markers,
CECHTUMA, in Karlovy Vary, Tschechien (Vortrag)
- 03/2003 Symposium on Tumor Markers: Discovery to Practice,
in Santa Barbara, USA (Poster)

INHALT

1 EINFÜHRUNG UND FRAGESTELLUNG	I
2 HINTERGRUND	4
2.1 ZELLTOD	4
2.1.1 GESCHICHTE DER ZELLTODFORSCHUNG	4
2.1.2 DICHOTOMISCHES ZELLTODMODELL	10
2.1.3 INTEGRIERTES ZELLTODMODELL	17
2.1.4 ZELLTOD BEI PHYSIOLOGISCHEN PROZESSEN	18
2.1.5 ZELLTOD BEI PATHOLOGISCHEN PROZESSEN	21
2.1.6 GENETISCHE REGULIERUNG DES APOPTOTISCHEN ZELLTODS	28
2.1.7 SIGNALWEGE DES APOPTOTISCHEN ZELLTODS	31
2.1.8 INDUKTOREN DES APOPTOTISCHEN ZELLTODS	40
2.1.9 NACHWEISVERFAHREN VON ZELLTOD	43
2.2 NUKLEOSOMEN	57
2.2.1 STRUKTUR UND FUNKTION DER NUKLEOSOMEN	58
2.2.2 NUKLEOSOMEN WÄHREND DES ZELLTODS	64
2.2.3 ZIRKULIERENDE NUKLEINSÄUREN IM PLASMA UND SERUM	68
3 METHODISCHER HINTERGRUND DES NUKLEOSOMENTESTS	80
3.1 IMMUNCHEMISCHE NACHWEIS- UND MESSVERFAHREN	80
3.2 METHODISCHE GRUNDLAGEN DES AUSGANGSTESTS	82
3.3 MODIFIKATIONEN UND STANDARDISIERUNG DES AUSGANGSTESTS	85
3.4 BEWERTUNG DER ANALYTISCHEN QUALITÄT	90
4 METHODISCHER HINTERGRUND DER KLINISCHEN EVALUATION	92
4.1 PATIENTEN	92
4.1.1 GESUNDE PERSONEN	92
4.1.2 PATIENTEN MIT BENIGNEN ERKRANKUNGEN	92
4.1.3 PATIENTEN MIT MALIGNEN ERKRANKUNGEN	94
4.2 STATISTISCHE METHODEN	97
4.2.1 BEWERTUNG DER KLINISCH-DIAGNOSTISCHEN QUALITÄT	97
4.2.2 STATISTISCHE VERFAHREN IN DEN QUERSCHNITTSUNTERSUCHUNGEN	102
4.2.3 STATISTISCHE VERFAHREN IN DEN LONGITUDINALUNTERSUCHUNGEN	103

VII

5 ERGEBNISSE	105
5.1 METHODISCHE EVALUIERUNG DES NUKLEOSOMENTESTS	105
5.1.1 MODIFIKATIONEN UND STANDARDISIERUNG DES NUKLEOSOMENTESTS	107
5.1.2 QUALITATIVE AUSTESTUNG	116
5.1.3 MATRIX UND STABILISIERUNG	119
5.1.4 PRÄANALYTISCHE PROBENBEHANDLUNG	124
5.1.5 STÖRGRÖßEN	133
5.1.6 ZUSAMMENFASSUNG DER METHODISCHEN ERGEBNISSE	140
5.2 KLINISCHE EVALUIERUNG ANHAND VON QUERSCHNITTUNTERSUCHUNGEN	142
5.2.1 WERTEVERTEILUNG DER PRÄTHERAPEUTISCHEN NUKLEOSOMENKONZENTRATIONEN	142
5.2.2 DIAGNOSTISCHE WERTIGKEIT DER NUKLEOSOMEN IM SERUM	149
5.2.3 ABHÄNGIGKEIT DER NUKLEOSOMENWERTE VON DER TUMORLOKALISATION, STAGINGKRITERIEN UND WEITEREN CHARAKTERISTIKA	155
5.2.4 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER QUERSCHNITTUNTERSUCHUNGEN	165
5.3 KLINISCHE EVALUIERUNG ANHAND VON LONGITUDINALUNTERSUCHUNGEN	167
5.3.1 KINETIK DER NUKLEOSOMENKONZENTRATION IM SERUM	167
5.3.2 KINETIK DER NUKLEOSOMEN IM SERUM BEI GESUNDEN PERSONEN	167
5.3.3 KINETIK DER NUKLEOSOMEN IM SERUM BEI PATIENTEN MIT AKUTEN INFEKTEN WÄHREND ANTIBIOTISCHER THERAPIE	169
5.3.4 KINETIK DER NUKLEOSOMEN IM SERUM BEI PATIENTEN MIT MALIGNEN TUMOREN VOR UND NACH OPERATIVER THERAPIE	172
5.3.5 KINETIK DER NUKLEOSOMEN IM SERUM BEI PATIENTEN MIT MALIGNEN TUMOREN WÄHREND CHEMOTHERAPIE	175
5.3.6 KINETIK TUMOR-ASSOZIIERTER ANTIGENE IN KORRELATION ZUR NUKLEOSOMENKINETIK BEI PATIENTEN MIT SOLIDEN, MALIGNEN TUMOREN WÄHREND CHEMOTHERAPIE	210
5.3.7 KINETIK DER NUKLEOSOMEN IM SERUM BEI PATIENTEN MIT MALIGNEN TUMOREN WÄHREND RADIOTHERAPIE	220
5.3.8 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER LONGITUDINALUNTERSUCHUNGEN	238
6 DISKUSSION	241
7 ZUSAMMENFASSUNG UND PERSPEKTIVE	305
8 VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	309
9 LITERATURVERZEICHNIS	316

1 Einführung und Fragestellung

Die Homöostase von Zelluntergang und -neubildung spielt eine wesentliche Rolle für die Entwicklung sowie die Lebens- und Funktionsfähigkeit von einzelnen Organen, Organsystemen und ganzen Organismen. Ein Ungleichgewicht dieser beiden Komponenten kann fatale Folgen haben: Ein gedrosselter Zelluntergang mit einem Überhandnehmen der Zellneubildung führt zu systemisch oder lokal hyperproliferierenden Erkrankungen. Ein Überwiegen des Zelluntergangs andererseits wird bei degenerativen Erkrankungen, AIDS, Ischämie-, Toxin-vermittelten und autoimmunen Erkrankungen beobachtet.

Bei genauer Betrachtung sind die zur Dyshomöostase führenden Prozesse mitunter sehr komplex. Während der Pathogenese einiger Krankheiten – wie bei malignen Tumoren – kann das Verhältnis von Zelltod und –neubildung je nach Stadium variieren. Initial nimmt parallel zur Steigerung der Proliferationsrate auch die Zelltodrate zu. Reicht dieser gegenregulierende Mechanismus nicht mehr aus oder wird er blockiert, kommt es zu einem Nettowachstum des Tumors. Dabei kann das Zelltodvorkommen in diesem Stadium bezüglich der physiologischen Ausgangsbasis erniedrigt, gleich oder immer noch deutlich gesteigert sein. Im Rahmen der weiteren Karzinogenese kann die Zelltodrate mit der zunehmenden Proliferation dysfunktioneller Zellen wieder ansteigen.

Therapeutische Bemühungen zielen darauf hin, das Gleichgewicht von Zellneubildung und -untergang wiederherzustellen. Bei Patienten mit malignen Tumoren wird durch chemo- oder radiotherapeutische Ansätze eine gezielte Reduktion von Tumorzellen durch eine Anhebung der Zelltodrate angestrebt. Der Therapieerfolg kann anhand von bildgebenden Verfahren allerdings erst zu einem Zeitpunkt abgeschätzt werden, wenn makroskopische Veränderungen sichtbar sind. Aufgrund der hohen Toxizität der Therapien wäre es wünschenswert und sinnvoll, bereits früher Informationen über das biochemische Ansprechen der Behandlung zu erhalten, um gegebenenfalls intervenieren und das Therapieschema individuell anpassen zu können. Als Beurteilungskriterium der therapeutischen Wirksamkeit bietet sich die Zelltodrate im Therapieverlauf an.

Ein für diese Zwecke geeignetes, diagnostisches Verfahren, sollte zahlreiche Anforderungen erfüllen: Es sollte schnell, kostengünstig und leicht zu handhaben sein, eine hohe Sensitivität besitzen, reproduzierbare Ergebnisse liefern und vor allem eine möglichst geringe Invasivität aufweisen.

Viele der bislang für den Zelltodnachweis eingesetzten Methoden basieren allerdings auf dem zellulären Nachweis des Zelluntergangs und erfordern eine invasive Gewinnung des Probenmaterials – wie Gewebsentnahmen. Deshalb können sie für kontinuierliche Verlaufsbeobachtungen nicht eingesetzt werden.

Eine zunächst hypothetische Annahme bildet die Grundlage für einen einfachen, nur minimal-invasiven Ansatz zur Zelltod-Bestimmung: Massive, lokale Zelltodprozesse führen zu einer Freisetzung einer Reihe von Zelltodprodukten, die – sofern eine suffiziente Blutversorgung des betroffenen Gebietes besteht – auch in den Blutkreislauf übertreten. Sie können somit als Korrelat des Zelltodvorkommens auch im leicht zu gewinnenden Blutserum oder -plasma nachgewiesen und quantifiziert werden.

Typische Zelltodprodukte sind aus DNA und Histonen gebildete Nukleosomen, die während des apoptotischen und onkotischen Zelltods als Spaltprodukte des Chromatins durch Endonukleasen entstehen. Im Gewebe können sie durch immunologische Testsysteme wie den Cell Death Detection ELISA^{plus} nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde – aufbauend auf der ursprünglichen Version dieses Tests – ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Nukleosomen im Serum entwickelt. Dabei standen zunächst notwendige Modifikationen und Standardisierungen sowie die methodische Bewertung des Testsystems im Mittelpunkt. Daran schlossen sich eingehende Untersuchungen der zur Verfügung stehenden Matrices, der präanalytischen Probenbehandlung und potentieller Störgrößen an.

Schließlich erfolgte eine klinische Evaluierung des modifizierten Nukleosomentests hinsichtlich der spontanen und Therapie-induzierten Nukleosomenkonzentration im Serum. Dabei wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Unterscheiden sich die spontanen Nukleosomenkonzentrationen von gesunden Personen, Patienten mit benignen Erkrankungen und Patienten mit malignen Tumoren? Ist eine Diagnose maligner Erkrankungen möglich?
2. Unterscheiden sich die spontanen Nukleosomenkonzentrationen bei verschiedenen Tumorarten?
3. Unterscheiden sich die spontanen Nukleosomenkonzentrationen hinsichtlich der Tumoreigenschaften wie Stadium, Grading oder Histologie?
4. Welche Veränderungen ergeben sich in der Nukleosomenkonzentration durch Operationen, Infektionen und konsekutiver Antibiose sowie während chemo- und radiotherapeutischer Behandlung?
5. Korrelieren bei Personen mit malignen Erkrankungen die durch Chemo- und Radiotherapie-induzierten Veränderungen der Nukleosomenkonzentration mit dem klinischen Ansprechen der Therapie und den bildgebenden Befunden? Kann mittels Nukleosomen ein therapeutisches Monitoring durchgeführt werden? Wie sicher und wie frühzeitig kann die Therapieeffizienz beurteilt werden?
6. Korrelieren die Nukleosomenkonzentrationen während Chemo- und Radiotherapie mit anderen, zur Therapieeffizienzkontrolle herangezogenen onkologischen Biomarkern? Ist durch Nukleosomen eine vergleichbare oder zuverlässigere Beurteilung des Therapieerfolgs möglich?

2 Hintergrund

Das zu behandelnde Thema steht im Spannungsfeld Grundlagen-theoretischer, klinisch Anwendungs-bezogener und laborchemisch messtechnischer Kontexte. So empfiehlt es sich, in einem ersten Schritt wesentliche Aspekte für die Lokalisierung und Eingrenzung der Fragestellung zu beleuchten.

Dabei soll zunächst auf das Phänomen des Zelltods als solchem sowie auf dessen Bedeutung, Funktion und Regulation bis zur Freisetzung der Nukleosomen eingegangen werden. Danach werden die vielfältigen Möglichkeiten zum Nachweis des Zelltods vorgestellt. Schließlich wird die Struktur, Funktion und Bedeutung der Nukleosomen als Grundbaustein des Chromatins untersucht, und die klinische Relevanz des Analyten im Serum und Plasma erörtert.

2.1 Zelltod

2.1.1 Geschichte der Zelltodforschung

Zelltodforschung im weiteren Sinn wurde vermutlich schon von Aristoteles, sicher jedoch von Galenus Galen betrieben. Er beschrieb bereits im 2. Jhd. n. Chr. die Regression von larvalen und fetalen Strukturen im Laufe der Ontogenese. (Krammer 2000a)

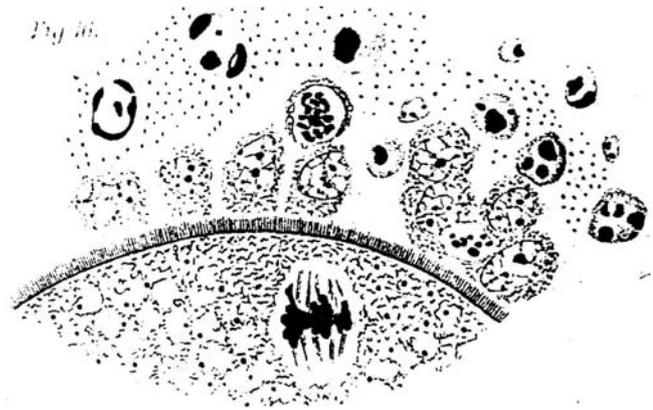
Die gezielte Erforschung von zellulären Degenerationsprozessen begann allerdings erst Mitte des 19. Jahrhunderts. Auch ohne Zugang zu histochemischen Methoden, entdeckte Carl Vogt 1842, dass Zellen durch „programmierten“ Tod zugrunde gehen können (Vogt 1842). In einem von Virchow 1858 verfassten grundlegenden Opus über zelluläre Pathologie findet sich dann eine ausführliche Abhandlung über „passive Prozesse und Degenerationen“, wobei Begriffe wie Degeneration, Erweichung, Nekrose und Mortifikation zur Unterscheidung verschiedener Zelltodprozesse verwendet werden (Majno 1995; Clarke 1996).

Walter Fleming erwähnte 1885 zum ersten Mal den Begriff „spontaner Zelltod“ als physiologisches Ereignis. Er bemerkte an der Oberfläche sich zurückbildender, ovarieller Follikel einen Saum von Zellen, deren Kerne typische, zu Halbmonden zusammen-

geschrumpfte (pyknotische) Chromatinschollen enthielten, die schließlich verschwanden. Diesen Prozess nannte er „Chromatolyse“ (Flemming 1885).

Die Erkenntnisse über Chromatolyse fasste Ludwig Gräper 1914 in „Eine neue Anschauung über physiologische Zellausschaltung“ zusammen. Er postulierte, dass Chromatolyse als

ausgleichendes Gegengewicht zu Mitose in allen Gewebeverbänden und Organen existiere, in denen Zellen eliminiert werden, beispielsweise in Epithelien. Die Rückstände werden dann von Nachbarzellen aufgenommen; übersteigen sie deren Aufnahmekapazität, werden sie in das Lumen eines Organs ausgeschüttet (Gräper 1914).



**Abbildung 1 (Flemming 1885):
Chromatolyse in ovariellen Follikeln**

Nach den beiden Weltkriegen wurde die Chromatolyse als morphogenetischer Mechanismus von Embryologen wieder aufgegriffen. A. Glücksmann gelang es 1951, den Tod embryonalen Gewebes auf den Untergang einzelner Zellen zurückzuführen und diesen Vorgang detailliert zu charakterisieren (Glücksmann 1951). In den folgenden Jahren wurden diese typischen morphologischen Veränderungen auch vom Hämatologen Bessis und dem Biologen Tata bei der Metamorphose der Kaulquappe beschrieben (Melino 2002; Vaux 2002).

Die Rolle der Denaturierung von Proteinen während des Zelltodes wurde 1960 durch G Majno geklärt. Er unterschied zwischen ischämischem Zelltod – als den Zeitpunkt, der unmittelbar zum Zelltodprozess führe – und Nekrose, die erst später durch die Rückstände der toten Zelle nachweisbar werde (Majno 1960).

Die Idee des zellulären Selbstmords kam erstmals in den späten 50er Jahren nach der Entdeckung der Lysosomen auf, deren Explosion zum Zelltod von innen führen sollte. Als weiterer Selbstmord-Mechanismus wurde die intrazelluläre Freisetzung von freien Radikalen nach Intoxikationen angesehen. (Majno 1995).

Am Insektenmodell studierten in den frühen 60er Jahren R Lockshin und C Williams Vorgänge während des Zelltods und prägten den Begriff des „programmierten Zelltods“ als einen räumlich und zeitlich vorhersehbaren Prozess (Lockshin 1964). Wenig später zeigten Tata und wiederum Lockshin, dass für diesen Zelltod die Synthese von Makromolekülen erforderlich ist. Mit RNA- und Protein-Inhibitoren konnten sie ihn wirksam verhindern (Tata 1966; Lockshin 1969).

1971 schließlich beschrieb John F. Kerr die so genannte „shrinkage necrosis“, eine Abfolge von Veränderungen, die er nach Okklusion der Vena portae von Ratten in einzelnen, absterbenden Zellen der daraufhin atrophierenden Leber feststellte (Kerr 1971).



John F. Kerr



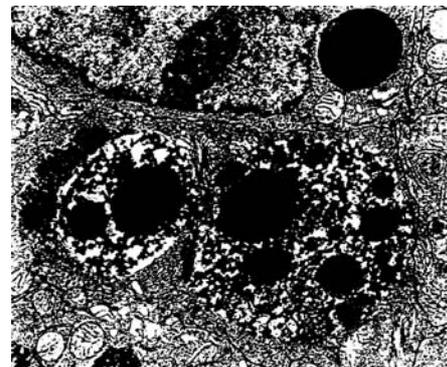
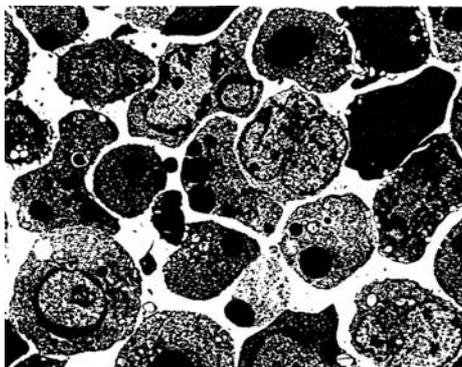
Andrew Wyllie



Sir Alastair Currie

**Abbildungen 2-4 (Cummings 1997):
Erstbeschreiber der Apoptose**

Ein Jahr später führte er zusammen mit Andrew Wyllie und Sir Alastair Currie dafür den Terminus der „Apoptose“ ein – ein dem Griechischen entnommener Begriff, der das Herunterfallen von Blättern im Herbst bezeichnet – und läutete damit eine neue Epoche der modernen Zelltodforschung ein (Kerr 1972).



**Abbildungen 5 und 6 (Kerr 1994):
Apoptotische Zellen mit den typischen morphologischen Charakteristika**

In den späten 70er Jahren wurden in bestrahltem Gewebe elektrophoretische Untersuchungen des Chromatins durchgeführt. Dabei wurde eine typische Fragmentierung vorgefunden, die ein Leiter-ähnliches Muster auf dem dabei verwendeten Agarose-Gel hinterließ (Skalka 1976,

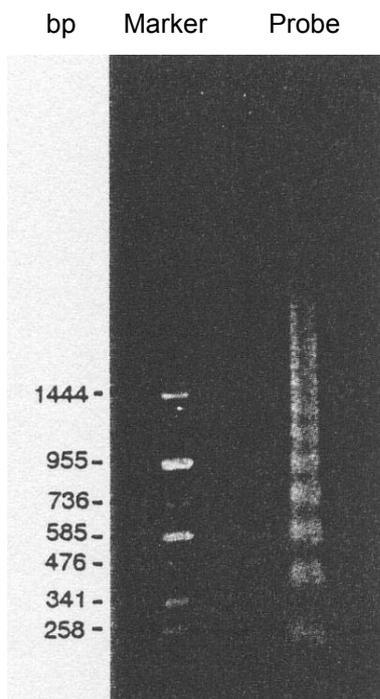


Abbildung 7 (Darzynkiewicz 1997):
„DNA-Leiter“

Yamada 1981, Zhivotovsky 1981). Die Chromatinbruchstücke wiesen eine Länge von ca. 200 Basenpaaren oder einem Vielfachen davon auf, die der Größe von Mono- oder Oligonukleosomen entspricht. Diese aus DNA und Histonen bestehenden Grundbausteine des Chromatins waren bereits 1974 durch R Kornberg strukturell charakterisiert worden (Kornberg 1974, 1977). 1973 war zudem von Hewish und Burgoyne die Existenz der Ca^{2+} - und Mg^{2+} -abhängigen DNase I beschrieben worden (Hewish 1973). A Wyllie verknüpfte diese Erkenntnisse mit dem Phänomen des apoptotischen Zelltodes und fügte den morphologischen somit mit der DNase I-abhängigen internukleosomalen DNA-Fragmentierung ein biochemisches Charakteristikum hinzu (Wyllie 1980b, 1984).

In der Folgezeit entspann sich ein regelrechter Wettlauf in der Erforschung der genetischen Regulierung der Apoptose, der Vermittlung von Zelltod-Signalen und ihrer intrazellulären Weiterleitung bis hin zu Möglichkeiten der diagnostischen und therapeutischen Intervention in die Zelltod-Organisation:

Den Zusammenhang zwischen Zelltod und genetischer Programmierung stellte R Horvitz 1982 durch Untersuchungen eines Wurm namens *Caenorhabditis elegans* her, bei dem genau 131 der 1090 Körperzellen während der Entwicklung durch Apoptose zugrunde gehen (Horvitz 1982). 1986 wurden die bei diesem Prozess essentiellen Gene *ced* (cell death) 3 und *ced* 4 (Ellis 1986), 1992 zusätzlich das regulierende *ced* 9 entdeckt (Hengartner 1992). Dessen Pendant in Säugetierzellen – das Bcl-2 Gen – war bereits 1984 von L Pegoraro in folliculären Lymphomzellen analysiert worden und wurde zunächst als Onkogen angesehen (Reed 1988). Wenig später erkannte D Vaux die Bedeutung von Bcl-2 für die Blockierung des apoptotischen Zelltods (Vaux 1988). Eine zentrale Rolle für die Auslösung der Apoptose

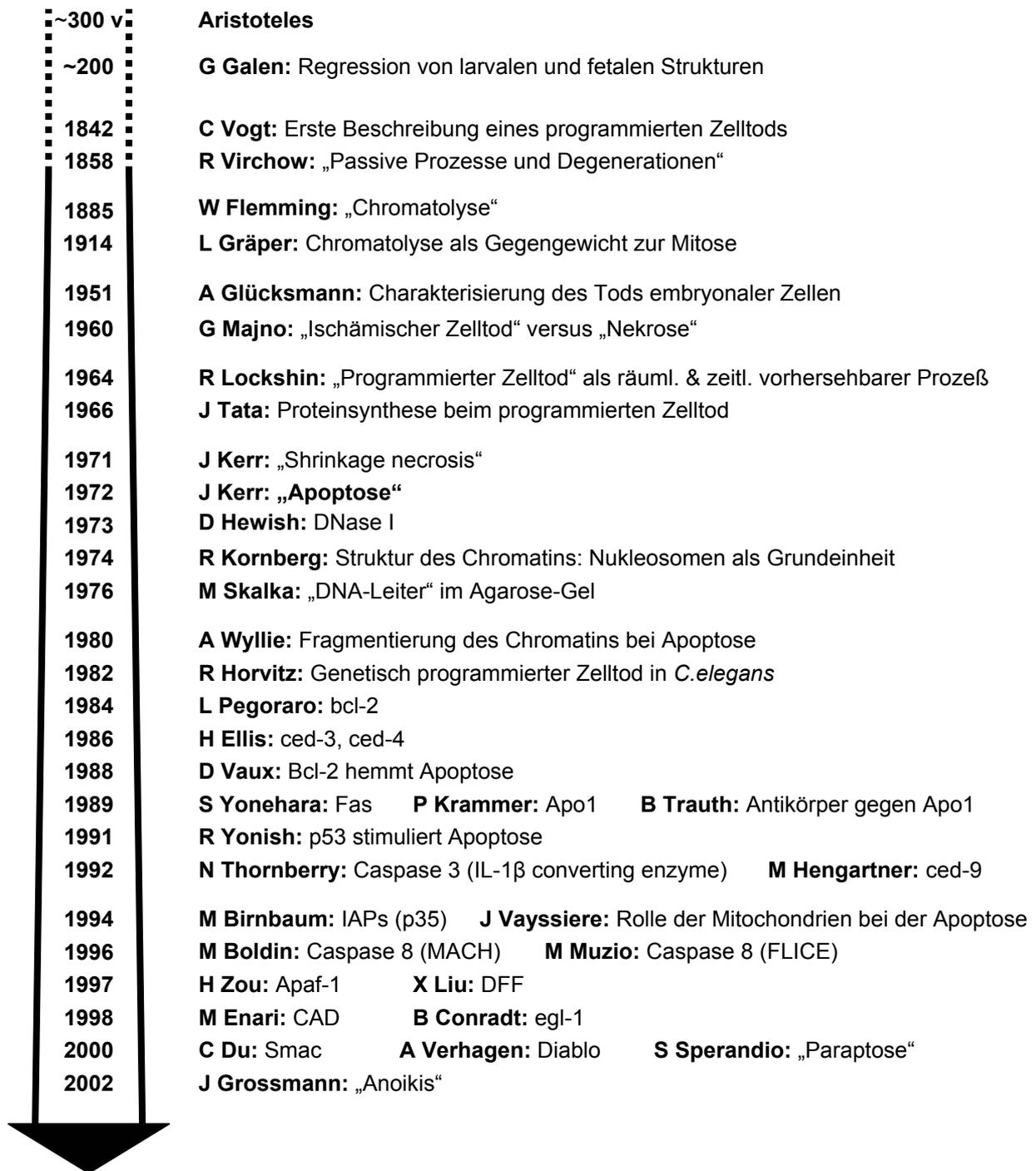
hingegen spielt das p53 Gen, wie R Yonish 1991 an leukämischen Zellen zeigte (Yonish 1991).

Ein wesentlicher Meilenstein in der Zelltodforschung war die Entdeckung der Rezeptor-vermittelten Apoptose-Induktion: Unabhängig voneinander beschrieben 1989 die Arbeitsgruppen von S Yonehara (Yonehara 1989) und P Krammer (Trauth 1989) die Stimulation des apoptotischen Zelltods durch einen Oberflächenrezeptor der TNF-Familie, der als Fas und Apo1, später dann als CD95 bezeichnet wurde. Die Aktivierung des Fas/Apo1/CD95-Systems mittels eines monoklonalen Antikörpers durch B Trauth gilt als erster erfolgreicher Ansatz, die Apoptose-Induktion therapeutisch zu nutzen (Trauth 1989).

Als Protagonisten der intrazellulären Vermittlung des Apoptosesignals kommt den Caspasen (Cystein-abhängige Aspartat-spezifische Proteasen) eine zentrale Bedeutung zu: 1992 wurde die erste Cysteinproteasen – das Interleukin-1-beta konvertierende Enzym, später auch Caspase 3 benannt – von N Thornberry identifiziert (Thornberry 1992). In den darauf folgenden Jahren wurden weitere sich gegenseitig proteolytisch aktivierende Caspasen gefunden, die das Apoptosesignal kaskadenartig weiterleiten (Boldin 1996; Muzin 1996; Thornberry 1999). Dennoch dauerte es bis 1997, ehe das Endglied der Kaskade entdeckt wurde, eine Caspasen-abhängige DNase (DFF/CAD), die das Chromatin in oligonukleosomale Fragmente spaltet (Liu 1997; Enari 1998).

Inzwischen sind eine Vielzahl weiterer Oberflächen-Rezeptoren und intrazellulärer Faktoren bekannt, die das Apoptosesignal verstärkend oder hemmend beeinflussen (Birnbäum 1994; Zou 1997; Conradt 1998; Du 2000; Verhagen 2000; Krammer 2000a; Gastman 2001). Die Beteiligung der Mitochondrien an den aktiven Prozessen ist mittlerweile unbestritten (Vayssiere 1994; Green 1998); die Rolle weiterer Organelle, wie des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparats, rücken mehr und mehr in den Blickwinkel des Interesses (Gastman 2001). Auf genetischer, RNA- und Proteinebene setzen therapeutische Strategien zur Modulation der Apoptose an, deren Stellenwert für unterschiedlichste Krankheitsbilder zunehmend erkannt wird (Kaufmann 2000; Nicholson 2000; Ehlert 2001; Ferreira 2002; Reed 2002; Timmer 2002). Gleichzeitig wird die Vielseitigkeit der Zelltodformen und -prozesse jenseits der klassischen Einteilungen deutlich (Majno 1995; Lockshin 2000; Sperandio 2000; Leist 2001; Grossmann 2002). Dies soll in den folgenden Kapiteln beleuchtet werden.

Abbildung 8: Chronologie der Zelltodforschung

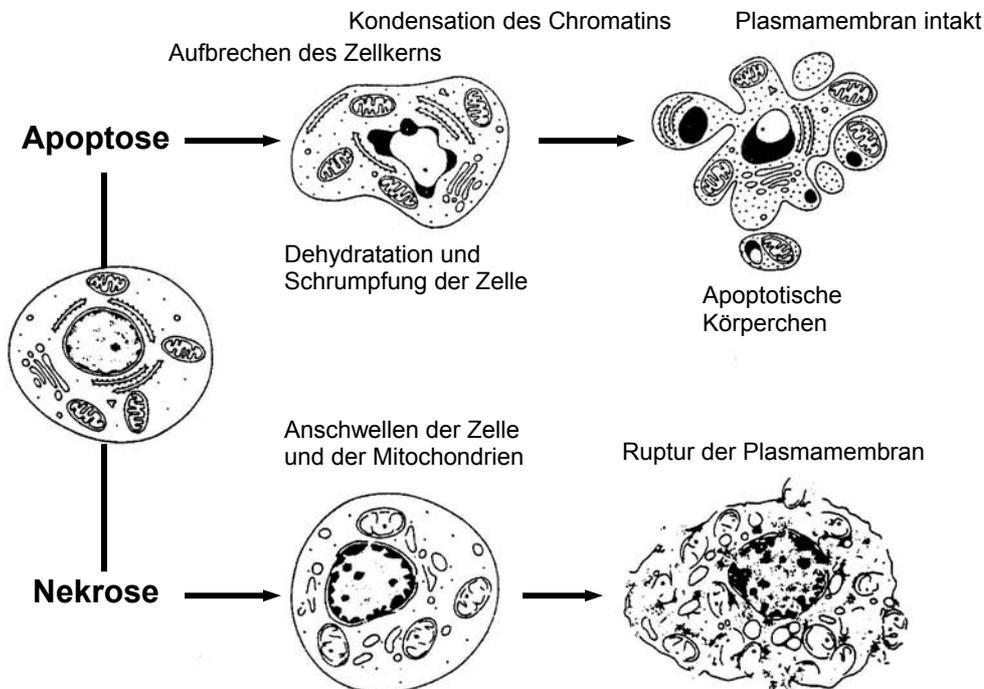


2.1.2 Dichotomisches Zelltodmodell

Aus historischen Gründen wurde nach der Einführung des Apoptose-Begriffs durch Kerr zunächst zwischen Zelltodformen unterschieden, die sich aufgrund äußerer und innerer Stimuli ergeben. Selbstmord von Zellen wurde in mindestens drei Arten unterteilt: Ischämischer Zelltod, Zelltod durch freie Radikale und die genetisch regulierte Apoptose (Majno 1995). Letztere bildete – wie von Gräper vorgeschlagen – das Gegenstück zur Mitose.

Unter Nekrose verstand man zunächst makroskopisch die Rückstände eines abgestorbenen Gewebes. Auf zellulärer Ebene wurde die Nekrose als durch externe Stimuli veranlasster, passiv ablaufender Zelltod bezeichnet – im Gegensatz zur intrinsischen, aktiv durchgeführten Zelldegradation, der Apoptose. Diese beiden Formen wurden in dichotomischer Manier auf alle Zelluntergangsphänomene angewendet; andere Zelltodformen blieben weithin unberücksichtigt (Wyllie 1980a; Kerr 1994).

Abbildung 9: „Klassisches“ Zelltodmodell (modifiziert nach Majno 1995):



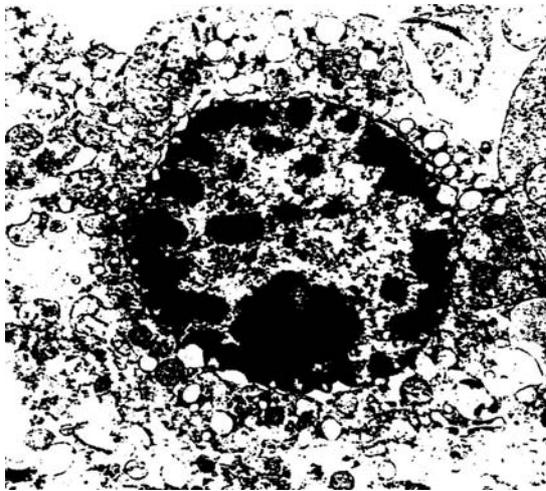
Die Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose auf morphologischer und biochemischer Ebene sind in der folgenden Tabelle dargestellt (Kerr 1994; Majno 1995; Uchiyama 1995; Granville 1998):

Tabelle 1: Morphologische und biochemische Charakteristika von Nekrose und Apoptose

	Nekrose	Apoptose
Vorkommen	Betrifft Gruppen von Zellen	Betrifft einzelne Zellen
Lokalisation	Zentrum von größeren Läsionen	Peripherie von Läsionen oder vereinzelt
Aktivitätsgrad	Passiv, energieunabhängig	Aktiv, energieverbrauchend
Pathomechanismus	Ausfall des Ubiquitin-System Ausfall der Ionenpumpe Einstrom von Na und Wasser	ATP-abhängige Aktivierung von Proteasen und Endonukleasen Wasserverlust
Zelle	Schwillt an	Schrumpft
Zellkern	Schwillt an	Schrumpft bzw. bricht auf oder teilt sich, Nukleoli verschwinden
Chromatin	Verklumpt	Kondensiert und aggregiert schollig an der Kernmembran
	Unspezifische Fragmentierung	Fragmentierung in Bruchstücke von 50-300 kbp, dann Fragmentierung in Vielfache von 180 bp durch Endonukleasen
Organellen	Geschädigt	Nicht geschädigt
Mitochondrien	Schwellen an Ausfall des Ubiquitin-System	Keine strukturelle Veränderung Vermindertes Transmembranpotential
Zellmembran	Blebbing-Phänomen Wird permeabel, platzt schließlich und setzt Zellinhalt frei	Budding-Phänomen Zellinhalt wird in Vesikel verpackt Apoptotische Körperchen
Elimination	Migration von Phagozyten	Phagozytose durch Nachbarzellen und gewebsständige Makrophagen
Entzündung	Entzündungsreaktion	Keine Entzündungsreaktion

Nekrose

Nekrotischer Zelltod betrifft typischerweise Gruppen von Zellen oder ganze Gewebeteile. Gravierende, meist externe Stimuli, wie Ischämien, starke Bestrahlungsdosen oder schwere Traumata, schädigen auf zellulärer Ebene zunächst das Endoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien. Diese schwellen in der Folge dramatisch an, ebenso wie auch die Zelle als ganze, deren zunehmend durchlässigere Zellmembran den Einstrom von Wasser ermöglicht. An der Zelloberfläche sind so genannte „Blebbing“-Prozesse zu beobachten (Kerr 1994):



**Abbildung 10 (Kerr 1994):
Nekrotische Zelle**

Es bilden sich kleine flüssigkeitsgefüllte Bläschen, die größer werden und aufplatzen. Schließlich rupturiert die Zellmembran selbst und setzt die Zellbestandteile, einschließlich lysosomaler Enzyme, in den extrazellulären Raum frei. Diese proteolytischen Enzyme greifen Nachbarzellen und -gewebe an und tragen zur Entwicklung einer Entzündungsreaktion mit Einwanderung von Phagozyten bei.

Derweil klumpt im ebenfalls angeschwollenen Zellkern das Chromatin zusammen (Flocculation) und wird durch Proteasen unspezifisch gespalten (Cotter 1990), so dass DNA-Fragmente von heterogener Größe entstehen (Darzykiewicz 1997). Diese gelangen nach der Auflösung der Kernmembran (Karyolysis) ebenfalls in den Extrazellulärraum. Innerhalb von etwa 12 bis 24 Stunden ist der nekrotische Zelltodvorgang abgeschlossen (Majno 1995).

Apoptose

Apoptose betrifft jeweils nur einzelne Zellen, die entweder ein gewisses Alter erreicht haben, für die Funktionsfähigkeit eines Organs nicht mehr gebraucht werden oder gar gefährlich sind, oder die durch externe Stimuli irreparabel geschädigt wurden. Sofern die benötigten zellulären Strukturen und Funktionen erhalten sind, wird ein intrinsisches Programm zur aktiven Selbstdestruktion angestoßen. Im gegenteiligen Fall geht die Zelle passiv zugrunde (Kerr 1994; Wyllie 1994; Majno 1995; Darzykiewicz 1997).

Der Vollzug des Zelltods kann in drei Stadien aufgegliedert werden:

- Zunächst kondensiert das Chromatin, wird pyknotisch, verlagert sich randständig an die Kernmembran und bildet dort halbmondartige Gebilde. Zelleigene Endonukleasen werden aktiviert, welche die DNA erst in grobe Stücke von 50 bis 300 Kilobasenpaare (kbp), später in kleinere – mit einer Länge von etwa 180 bp oder einem Vielfachen davon – spaltet. Die Zelle als ganze verliert an Wasser, schrumpft und nimmt an Dichte zu. Auch der Zellkern wird kleiner und kann aufbrechen (Karyorhexis). Die zytoplasmatischen Organellen werden zusammengepackt; das endoplasmatische Retikulum dilatiert. Dabei bleiben die Mitochondrien, die Lysosomen und die Zellmembran zunächst unverändert (Arends 1990; Darzynkiewicz 1997).
- In der zweiten Phase finden so genannte „Budding“-Prozesse statt; es kommt zu Unregelmäßigkeiten, Auffaltungen und Blasenbildung an der Zellmembran. Zellbestandteile, darunter auch pyknotische Kernfragmente und strukturell intakte Zellorganelle, werden in die zahlreichen, membranständigen Vesikel eingeschlossen. Im weiteren Verlauf schnüren sich diese ab, lösen sich als apoptotische Körperchen von der Zelloberfläche und werden von Gewebs-Makrophagen oder Nachbarzellen phagozytiert. (Arends 1990; Kerr 1994; Majno 1995)
- Im dritten Stadium verliert die zurückgebliebene Zelle nach und nach ihre Substanz. Die zytoplasmatischen und nukleären Strukturen schrumpfen zusammen und formen schließlich selbst ein dichtes, rundes apoptotisches Körperchen, welches phagozytiert wird. Die Erkennung, vollständige Aufnahme und lysosomale Verdauung der Zellbestandteile in benachbarten Zellen oder Makrophagen wird durch ein gut funktionierendes Recyclingsystem ermöglicht. Da physiologischerweise so keine Zellreste zurückbleiben wird beim apoptotischen Zelltod keine inflammatorische Reaktion mit Migration von Phagozyten in das betroffene Gewebsareal beobachtet (Kerr 1994), ebenso wenig eine Zelltod-Affektion von anliegenden Zellen (Kerr 1972, 1994; Wyllie 1980a).

Die frühen apoptotischen Ereignisse – einschließlich des Buddings und der Ausbildung von apoptotischen Körperchen – spielen sich meist innerhalb weniger Minuten ab (Kerr 1994; Arends 1990; Majno 1995), der lysosomale Abbau ist schon nach wenigen Stunden beendet. Allerdings variieren die zeitlichen Abläufe je nach Zelltyp und Gewebe (Kanduc 2002).

In vitro entkommen die apoptotischen Körperchen der Phagozytose, es kommt entweder zur Desintegration der sie umschließenden Membran, gefolgt von der Freisetzung des Inhalts in die Umgebung oder zu einer weiteren Aufspaltung und Degradation (Kerr 1994; Majno 1995).

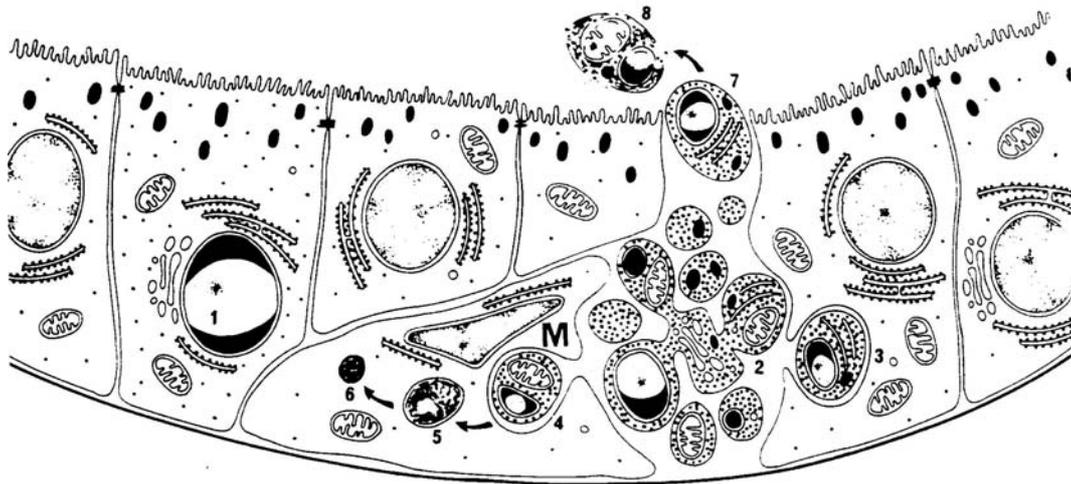


Abbildung 11 (Cummings 1997): Ultrastrukturelle Veränderungen während Apoptose:
 1) Kondensation und Marginalisation des Chromatins 2) Ausstülpung der Kern- und Plasmamembran, „Budding“-Prozesse und Bildung von apoptotischen Körperchen
 3) Phagozytose durch Nachbarzellen und 4) Makrophagen 5) Lysosomale Degradation zu
 6) unkenntlichen Resten 7) Entkommen eines apoptotischen Körperchens und Freisetzung
 in ein Lumen oder die Blutbahn 8) Degenerative Nekrose-ähnliche Veränderungen.

Während des apoptotischen Zelltods steigt die intrazelluläre Kalzium-Konzentration an und führt zur Aktivierung von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -abhängigen Endonukleasen, die an der Spaltung des Chromatins maßgeblich mitbeteiligt sind (Arends 1990; Zhivotovsky 1994; Darzynkiewicz 1997). Durch den Ausfall der Asymmetrie von Phospholipiden in der Plasmamembran wird ehemals nach innen gewandtes Phosphatidylserin nach außen gekehrt und dient zur Erkennung der apoptotischen Körperchen durch phagozytierende Makrophagen und Nachbarzellen (Fadock 1992; Verhoven 1995; Martin 1995; Webb 1997; Hengartner 2001).

Weitere Zelltodarten und Mischformen

Die genannten Charakteristika lassen nicht immer eine eindeutige Unterscheidung zwischen Nekrose und Apoptose zu: Auf biochemischer Ebene wurden morphologisch eindeutig als Nekrose klassifizierte Prozesse auch mit spezifischer DNA-Fragmentierung und dem DNA-Leiter-Profil im Agarose-Gel beobachtet (Collins 1992; Stewart 1994). Andererseits wurden

morphologisch als Apoptose eingeordnete Vorgänge ohne die für sie typische spezifische DNA-Fragmentierung gefunden (Cohen 1992, Oberhammer 1993, Stewart 1994).

Unabhängig von morphologischen oder biochemischen Merkmalen werden die Begriffe des reproduktiven oder mitotischen sowie des Interphase-Zelltods gebraucht: Beim reproduktiven oder mitotischen Zelltod durchläuft die Zelle nach der Schädigung noch einen oder mehrere Zellzyklen und geht dabei langsam zugrunde. Hingegen stirbt die Zelle beim Interphase-Zelltod noch im gleichen Zyklus, in dem ihr die letale Läsion zugefügt wurde (Darzynkiewicz 1997).

Als autophagischer Zelltod werden dynamische, zelluläre Prozesse während der Embryonalentwicklung sowie unter nutritiven Mangelzuständen bezeichnet, bei denen durch einen Umbau von subzellulären Membranen Zytoplasma und Organellen sequestriert und in Lysosomen und autophagischen Vakuolen abgebaut werden. So können sich einzelne Zellen genetisch programmiert oder als Reaktion auf externe Stress-Bedingungen optimal neuen Anforderungen anpassen (Klionsky 2000).

Eine alternative Zelltodform, die ebenfalls genetisch programmiert ist, während der embryonalen Entwicklungszeit und bei Neurodegeneration auftritt, mit zytoplasmatischer Vakuolenbildung und mitochondrialer Schwellung einhergeht, wird als „Paraptose“ bezeichnet. Sie hat weder eindeutig apoptotische noch nekrotische Charakteristika und ist durch typische Apoptose-Inhibitoren nicht zu blockieren (Sperandio 2000). Auch der zytoplasmatische Zelltod und weitere Zelltodformen während der neuronalen Entwicklung oder bei der Amyotrophen Lateralsklerose sind mit einer Schwellung der Mitochondrien und des Endoplasmatischen Retikulums assoziiert und erweitern die Palette von Mischformen zwischen Apoptose und Nekrose (Sperandio 2000).

Vor kurzem wurde schließlich der Begriff der „Anoikis“ (griech: Zustand der Heimatlosigkeit) geprägt für eine Zelltodart, die durch den Verlust der interzellulären oder der Zell-Matrix Kontakte eintritt. Sie weist morphologische und biochemische Merkmale der Apoptose auf, betont jedoch die Bedeutung der externen Überlebenssignale und der Adhäsionsfähigkeit einer Zelle (Grossmann 2002).

Unzulässigerweise werden die Termini „Apoptose“ und „programmierter Zelltod“ manchmal als Synonyme verwendet. Die Unschärfe entsteht durch die Verquickung zweier Programme, die zur Durchführung des physiologischen Zelltods notwendig sind:

- Ein Triggerprogramm, welches den Zeitpunkt der Selbstmordeinleitung reguliert.
- Ein Selbstmordprogramm, welches die Art der Zelldegradation bestimmt.

Beim programmierten Zelltod ist der Zeitpunkt der Auslösung des Zelldestruktionsprozesses (Trigger) genetisch festgelegt. Auf welche Art der Selbstmord selbst vonstatten geht, ist hingegen offen.

Apoptose ist ein durch spezifische morphologische und biochemische Charakteristika gekennzeichnetes Selbstmordprogramm. Dieses kann durch einen genetischen Trigger oder externe Ereignisse ausgelöst werden.

Somit können programmierter Zelltod und Apoptose – je nach Art des Trigger- und des Selbstmordprogramms – getrennt voneinander oder auch zusammen auftreten, bezeichnen jedoch unterschiedliche Anteile des physiologischen Zelltods (Majno 1995).

Des Weiteren kann nach der interner oder externer Natur des Triggers differenziert werden. Der akzidentelle Zelltod bezeichnet dabei den nach Einwirkung von Hitze, Toxinen, Ischämie oder anderen extern zugefügten Läsionen eintretenden Zelltod. Der programmierte Zelltod ist dann streng auf den genetisch (intern) determinierten Degradationsprozess begrenzt. Da bei beiden Formen apoptotische und nekrotische Zelltodformen festgestellt wurden, sind offenbar für die Wahl des Selbstmordprogramms weniger die Art, als vielmehr die Stärke des Stimulus sowie die Fähigkeit oder Neigung einer Zellart, eine bestimmte Todesart vorzuziehen, entscheidend (Majno 1995; Darzynkiewicz 1997; Nicotera 1999; Leist 2001).

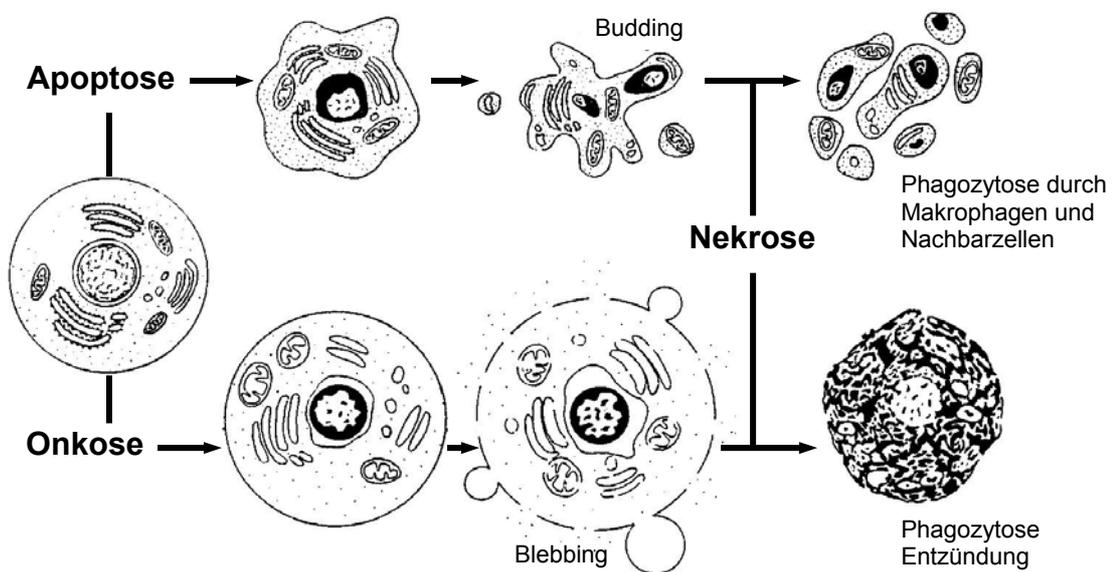
Einen wesentlichen Einfluss auf die Art des Zelltodes nimmt offenbar der Energiegehalt einer Zelle: Während energiereiche Zellen nach entsprechender Schädigung apoptotische Charakteristika aufweisen, gehen Zellen mit niedrigem Energiepotential häufig durch Nekrose zugrunde (Richter 1995; Nikotera 1997; Leist 1997a,b). Daneben sind auch intrazelluläre Kalzium-Konzentration und der pH für die Zelltodart bedeutsam (Leist 1998; Matsuyama 2000)

2.1.3 Integriertes Zelltodmodell

Hinsichtlich der morphologischen Veränderungen einer Zelle in der zeitlichen Abfolge während des Zelltodgeschehens kann ferner zwischen Prozessen unterschieden werden, die zum Zelltod führen und solchen, die nach demselben stattfinden. Dabei wird die Schwierigkeit der Definition des exakten Zelltod-Zeitpunktes offenbar. Eine sterbende Zelle ist schon sehr früh nach einer Schädigung an einem „point of no return“ angelangt, das Vollbild einer toten Zelle jedoch ist oft erst nach mehreren Stunden erkennbar. Irreversiblen Veränderungen des Zellkerns und -plasmas sind klassische nekrotische Kennzeichen, welche allerdings erst *post mortem* stattfinden (Majno 1995; Darzynkiewicz 1997; Kanduc 2002).

In einem Zelltodkonzept integrierten Majno und Joris 1995 die weiteren Entwicklungen im Verständnis des Zelltodes. Dabei benannten sie die ehemals als Nekrose titulierte, mit einem Anschwellen der Zelle einhergehenden Todesform als Onkose (griech. Schwellung) als Gegenstück zur Apoptose, die mit Zellschrumpfung verbunden ist (Majno 1995).

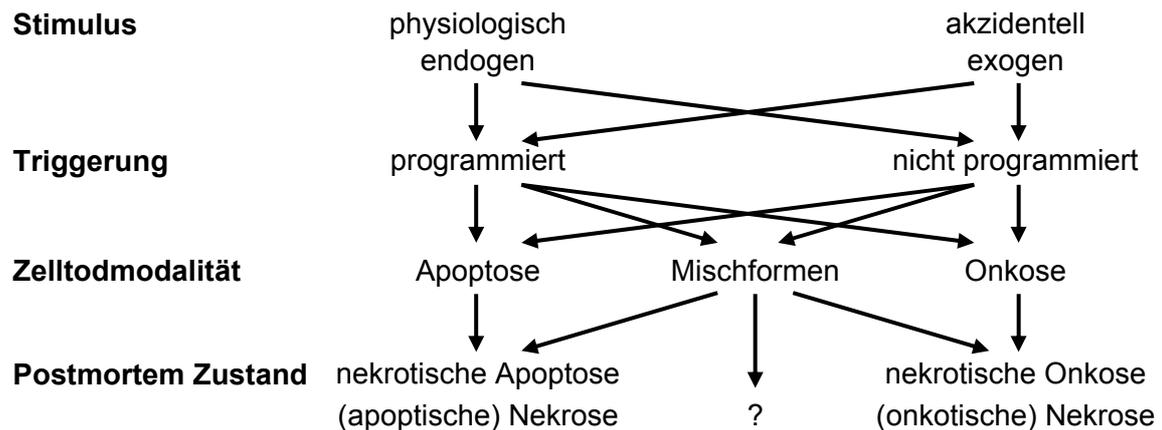
Abbildung 12: Erweitertes Zelltodmodell (modifiziert nach Majno 1995):



Dieses Zelltodmodell bietet den Vorteil einer differenzierteren Unterscheidung zwischen Ereignissen, die zum Zelltod führen, den Zelltodprozessen als solchen und Vorgängen, die nach dem Zelltod ablaufen. Allerdings wird dieses Modell durch neu charakterisierte Zelltodformen – wie autophagischer Zelltod, Paraptose und zytoplasmatischer Zelltod – weiter komplexiert: Für eine umfassende Betrachtung des Zelltodgeschehens – sei es

physiologisch oder durch äußere Einflüsse ausgelöst – ist das Nebeneinander von Apoptose, Onkose und Mischformen in unterschiedlicher Ausprägung und Gewichtung zu berücksichtigen. Zusammengefasst ergibt sich folgendes Schema, welches die Ursachen und Abfolge der Ereignisse, die im Zusammenhang des Zelltodgeschehens stattfinden, integriert:

Abbildung 13: Integriertes Zelltodmodell



Für die weitere Darstellung werden die in diesem Schema verwendeten Begriffe zugrunde gelegt.

2.1.4 Zelltod bei physiologischen Prozessen

Der Zelltod – besonders der apoptotische – spielt im menschlichen Organismus eine fundamentale Rolle, sowohl in der embryonalen Entwicklung, der Ausbildung und Funktionsfähigkeit des Immunsystems sowie der Homöostase der Zellzahl und Aufrechterhaltung von Organfunktionen (Kerr 1994; Cummings 1997; Granville 1998).

Embryonalentwicklung

Während der embryonalen Entwicklung finden ausgedehnte und gezielte apoptotische Vorgänge statt, um schädliche, unnötige oder im Überschuss vorhandene Zellen zu beseitigen (Prindull 1995; Jacobson 1997; Cummings 1997; Granville 1998): So ist der apoptotische Zelltod von Bedeutung bei der Formung von tubulären Strukturen, Darmlumina oder Gelenkhöhlen, der Modellierung der Finger und Zehenglieder, der Bildung der Gesichtsform einschließlich des Gaumens, der Morphogenese des Herzens, der Entwicklung des Nervensystems und der Rückbildung von phylogenetischen Spuren, wie den interdigitalen Schwimmhäuten, dem Müller'schen und Wolff'schen Gang. Schon im Stadium der

Blastogenese – bei Mäusen bereits 95 Stunden nach Konzeption – wurden elektronenmikroskopisch apoptotische Zellen nachgewiesen, was die herausragende Rolle der Apoptose in der embryonalen Entwicklung schon von Beginn an demonstriert (Glücksman 1951; Raff 1992; Prindull 1995; Jacobsen 1997; Cummings 1997; Granville 1998; Meier 2000).

Immunsystem

Bei der Ausbildung des Immunsystems reifen T-Lymphozyten zunächst im Knochenmark heran und durchlaufen danach im Thymus die Prozesse der positiven und negativen Selektion (Krammer 1997, 2000a,b). Dabei werden körpereigene Peptide und „Major Histocompatibility“ (MHC)- Antigene den T-Zellen präsentiert. Reagieren diese mit den T-Zell-Rezeptoren, werden die somit als potenziell autoreaktiv erkannten T-Zellen durch Apoptose beseitigt (negative Selektion), um die Toleranz gegenüber körpereigenem Gewebe zu gewährleisten und Autoimmunität zu vermeiden. Durch positive Selektion werden nutzlose Immunzellen, die unfähig sind, körperfremde Antigene zu erkennen, eliminiert. Auf entsprechende Weise werden B-Zellen, die nicht funktionelle B-Zell-Rezeptoren tragen, im Knochenmark ausgemustert (Ucker 1997; Krammer 1997, 2000a,b).

Die Aktivierung des Immunsystems zur Beseitigung eines infektiösen Agens geht mit einer komplexen Immunantwort einher: Das Antigen wird von Antigen-präsentierenden Zellen den T-Zellen vorgelegt und von deren T-Zell-Rezeptor als körperfremd erkannt. Der Antigen-MHC-Komplex, weitere stimulierende Zelloberflächenmoleküle und Zytokine führen zu einer klonalen Expansion der T-Zellen. Diese wiederum kommunizieren mit anderen T- und B-Zellen, wodurch die spezifische und unspezifische Abwehrreaktion reguliert wird. Nach dem Gipfel der Immunantwort werden alle nicht mehr benötigten Immunzellen insbesondere durch apoptotischen Aktivierungs-induzierten Zelltod (activation induced cell death: AICD) eliminiert und die Homöostase innerhalb des Immunsystems wieder hergestellt (Ameisen 1994; Ucker 1997; Krammer 1997, 2000a,b).

Erhaltung von Organfunktionen

Täglich werden im menschlichen Organismus etwa eine Billion Zellen neugebildet. Ein großer Teil davon wird durch Gewebe oder Systeme mit hohem Zellumsatz bestritten, zum Beispiel durch Epithelien des Gastrointestinaltraktes, durch die Leber, das lymphatische und

hämatopoetische System sowie durch die Spermato- und Oogenese. Die Entfernung der alten, geschädigten und nicht mehr gebrauchten Zellen erfolgt zum überwiegenden Teil auf aktivem, meist apoptotischem Wege (Cotter 1990; Raff 1992; Ameisen 1994; Thompson 1995; Cummings 1997; Savitz 1998; Wagener 1999).

Daneben sind menschliche Zellen ständig Mutagenen, Sauerstoffradikalen- und mediators, Toxinen und anderen Umwelteinflüssen ausgesetzt, welche potentiell zu DNA-Schäden führen. Können DNA-Reparatursysteme diese nicht mehr beheben, müssen diese Zellen – meist durch Apoptose – entfernt werden, damit sie nicht zur Entstehung von neoplastischen oder anderen Erkrankungen beitragen (Thompson 1995; Granville 1998; Rich 2000; Schär 2001).

Nach Gewebsschäden werden ebenfalls Reparaturmechanismen aktiviert, die eine Entzündungsreaktion, Bildung von Granulationsgewebe und zuletzt die Vernarbung beinhalten. Auch hier spielt Apoptose eine Rolle, wenn sich nach dem Wundverschluss das Granulations- in Narbengewebe umwandelt und die zellulären Bestandteile zugunsten von Fasergewebe beseitigt werden (Desmouliere 1997).

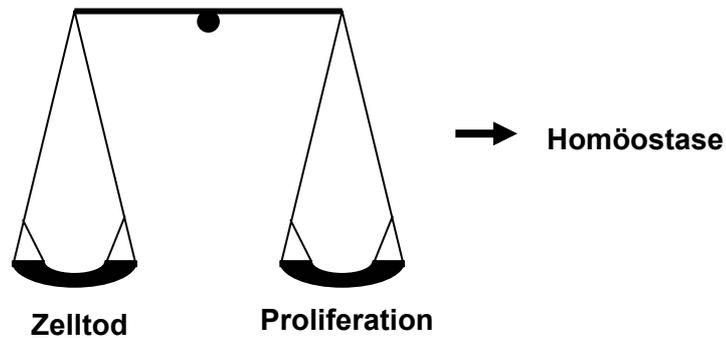
Alterungsprozess

Beim Alterungsprozess gewinnt neben der Beseitigung von Zellen zur Erhaltung der Homöostase und Funktionsfähigkeit von Organen die Elimination von postmitotischen, nicht mehr ersetzbaren Zellen, wie Neuronen und Myokardiozyten, an Bedeutung (Warner 1997; Granville 1998; Fadeel 1999). Daneben verlieren viele Zelltypen ihre Fähigkeit, den apoptotischen Zelltod zu vollziehen, beispielsweise Fibroblasten, Thymozyten und Lymphozyten (Warner 1997). Somit könnte die Deregulation der Apoptose zum allgemeinen Absinken der Organfunktionalität beitragen, wie auch zu erhöhter Anfälligkeit für infektiöse und Autoimmun-Erkrankungen.

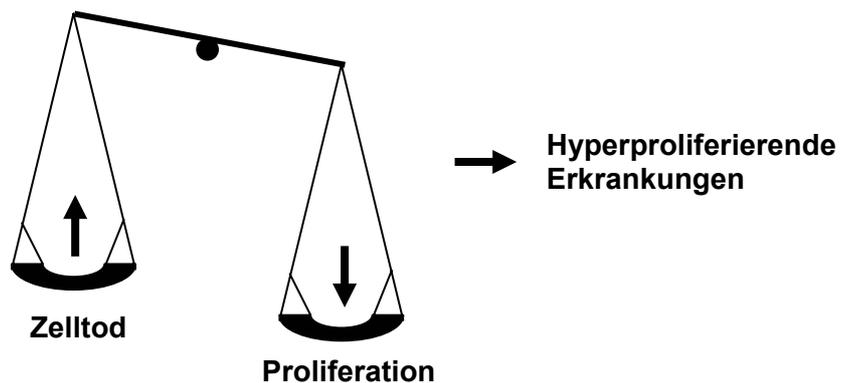
Neurodegenerative Erkrankungen, die auf Verlust von spezifischen Neuronen beruhen und in ihrer Prävalenz im Alter stark zunehmen, wie Chorea Huntington, Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und Amyotrophe Lateralsklerose lassen auf eine Beteiligung von apoptotischen Prozessen in der Pathogenese schließen (Warner 1997; Savitz 2000; Yuan 2000).

2.1.5 Zelltod bei pathologischen Prozessen

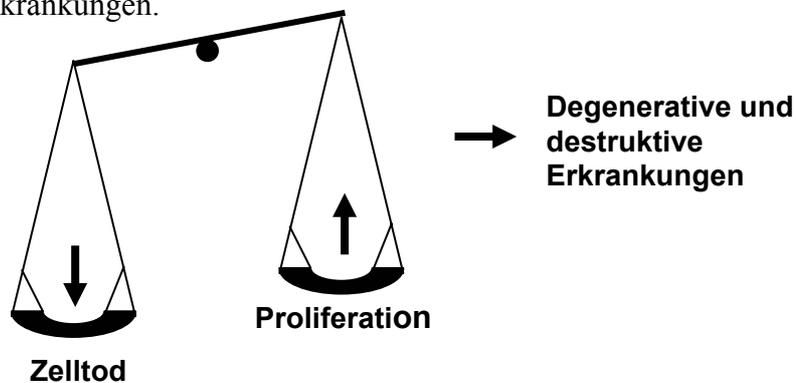
Zelltod und Zellproliferation stehen im Organismus wie auch in einzelnen Organen und Funktionssystemen in einem fein regulierten Gleichgewicht. Wird diese Balance gestört, kann es auf allen Ebenen zur Entstehung von Erkrankungen führen:



Ein Überwiegen der Proliferationsrate gegenüber der Zelltodrate kann zu lokalen und systemischen, malignen Erkrankungen, ferner zu metabolischen, entzündlichen und einigen Autoimmunerkrankungen führen.



Übermäßiges Zelltodvorkommen hingegen ist die Grundlage für das Entstehen einer Vielzahl von degenerativen, hämatologischen, autoimmunen, Ischämie-bedingten, Toxin-vermittelten und entzündlichen Erkrankungen.



Eine Übersicht über die Bedeutung des Zelltodes bei verschiedenen Erkrankungen ist in der folgenden Tabelle zusammengestellt (Thompson 1995; Fadeel 1999; Robertson 2002):

Tabelle 2: Erkrankungen mit erhöhter bzw. erniedrigter Zelltodrate

Erhöhte Zelltodrate	Erniedrigte Zelltodrate
1. Maligne Erkrankungen	1. Maligne Erkrankungen
Solide Karzinome Leukämien Lymphome Maligne Gliome Sarkom Seminom	Solide Karzinome Leukämien Lymphome Maligne Gliome Sarkom Seminom
2. Hämatologische Erkrankungen	2. Prämaligne Erkrankungen
Aplastische Anämie Fanconi Anämie M. Hodgkin Myelodysplastische Syndrome Polyzytämia vera	Ataxia telangiectasia Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie Myelodysplastische Syndrome Xeroderma pigmentosum
3. Neurodegenerative Erkrankungen	
M. Alzheimer Amyotrophe Lateralsklerose Creutzfeld-Jakob Erkrankung Chorea Huntington M. Parkinson Retinitis pigmentosa Spinale Muskelatrophie	
4. Autoimmunerkrankungen	4. Autoimmunerkrankungen
Fulminante Hepatitis Graft-versus-host Erkrankung Hashimoto's Thyreoiditis Diabetes mellitus Multiple Sklerose Rheumatoide Arthritis Sklerodermie Sjögren's Syndrom Colitis ulcerosa	Systemischer Lupus Erythematodes Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome
5. Ischämische Läsionen	5. Atherosklerose
Ischämie und Reperfusion Niereninfarkt Myokardinfarkt Cerebraler Infarkt	
6. Toxin-induzierte Erkrankungen	6. Metabolische Erkrankungen
Alkohol induzierte Hepatitis Lungenfibrose Sepsis	Osteoporose M. Wilson M. Niemann-Pick
7. Bakterielle und virale Infektionen	7. Virale Infektionen
HIV Ebola Virus Chlamydia trachomatis Helicobacter pylori Neisseria meningitidis Salmonella typhimurium Shigella flexneri	Adenovirus Baculovirus Epstein-Barr-Virus Herpesvirus Poxvirus
8. Entwicklungsstörungen und Missbildungen	8. Entwicklungsstörungen und Missbildungen
9. Gemischte Erkrankungen	9. Apoptose während des physiologischen und vorzeitigen Alters
Traumatische Rückenmarksläsion Immunologische Tumorabwehr	M. Down Progerie Xeroderma pigmentosum
10. Trauma	

Maligne Tumoren

Bei der Tumorentstehung ereignet sich ein „Nettozuwachs“ an Zellen oder Gewebe. In der Homöostase von Proliferation und Zelltod bedeutet dies eine Verschiebung zugunsten der Proliferation. Grund dafür könnte entweder eine gesteigerte Proliferationsrate, eine erniedrigte Zelltodrate, ein Zusammentreffen beider Phänomene oder eine gleichsinnige Veränderung mit Überwiegen der Wachstumskomponente sein (Wyllie 1992; Thompson 1995; Fadeel 1999; Aotake 1999; Saikumar 1999; Reed 1999).

Im Modell der mehrstufigen Entwicklungssequenz von Tumoren, nach dem Mutationen an charakteristischen Genen für den Übergang von normalem Gewebe zu metaplastischem, dysplastischem und schließlich neoplastischem Gewebe verantwortlich sind, finden sich aktivierte Onkogene und supprimierte Suppressorgene, die eine Beschleunigung der Proliferationsrate bewirken (Fearon 1990; Wyllie 1999; Braithwaite 1999). Ebenso wird bei vielen Tumoren eine Mutation des p53-Gens beobachtet, wodurch die betroffenen Zellen die Fähigkeit verlieren, durch apoptotischen Zelltod zugrundezugehen (Fadeel 1999; Wagener 1999; Zörnig 2001).

Allerdings wurde wiederholt in verschiedenen Tumoren auch eine Diskrepanz zwischen der aus der zellulären Proliferationsrate errechneten und der tatsächlichen Wachstumsgeschwindigkeit vorgefunden (Cotter 1990; Kornbluth 1994). Diese Beobachtung lässt sich auf eine gesteigerte Apoptoserate zurückführen, die sich in allen Teilen, vom Rand bis ins Zentrum von kleinen wie großen Tumoren findet (Cotter 1990). Besonders häufig sind apoptotische Prozesse in Zellen, die sich an Rändern nekrotischer Foci befinden, wobei milde Ischämie ein auslösender Stimulus sein könnte. Als weitere Apoptose-induzierende Faktoren kommen in diesem Kontext der von Makrophagen freigesetzte Tumornekrosefaktor α (TNF α), wie auch der Angriff von Tumorzellen durch zytotoxische T-Lymphozyten in Frage (Kerr 1994). So zeichnen sich Tumoren mit einer hohen Infiltrationsrate von Lymphozyten durch eine außerordentlich hohe Apoptosehäufigkeit aus (Cotter 1990). Ebenfalls massiv gesteigerte Zelltodhäufigkeiten finden sich in spontan regredienten Tumoren (Papac 1996).

Letztlich ist die Bedeutung des Zelltodes – und vornehmlich der Apoptose – für die Karzinogenese und die Unterhaltung des Tumors differenzierter zu betrachten. Sowohl die

Art wie auch die Häufigkeit seines Auftretens variiert zwischen Zell- und Gewebetypen und verändert sich im Laufe der Tumorentwicklung. Dies erscheint auf dem Hintergrund so unterschiedlicher Prozesse wie der Hyperplasie von Zellen, der neoplastischen Transformation, des Tumorwachstums, der beginnenden Neovaskularisation und schließlich der Metastasierung verständlich (Fadeel 1999).

Aotake *et. al.* (1999) untersuchten das Ausmaß und das Verhältnis der Proliferation, der Apoptose und der Neubildung von Gefäßen (Angiogenese) bei der Adenom-Karzinom-Sequenz während der kolorektalen Karzinogenese: Sie beobachteten eine deutliche Steigerung der Proliferationsrate am Übergang von normalen Epithelien zu Adenomen mit geringen Dysplasien. Als Gegenreaktion stieg die Apoptoserate steil an; möglicherweise konnten viele der Zellen in einer Umgebung mit Mangel an Nährstoffen, Sauerstoff und Wachstumshormonen im ungezügelt proliferierenden Gewebe nicht überleben. Deshalb kann sich das Wachstum von frühen Adenomen trotz einer hohen Proliferationsaktivität über Jahrzehnte erstrecken.

Hingegen wachsen Adenome mit starken Dysplasien deutlich schneller. Zwei synergistische Effekte tragen nach Aotakes Beobachtungen dazu bei: Im Übergang von Adenomen mit geringen zu starken Dysplasien nimmt die Proliferationsrate nochmals zu, während die Apoptoserate stark abfällt. Genetische Veränderungen, wie Mutationen des *ras*-Gens oder des Adenomatösen Polyposis Coli (APC)-Gens könnten dafür eine Rolle spielen. Außerdem beginnt bei diesem Schritt der Tumorentwicklung eine umfassende Ausbildung von neuen Blutgefäßen. Aufgrund der besseren Blutversorgung werden die oben genannten Stimuli für die Apoptoseinduktion reduziert und führen zu einer weiteren Senkung der gegenregulierenden Zelltodrate. Beim weiteren Fortschreiten der Erkrankung zu manifesten Karzinomen kommt es zu einem leichten Wiederanstieg der spontanen Apoptoserate bei gleich bleibend maximaler Proliferationsrate und nochmals gesteigerter Gefäßdichte (Aotake 1999).

Metastasierte Zellen schließlich haben Mechanismen entwickelt, unabhängig von für sie physiologische Umweltfaktoren zu überleben, wodurch sie eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose aufweisen. Darüber hinaus können sie oft die Initiierung oder Ausführung des

apoptotischen Programms direkt unterbinden. Dazu werden sie durch genetische Mutationen wie des Bcl 2-Gens (siehe unten) befähigt (Thompson 1995).

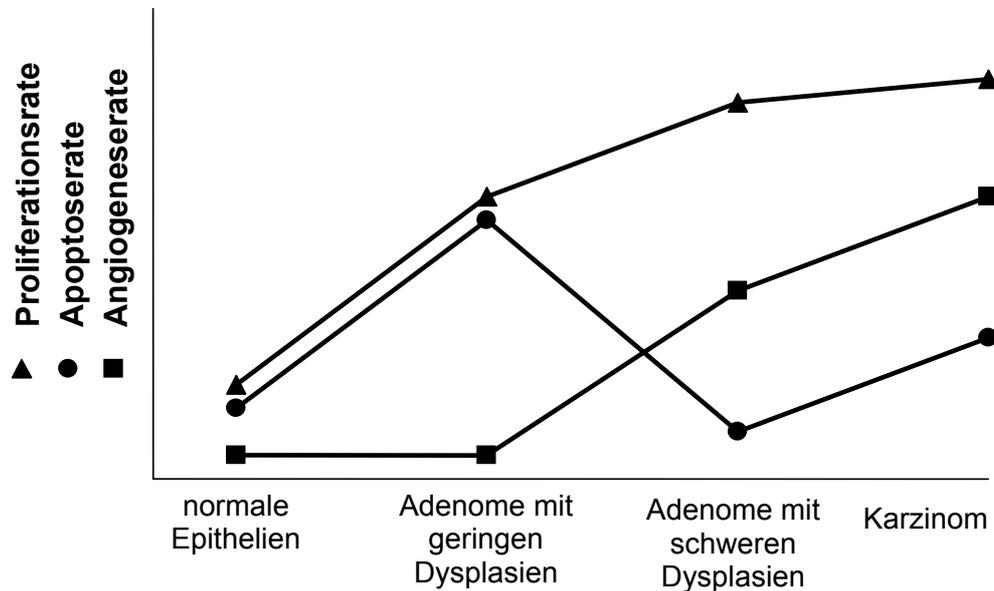


Abbildung 14: Kolorektale Karzinogenese (modifiziert nach Aotake 1999)

Autoimmunerkrankungen

Autoimmune Reaktionen werden durch Lymphozyten hervorgerufen, die körpereigene Antigene als fremd erkennen, jedoch bei der negativen Selektion während ihrer Reifung im Knochenmark und Thymus nicht eliminiert wurden. Ferner werden aktivierte Immunzellen dafür verantwortlich gemacht, die nach erfolgreicher Immunantwort sich dem AICD (activation induced cell death) entziehen, der für die Reduktion der aktivierten Zellen und der Begrenzung der Immunreaktion sorgt (Krammer 1997, 2000a,b).

Häufig werden von diesen Zellen nukleäre Autoantigene erkannt, die im Falle von apoptotischem Zelluntergang in Membranbläschen verpackt, abgesondert und von Makrophagen abgebaut werden. Allerdings ist bei autoimmunen Erkrankungen oft die Aktivität von Makrophagen eingeschränkt, so dass viele apoptotische Körperchen und unverpackte Bestandteile abgestorbener Zellen als unentsorgter Abfall sich lokal ansammeln oder im Blut zirkulieren. Als Immunogene stimulieren sie die Induktion weiterer autoreaktiver Lymphozyten und fördern die Entstehung von Autoimmunerkrankungen (Bell 1990; Kornbluth 1994; Pisetzky 1997; Amoura 1997, 2000; Degen 2000).

Akute und chronische neurologische Erkrankungen

Während der embryonalen Entwicklung des Nervensystems von Wirbeltieren gehen etwa 50% der Neuronen zugrunde. Dabei spielt weniger die genetische Determinierung als vielmehr der Wettbewerb um die limitierten Wachstumsfaktoren eine Rolle. Im weiteren Verlauf des Lebens nimmt die Verlustrate an Nervenzellen ab. Allerdings können die dann absterbenden Zellen nicht oder nur in begrenztem Umfang ersetzt werden, wodurch die Zellverluste durch funktionelle Ausfälle offenbar werden (Savitz 1998).

Während ursprünglich im besonderen der Einfluss der Nekrose bei hypoxisch-ischämischen Erkrankungen, Traumata und anhaltenden epileptischen Anfällen diskutiert wurde (Wyllie 1980a), tritt zunehmend die Bedeutung von apoptotischen Prozessen vor allem bei chronischen, neurodegenerativen Erkrankungen und Hirntumoren, aber auch bei akut pathologischen Zuständen (Dirnagl 1999, Savitz 1998; Mattson 2001) zutage: Bei ischämischen Ereignissen wird beispielsweise der zunächst nur geringfügigen und reversiblen Schädigung der Infarkt-umgebenden Penumbra – sowohl in der Ischämie-Phase wie auch in der Reperfusionphase – große Wichtigkeit für die langfristige Prognose der verbleibenden Funktionsfähigkeit beigemessen (Dirnagl 1999). Zellen, die in diesen kritischen Zeiträumen nicht effektiv repariert werden können, gehen häufig auf apoptotischem Weg zugrunde. Ursächlich kommen für die Auslösung des aktiven Zelltodes mehrere Mechanismen in Frage, besonders oxidativer Stress, Glutamat-Toxizität und Dysregulation des Kalzium-Gleichgewichts (Savitz 1998).

Bei chronisch neurodegenerativen Erkrankungen erfolgt ein übermäßiger Abbau von physiologischerweise funktionell koordinierten und kooperierenden Neuroneneinheiten. So wird bei der Alzheimer'schen Erkrankung Apoptose durch β -Amyloid unter anderem in der hippocampalen Region induziert. Bei der Parkinson'schen Erkrankung sind Sauerstoffradikale und Dopamin für die Apoptose-Auslösung in den dopaminergen Neuronen der Substantia nigra verantwortlich (Savitz 1998).

Virale und bakterielle Infektionen

Die Rolle der Apoptose bei viralen Infektionen besitzt zwei Komponenten. Sie spielt einerseits eine Rolle während der antiviralen Abwehrreaktion des Körpers und trägt

andererseits als Pathogen-vermittelter Mechanismus zur Schwächung des Immunsystems und Aufrechterhaltung der Infektion bei. Der Einfluss der beiden Aspekte variiert ja nach Viruserkrankung (Fadeel 1999).

Die Spitze der Infektionsabwehr bilden zytotoxische T-Zellen, die durch Oberflächenantigene vermittelt in infizierten Zellen Apoptose auslösen können. Allerdings haben einige Virustypen dagegen Vorkehrungen getroffen. Nach Befall der Wirtszelle wird diese durch so genannte IAPs (inhibitors of apoptosis proteins) vor dem Zelltod bewahrt. Andererseits profitieren bestimmte Viren von der Apoptose-Induktion der Wirtszelle gegen Ende des viralen Zyklus, da sich die Freisetzung der viralen DNA dadurch erleichtert und die Infektiosität erhöht – wie beispielsweise bei Ebola-Virus-Infektionen, die mit massiver intravasaler Apoptose einhergehen (Granville 1998; Fadeel 1999).

Infektionen mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) sind durch den Konzentrationsabfall der CD4 T-Helferzellen gekennzeichnet. Sowohl für CD4- wie auch für CD8-Zellen ist eine erhöhte Sensibilität für apoptotischen Zelltod beschrieben, die mit dem Krankheitsverlauf in Zusammenhang stehen soll (Ameisen 1994, 1995; Fadeel 1999). Allerdings wurde *in vivo* Apoptose vor allem in nicht infizierten „Bystander“-Zellen beobachtet, während der Anteil der apoptotischen, infizierten Zellen nur gering war. Antiapoptotische Therapiestrategien bewirkten dagegen eine Vermehrung der Virusproduktion und eine persistierende Verschlechterung des Krankheitszustandes (Fadeel 1999).

Auch bakterielle Erreger aktivieren das Immunsystem, dessen Zellen diese zu lysieren oder auf apoptotischem Wege zu eliminieren versuchen. Jedoch verwenden auch die Bakterien selbst Apoptose-auslösende Angriffsstrategien: So induzieren *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* und *Yersinia pseudotuberculosis* in Makrophagen Apoptose, was für die Entstehung der Entzündungsreaktion, das Überleben der Bakterien und das Entkommen vor der Immunantwort grundlegend sein könnte. Auf ähnlichem Weg erzeugen *Helicobacter pylori*-Bakterien chronische Gastritiden und peptische Ulzerationen, indem sie apoptotische Prozesse in den Epithelzellen des Magens und Darms anstoßen und dadurch eine Immunantwort provozieren (Fadeel 1999).

2.1.6 Genetische Regulierung des apoptotischen Zelltods

ced 3, ced 4 und ced 9

Die ersten Erkenntnisse über die genetische Regulierung des programmierten Zelltods in Form von Apoptose stammen aus Untersuchungen der Nematode *C. elegans*. Bei ihr wurden mehr als 10 Gene identifiziert, die Einfluss auf a) die Entscheidung einer Zelle zu sterben, b) die Ausführung des Selbstmordprogramms, c) die Einverleibung durch Makrophagen und Nachbarzellen und letztlich d) den Abbau in diesen Zellen nehmen.

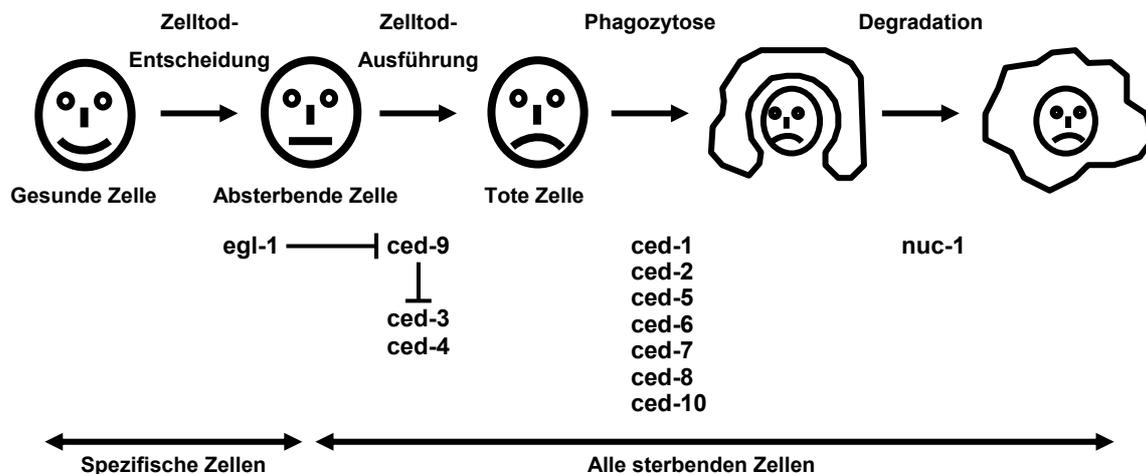


Abbildung 15: Genetische Beeinflussung des Zelltodvorgangs bei *C. elegans* (modifiziert nach Steller 1995)

Während nur wenige Gene in spezifischen Zellen den ersten Schritt beeinflussen, wirken die Mehrzahl der Gene bei der Ausführung des Zelltods und der anschließenden Phagozytose mit und sind in allen von der Apoptose betroffenen Zellen vorzufinden. Drei der Gene einschließlich der von ihnen kodierten Proteine sind von besonderer Bedeutung: Die Aktivität der *cell death*-Gene *ced 3* und *ced 4* ist notwendig für die Zelltodausführung in allen somatischen Zellen, *ced 9* schützt die Zellen vor dem Untergang (Ellis 1986; Hengartner 1992; Steller 1995; Robertson 2002).

Ced 3, *ced 4* und *ced 9* stehen in einer fein abgestimmten Balance, wobei *ced 9* als Inhibitor von *ced 4* agiert, um die Zelltoddurchführung durch *ced 3* zu verhindern (Golstein 1997). Mutationen mit Funktionsverlust in *ced 3* oder *ced 4* führen zu einer Unfähigkeit der Zelle, ihr Selbstmordprogramm zu aktivieren; rascher Zelltod hingegen ist die Folge von Mutationen in *ced 9*. Als zusätzliche Komponente dieses Aktivierungsweges wurde das „*egg laying defective 1*“-Gen (*egl 1*) identifiziert, welches hemmende Wirkung auf *ced 9* ausübt und somit zur Apoptoseauslösung beiträgt (Conradt 1998; Metzstein 1998; Fraser 1999).

Die Bcl 2-Familie

Die Bedeutung der Bcl 2-Familie (B-Cell Lymphoma) wurde in folliculären Non-Hodgkin's-Lymphomen entdeckt. Bei dieser Erkrankung fungiert der Hauptvertreter, das Bcl 2-Gen, als Onkogen der t(14;18)-Translokation (Pegoraro 1984; Reed 1988).

Die Bcl-2 Proteine sind an der zytoplasmatischen Seite der Membranen von Mitochondrien, endoplasmatischem Retikulum und des Zellkerns lokalisiert. Durch Oligomerisierung sind sie in der Lage, Poren in der äußeren Mitochondrien-Membran zu bilden, durch die Ionen ins Zytosol gelangen können (Green 1998). Überexpression von Bcl 2 bietet Zellen Schutz gegen die Auslösung des physiologischen wie auch des durch externe Faktoren induzierten Zelltods. Zu diesen zählen Chemotherapeutika, γ - und UV-Bestrahlung, Hitzeschock, freie Radikale, Wasserstoffperoxid, p53, Tumor-Nekrose-Faktor, Kalzium, Entzug von Wachstumsfaktoren, Hypoxie und die konstitutive Aktivierung des myc-Gens (Saikumar 1997; Granville 1998; Wagener 1999).

Zur Bcl 2-Familie gehören weitere strukturverwandte Proteine, die Apoptose-fördernde oder -hemmende Eigenschaften aufweisen. Zum engeren Kreis der anti-apoptotischen Mitglieder, die bis zu vier der Bcl-2 homologen Domänen (BH1-4) besitzen, werden neben Bcl 2 Bcl-X_L, Bcl-W und ced-9 gerechnet; die pro-apoptotischen Verwandten werden in die Bax-Gruppe mit mehreren BH-Domänen und die „reine“ BH3-Gruppe unterteilt. Deren wichtigste Vertreter sind Bax und Bak (Bax-Gruppe) sowie Bcl-X_S, Bik, Bad, Bim, Noxa und egl-1 (BH3-Gruppe) (Kroemer 1997; Adams 1998; Fadeel 1999, Huang 2000). Für die Apoptose-Stimulation benötigen die Mitglieder der BH3-Gruppe die Zusammenarbeit mit mindestens einem Angehörigen der Bax-Gruppe. Letztere sind konstitutiv für die Aktivierung des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs (Robertson 2002).

c-Myc

Die Expression des c-myc-Gens hat je nach Zelltyp und Differenzierungsstatus unterschiedliche Auswirkungen auf das Schicksal einer Zelle. Das im Zellkern lokalisierte Onkogen wird vor allem in proliferierenden Zellen exprimiert. Das c-myc-Protein bewegt die Zelle auch ohne die Einwirkung von externen Mitogenen, in den mitotischen Zellzyklus einzutreten (Evan 1998), und regt somit die Zellproliferation an. Die Wirkung von c-myc

wird noch verstärkt durch das Vorhandensein weiterer proliferativer Komponenten wie Bcl 2. Lymphome, die beide Gene enthalten, zeichnen sich durch besondere Aggressivität und schnelles Wachstum aus (Wagener 1999).

Andererseits wurden auch pro-apoptotische Eigenschaften von c-myc gefunden. Zusammen mit Apoptose-stimulierenden Faktoren scheint c-myc die Aus- und Durchführung des Zelltods zu beschleunigen. Somit agiert c-myc als bipolarer Einflussfaktor, der Zellen sensibler für Proliferation und Apoptose macht. Zusätzliche Stimulatoren oder Inhibitoren entscheiden, wohin sich das Schicksal der Zelle dann wendet (Evan 1998).

P53

Das p53 Protein – auch als „Wächter des Genoms“ titulierte (Lane 1992) – reguliert die zelluläre Antwort auf endogene und exogene DNA-Schädigungen, indem es 1) das Fortschreiten einer Zelle im Zellzyklus unterbricht, um die Reparatur der Läsion zu ermöglichen, 2) die Zelle in einen ständigen Zellzyklusarrest verbannt, oder 3) bei gravierenderen Schäden die Einleitung der Apoptose bewirkt. Sein Funktionsradius umschließt somit sowohl Proliferation, Differenzierung, Alterung, Zellzyklusarrest und Tod einer Zelle (Levine 1997; Webb 1997; Wagener 1999; Albrechtsen 1999; Vousden 2000; Woods 2001).

Mutierte p53-Gene finden sich in etwa der Hälfte aller menschlichen Tumore in mehr als 50 verschiedenen Zellen und Gewebetypen. Sie betreffen zumeist nur ein Allel und führen zu einem Funktionsausfall des Gens (Levine 1997). Somit scheint p53 als Tumorsuppressorgen zu wirken und eine zentrale Rolle während der Karzinogenese zu spielen.

Der Verlust wie auch die Mutation des p53-Gens ist von großer Bedeutung im Mehrschritt-Entstehungsmodell von Tumoren. Schon die Mutation eines p53 Allels kann deletäre Folgen haben: Mutante p53 Monomere können die für die Funktion notwendige Oligomerisierung der Wildtyp-Monomere unterbinden und sie in eine mutante Konformation zwingen; sie üben somit eine dominant negative Wirkung auf die p53-Funktion aus. Daneben aktivieren p53-Mutanten auch Gene, deren Produkte Proliferation und Wachstum von Tumoren fördern, unter anderem Gene, die für den EGF (epithelial growth factor)-Rezeptor, FGF-2 (fibroblast growth factor) und VEGF (vascular endothelial growth factor) kodieren (Wagener 1999).

2.1.7 Signalwege des apoptotischen Zelltods

Externe Stimuli können ihre Wirkung in der Zelle direkt an die entsprechenden Effektorstellen oder indirekt über an der Zelloberfläche befindliche Rezeptoren vermitteln. Über mehrere Wege werden die Apoptose-auslösenden Signale zu den ausführenden Endonukleasen geleitet. Für einige Stimuli wurde sowohl eine direkte wie auch eine indirekte Signalübertragung nachgewiesen.

Rezeptor-vermittelte Apoptoseinduktion

Im Laufe der letzten Jahre wurden mehrere Oberflächen-Rezeptoren und Liganden identifiziert und charakterisiert, die externe apoptotische Signale übermitteln können. Im Mittelpunkt stehen die Rezeptoren der Tumornekrosefaktor (TNF)-Familie, deren Mitglieder mit den entsprechenden Liganden in der folgenden Tabelle aufgelistet sind (Ashkenazi 1998; Krammer 2000a).

Tabelle 3: Apoptose-vermittelnde Rezeptoren und ihre Liganden

Rezeptor	Synonym	Ligand
CD 95	Fas oder APO 1	CD 95 L
TNFR1	p55 oder CD 120a	TNF und Lymphotoxin a
DR 3	Apo 3, WSL-1, TRAMP oder LARD	APO 3 L (auch Tweak)
DR 4 und DR 5	Apo 2, TRAIL-R2, TRICK 2 oder Killer	APO 2 L (auch TRAIL)
OPG		TRANCE (auch RANKL / OPGL)
LT β -R		Lymphotoxin β
CD 40		CD 40 L (auch TRAP / gp39)
CD 30		CD 30 L
CD 27		CD 27 L (auch CD70)
4-IBB		4-IBB L
OX 40		OX 40 L (gp34)
NGF-R1		NGF

Außerdem kann Apoptose durch die Wechselwirkung von Zellen mit Granzymen und Perforin sowie durch Vermittlung des Sphingomyelin-Ceramid-Systems ausgelöst werden (Lowin1995)

Die Rezeptoren der TNF-Familie sind glykosylierte Transmembranproteine. Sie bestehen aus einem extrazellulären Anteil, der aus zwei bis sechs cysteinreichen Domänen

zusammengesetzt ist, und einem intrazellulären Anteil. Dieser weist eine große Homologie bei allen Todesrezeptoren auf. Von struktureller Wichtigkeit für die Weiterleitung des Todessignals ist dabei eine etwa 80 Aminosäuren zählende intrazelluläre Domäne – die sogenannte Todesdomäne (DD = death domain) trägt. Neben transmembranen Rezeptoren existieren auch lösliche Rezeptoren, die durch Splice-Vorgänge entstehen (Nagata 1997; Krammer 2000a).

Das Prinzip der Rezeptoraktivierung besteht in einer Trimerisierung der Rezeptoren. Diese wird physiologischerweise durch die Bindung von Liganden, die ihrerseits schon in Trimeren vorkommen (Nagata 1995), oder agonistischen, stimulierenden Antikörpern ausgelöst. Dieser Vorgang ist sowohl bei den ersten beschriebenen Oberflächenrezeptoren Fas/Apo1/CD95, wie auch bei anderen Angehörigen der TNF-Familie beobachtet worden und bewirkt die Weiterleitung des Todessignals in das Zellinnere (Nagata 1997; Ashkenazi 1998; Krammer 1999, 2000a). Einige der Rezeptoren (wie CD 95) leiten Signale spezifisch an die Effektorkaskade der Apoptose weiter; andere (wie TNF-R1) können auch alternative intrazelluläre Signalwege (wie NF κ B und JNK/AP-1) aktivieren, die für die Immunantwort infolge von Infektionen und somit für das Überleben, die Differenzierung oder Proliferation von Zellen notwendig sind (Nagata 1997; Ashkenazi 1998).

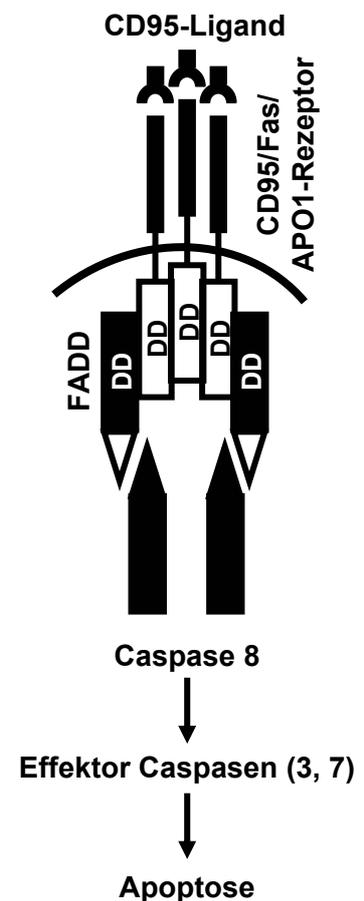


Abbildung 16: Rezeptoraktivierung bei Apoptose (modifiziert nach Ashkenazi 1998)

Die CD95-abhängige Apoptoseeinleitung spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der Homöostase innerhalb des Immunsystems, bei der Eliminierung von infizierten oder entarteten Zellen durch zytotoxische T-Zellen und beim Aktivierungs-induzierten Zelltods (AICD) zur Beendigung einer Immunantwort (Krammer 2000a,b). Auch Viren und neoplastische Zellen machen sich diesen Mechanismus zunutze: Durch eigene CD95-Liganden induzieren sie in den für sie gefährlichen Immunzellen Apoptose und gehen somit zum Gegenangriff über (Fadeel 1999; Igney 2000; Contreras 2000).

Weiterleitung des intrazellulären Signals

Da die intrazellulären Anteile der Todesrezeptoren keine eigene enzymatischen Funktionen besitzen, müssen weitere Proteine an die Todesdomänen der kreuzvernetzten Rezeptoren binden, um das Signal weiterzuleiten. Der Komplex aus durch Liganden aktivierten Rezeptoren und Rezeptor-assoziierten Signalmolekülen wird als „Tod induzierender Signalkomplex“ DISC (death inducing signalling complex) bezeichnet. Daran sind am Beispiel des CD95/Fas/APO1-Systems neben dem CD95-Rezeptor, dem Adaptermolekül FADD/MORT1 (Fas associated death domain) auch die Procaspase 8 beteiligt, die mit ihrer Todeseffektordomäne DED (death effector domain) an eine entsprechende DED von FADD/MORT1 bindet (Nagata 1997; Ashkenazi 1998; Granville 1998; Krammer 2000a; Zörnig 2001).

Durch autokatalytische Spaltung wird das Zymogen (Proenzym) Procaspase 8 im DISC in die aktive Form Caspase 8 umgewandelt. Diese fungiert als Initiatorcaspase, da sie in der Lage ist, weitere Caspasen wie die Effektor-Caspase 3 zu spalten und zu aktivieren. Effektorcaspasen wiederum greifen verschiedene zelluläre Substrate, so genannte Todessubstrate, an und führen letztlich zum typischen morphologischen und biochemischen Vollbild der Apoptose (Kumar 1999; Krammer 2000a; Nagata 2000).

Aufgrund seiner zentralen Position in der Weiterleitung des Apoptose-Signals ins Zellinnere bietet sich der DISC, insbesondere durch die Rekrutierung und Aktivierung der Procaspase 8, als idealer Angriffspunkt für physiologische und pathologische Modifikatoren der Apoptose an: So konkurrieren so genannte FLIPs – FADD Like ICE Inhibitory Proteins, auch als Casper, I-FLICE, FLAME-I, CASH, CLARP, MRIT und Usurpin bezeichnet – mit der Procaspase 8 um die DED-Bindungsstellen am DISC. Wirkungsvoll für die Inhibition der Signalvermittlung werden FLIPs unter anderem von Viren in den infizierten Wirtszellen und ebenso in Tumorzellen eingesetzt, um sie vor der Elimination durch Immunzellen zu schützen und die Induktion von Apoptose zu verhindern (Krammer 2000a; Sartorius 2001).

Bei der im Falle einer erfolgreichen Caspase 8-Aktivierung kaskadenartigen Fortleitung des Zelltodsignals bedient sich die Zelle eines mehrschrittigen und damit fein regulierbaren Verfahrens:

Caspasen (Cysteine-dependent ASpartate-specific proteASEs) – spezielle Proteasen mit einer Cystein-Aminosäure im aktiven Zentrum, welche ihre Substrate spezifisch nach Aspartatsequenzen schneiden – spalten und aktivieren nachgeordnete Procaspasen, die dann ihrerseits weitere Caspasen proteolytisch aktivieren, bis das Signal schließlich die Effektorcaspasen erreicht. Diese greifen dann an mehreren Stellen zelluläre Substrate an und führen zur schrittweisen, konzertierten Degradation der Zelle (Slee 1999; Hengartner 2000; Krammer 2000a).

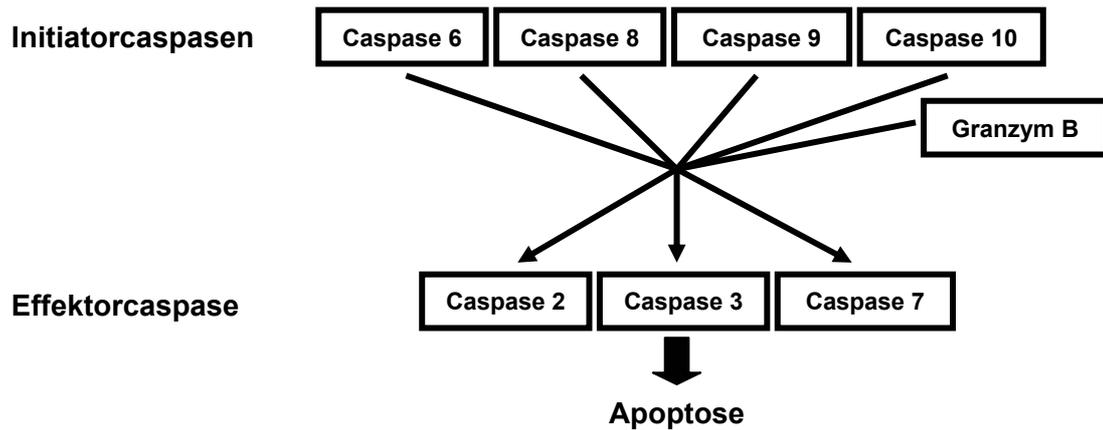


Abbildung 17: An der Apoptose beteiligte Caspasen (modifiziert nach Nicholson 1999)

Im Einzelnen sind als Ansatzpunkte, Regulationsmechanismen und Substrate der Caspasen zu nennen (Granville 1998; Wagener 1999; Samali 1999; Nicholson 1999):

- Spaltung von strukturellen Komponenten des Zytoskelett wie dem Actin, sowie von Bestandteilen der Intermediärfilamente und der Kernmembran wie Cytokeratinen und Laminen.
- Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche als Erkennungsmerkmal für phagozytierende Zellen.
- Aufhebung der Wirkung Apoptose-hemmender Proteine wie Bcl 2 und Bcl-x_L.
- Blockierung von Genen, die im Zellzyklus für die Reparatur von DNA-Schäden notwendig sind wie das MDM2- und das Retinoblastomgen.
- Inaktivierung einiger für die Stabilität, Unversehrtheit und Reparatur der DNA zuständigen Enzyme wie die Poly-(ADP-Ribose) Polymerase PARP, die DNA-PK und der DNA-Replikationsfaktor 140.
- Abspaltung des ICAD (inhibitor of the caspase-activated DNase) und Aktivierung der CAD (caspase-activated DNase), die das Chromatin in die charakteristischen oligonukleosomalen Fragmente spaltet (Simali 1999, Wagener 1999).

Da die Signaltransduktion für die Apoptose-Auslösung klassischerweise über die Caspasenkaskade erfolgt, wurde bereits eine neue Apoptose-Definition in Abhängigkeit der Caspasen-Aktivierung erwogen (Samali 1999). Allerdings wurde inzwischen auch eine Caspase-unabhängige Apoptose-Induktion beschrieben (Kitanaka 1999; Vaux 1999; Meng 2000; Kolenko 2000). Außerdem spielen in einigen Zellsystemen auch andere Mechanismen mit Beteiligung von Cathepsinen, Serin- oder anderer Proteasen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der intrazellulären Zelltodinformation (Leist 2001).

Mitochondrien

Trotz der morphologischen und oft auch funktionellen Unversehrtheit der Mitochondrien sind sie aktiv in die apoptotischen Prozesse eingebunden. Durch Öffnung kleiner Poren der äußeren Mitochondrienmembran – insbesondere durch proapoptotische Mitglieder der Bcl-2-Familie – kann es zum kurzfristigen Zusammenbruch des Transmembranpotentials kommen. Dies führt zur Modifikation von großen, transmembranösen PT (permeability transition)-Poren, durch die dann mitochondriale Proteine bis zu einer Größe von 1,5 kDa ins Zytoplasma gelangen können. Darunter befinden sich auch Caspase-aktivierende Proteine wie Cytochrom C und der Apoptose-induzierende Faktor AIF (Green 1998; Hengartner 2000; Krammer 2000a).

Das normalerweise im Intermembranspalt der Mitochondrien lokalisierte Cytochrom C, ein essenzieller Bestandteil der Atmungskette, aggregiert im Zytosol mit dem zytoplasmatischen APAF-1 (apoptosis activating factor 1) – dem Homolog zu *ced 4* in *C. elegans* – und ATP zu einem Komplex, der als „Apoptosom“ bezeichnet wird. An diesen bindet Procaspase 9 und wird in den aktiven Zustand als Caspase 9 überführt. Als solche kann sie dann weitere Effektorcaspasen wie die Caspase 3 aktivieren (Krammer 2000a; Robertson 2002).

AIF kann im Zytoplasma durch seine proteolytische Fähigkeit direkt Caspase 3-ähnliche Caspasen spalten und aktivieren. Dadurch induziert AIF indirekt die Fragmentierung der DNA im Zellkern. Daneben kann AIF auch Caspasen-unabhängig und direkt die Spaltung von DNA in oligonukleosomale Fragmente bewirken. Außerdem ist AIF an der Kondensation des Chromatins sowie die Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Plasmamembran beteiligt (Susin 1999; Krammer 2000a; Joza 2001).

Die Regulation der Signalwege

Für die Rezeptor-vermittelte Apoptoseauslösung und -durchführung wurden einige zentrale, allen Zellen gemeinsame Wegstrecken der Signalübermittlung identifiziert und einige variable, je nach Zelltyp und auslösendem Agens unterschiedliche Abschnitte beschrieben. Zu den gemeinsamen zählen die Bildung des DISC aus trimerisierten Rezeptoren, FADD und der Initiator-Procaspase 8 sowie die Endstrecke der Effektor-Caspasen, im besonderen Caspase 3, die zur Aktivierung von Zellstruktur- und Kern-spaltenden Proteasen führt. Dazwischen fächern sich drei variablen Abschnitte auf:

1. die direkte Aktivierung der Caspasenkaskade
2. die Einbindung der Mitochondrien mit Freisetzung von Cytochrom C
3. die Aktivierung der Mitochondrien und Freisetzung von AIF

Nach dem Weg, den sie für die Apoptose-Ausführung einschlagen, können zwei Zellentypen unterschieden werden (Scaffidi 1998; Kramer 2000a,b):

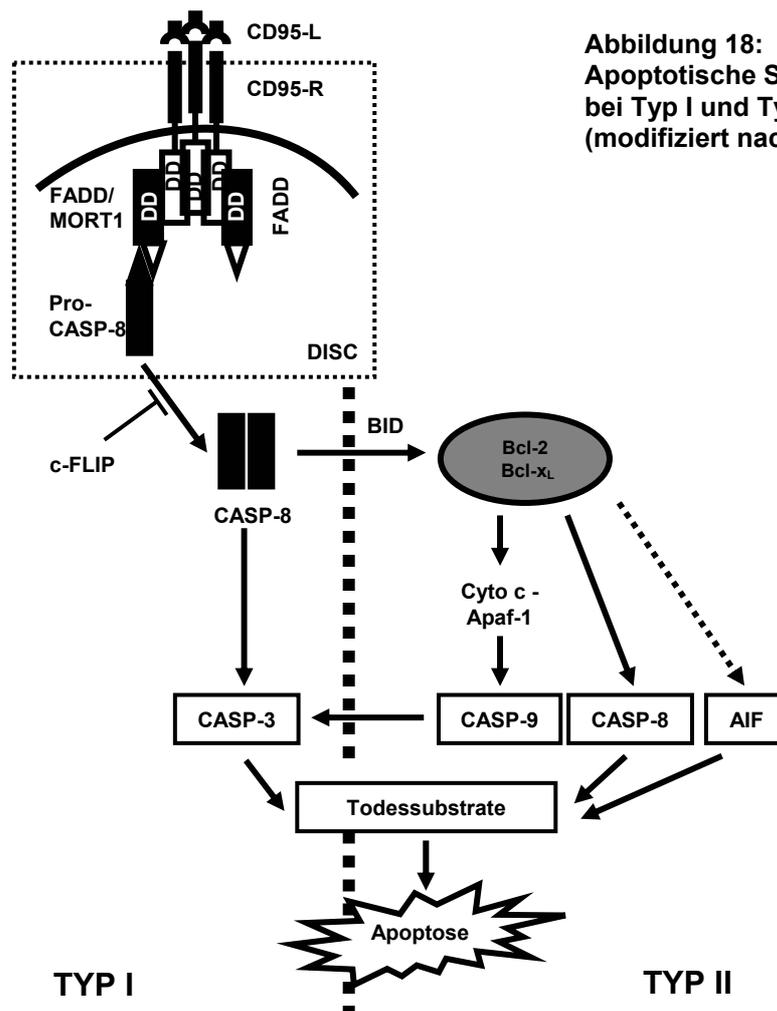


Abbildung 18:
Apoptotische Signalwege
bei Typ I und Typ II-Zellen
(modifiziert nach Kramer 2000a)

- a) Zellen des Typs I zeichnen sich durch eine schnelle DISC-Bildung und Aktivierung der Caspase 8 aus. Diese ist offenbar in so großen Mengen vorhanden, dass sie sowohl die Mitochondrien wie auch die Caspase-Kaskade einschließlich der Effektorcaspasen auf direktem Weg zu aktivieren vermag (Scaffidi 1998; Krammer 2000a,b; Sartorius 2001).
- b) Bei Zellen des Typs II erfolgt die DISC-Bildung und Aktivierung der Caspase 8 nur zögerlich. Sie reicht nicht aus, um die Caspasen-Kaskade direkt anzustoßen. Zur Verstärkung des Signals wird zunächst ein Mitglied der Bcl 2-Familie namens BID gespalten und aktiviert, welches wiederum eine Aktivierung der Mitochondrien bewirkt. Nach Freisetzung von Cytochrom C, Bildung des Apoptosoms mit APAF-1, ATP und Procaspase 9 werden dann sowohl die Effektor-Caspase 3 wie auch Caspase 8 aktiviert, die über eine erneute Spaltung von BID den Verstärkerkreislauf über die Mitochondrien in Gang hält (Scaffidi 1998; Krammer 2000a,b; Sartorius 2001).
- c) Daneben gibt es noch einen durch AIF vermittelten Apoptose-induzierenden Signalweg, der die typischen morphologischen Charakteristika der Apoptose caspaseabhängig und -unabhängig hervorrufen kann (Scaffidi 1998). Dieser Signalweg ist besonders bedeutsam für die Morphogenese während der gesamten embryonalen Entwicklung (Joza 2001).

Weitere Signalwege

Im Rahmen der Immunabwehr können zytotoxische T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen in Bakterien, Virus-infizierten Zellen, Parasiten und Tumorzellen auch über nicht-rezeptorvermittelte Signalwege Apoptose induzieren, beispielsweise durch die Freisetzung von Perforinen und Granzymen, die in intrazellulären Granula gespeichert werden.

Perforine lagern sich an Phosphorylcholin-Endigungen von Lipidmembranen an und bilden in der Zielzelle transmembranöse Kanäle. Aufgrund des osmotischen Effekts, des massiven Kalzium-Einstroms und des zellulären Energieverlust wird die Zelle schließlich lysiert. Bei nur begrenzter Induktion von Perforin-Kanälen tritt der Effekt von eingeschleusten Proteasen wie den Granzymen in den Vordergrund (Lowin 1995).

Granzyme sind Serinproteasen, die durch Endozytose, über Thrombinrezeptoren oder durch transmembranöse Kanäle Zugang zur Zielzelle gewinnen. Im Zytoplasma nehmen die Granzyme direkt Einfluss auf die proteolytische Caspasenkaskade: Granzym A führt zu einer Aktivierung der Caspase 8 und zu einer langsamen Fragmentierung der DNA. Granzym B bindet neben der Initiatorprocaspase 8 an Procaspase 3 und weitere Effektor-Procaspasen (2, 7) und bewirkt durch deren Aktivierung eine schnellere Spaltung des Chromatins (Lowin 1995, Saikumar 1999).

Auch membranbildende Lipide selbst können die Überleitung apoptotischer Signale ins Zellinnere vermitteln. Durch rezeptorabhängige Hydrolyse des Sphingomyelins entsteht Ceramid, welches die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, Kinasen, Phosphatasen, Phospholipasen sowie die Expression von Genen im Rahmen von inflammatorischen Prozessen, Zelldifferenzierung und Zelltod moduliert. Außerdem aktiviert Ceramid – wahrscheinlich unter Einbeziehung der Mitochondrien – an der Apoptose beteiligte Effektorcaspasen (Rowan 1997; Smyth 1997; Granville 1998; Green 1998; Poremba 1999).

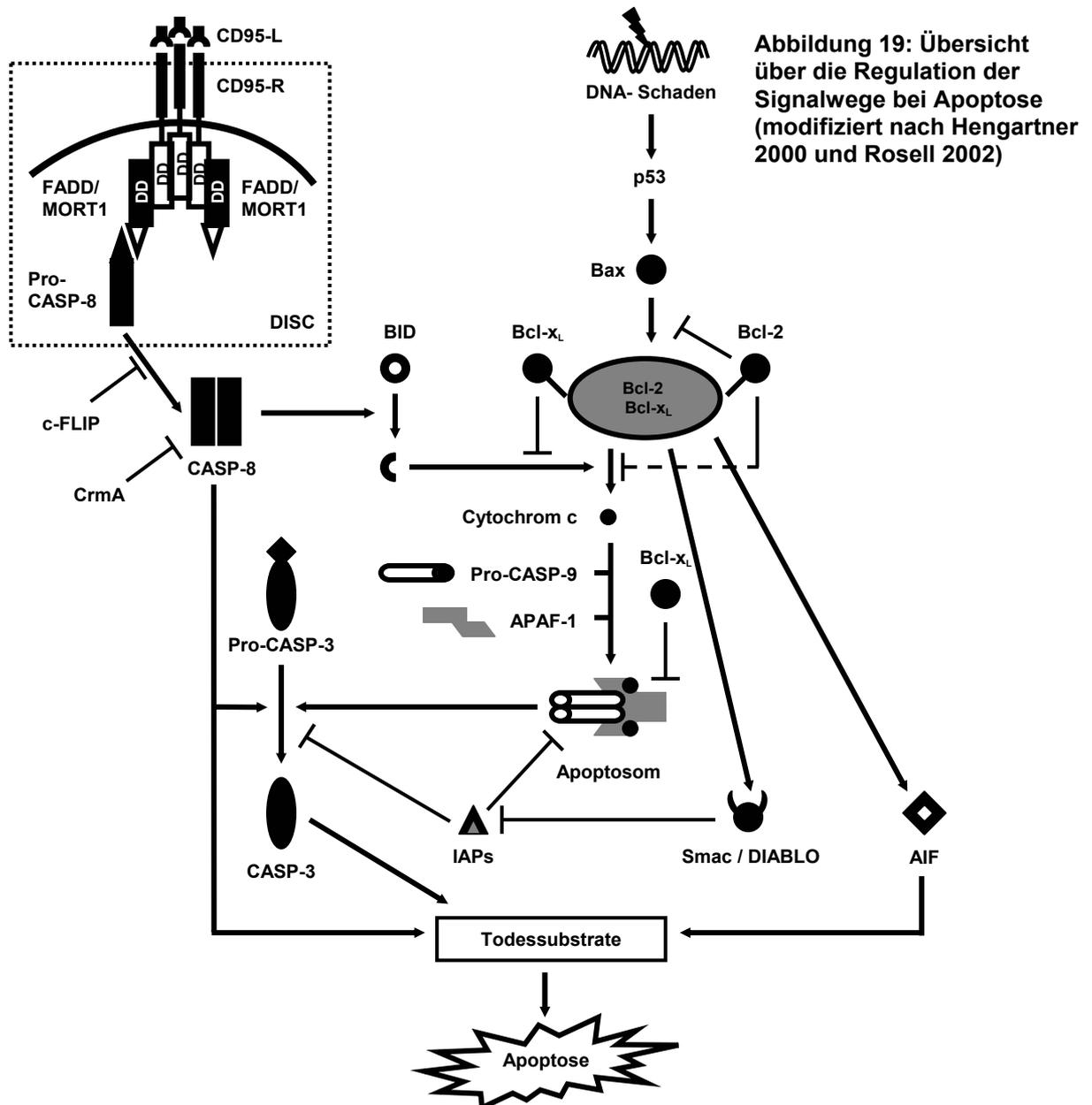
Inhibitoren der Signalwege

Bei der intrazellulären Weiterreichung des Apoptose-Signals können vielfältige Inhibitoren regulierend eingreifen. Grundsätzlich kann zwischen Inhibitoren der Initiator-Caspasen, des mitochondrialen Aktivierungswegs sowie der Effektor-Caspasen unterschieden werden.

Als prominentester Vertreter der Inhibitoren von Initiator-Caspasen hemmt das von Kuhpockenviren synthetisierte CrmA (cytokine response modifier A) sehr effektiv die Wirkung der Caspasen 1 und 8 (Ekert 1999). Ähnlich wie die FLIPs im DISC setzt CrmA somit an einem zentralen Punkt der Signalübermittlung an und verhindert sowohl die direkte Weiterleitung an die Effektorcaspasen wie auch die indirekte Stimulierung der Mitochondrien über BID (Green 1998; Budihardjo 1999).

Mitochondriale Inhibitoren des Apoptosesignalwegs sind vor allem Angehörige der Bcl 2-Familie. Sie blockieren einerseits die Stimulierung der Mitochondrien durch das proapoptische Bax, die Bildung des transmembranösen PT-Kanals und die Freisetzung von Cytochrom C und AIF ins Zytosol und vereiteln außerdem im Zytoplasma die Rekrutierung der Procaspase 9 am Apoptosom (Granville 1998).

Zahlreiche Inhibitoren der Effektor-Caspasen sind als IAPs (inhibitors of apoptosis) zusammengefasst. Dazu zählen in menschlichen Zellen unter anderen XIAP (MIHA), c-IAP-1 (MIHB), c-IAP-2 (MIHC), NAIP und Survivin. Sie setzen an den aktivierten Caspasen 3 und 7 und am Apoptosom an und unterscheiden sich deutlich in ihrer inhibitorischen Wirkungsstärke. (Cecconi 1999; Budjhardjo 1999, Thornberry 1998; Jäättelä 1999; Deveraux 1999; Goyal 2001). Ihre Bedeutung liegt wahrscheinlich in der Feinregulierung des Apoptosesignals. Dies wird auch durch die Freisetzung von zusätzlichen IAP-regulierenden Proteinen wie Smac (second mitochondria-derived activator of caspases) und DIABLO (direct IAP-binding protein with low pI) (Hengartner 2000) während der Apoptose unterstützt. Im Folgenden sind die wichtigsten Komponenten der Apoptose-Signalwege einschließlich der inhibitorischen Ansatzpunkte illustriert:



2.1.8 Induktoren des apoptotischen Zelltods

Eine Vielzahl von Faktoren sind in der Lage, bei Zellen Schäden hervorzurufen und ihren Tod herbeizuführen. Ebenso mannigfaltig sind die Reparatur- und Schutzmechanismen, die für ein Überleben der Zellen sorgen (Thompson 1995).

Tabelle 4: Induktoren und Inhibitoren der Apoptose

Apoptose-Induktoren	Apoptose-Inhibitoren
1. Physiologische Aktivatoren	1. Physiologische Inhibitoren
1. TNF Familie Fas Ligand TNF 2. TGF β 3. Neurotransmitter Glutamat Dopamin NMDA 4. Wachstumsfaktorenmangel 5. Verlust von Matrix-Kontakten 6. Kalzium 7. Glucokortikoide	1. Wachstumsfaktoren 2. Extrazelluläre Matrix 3. CD40 Ligand 4. Neutrale Aminosäuren 5. Zink 6. Östrogen 7. Androgene
2. Läsions-vermittelnde Aktivatoren	2. Genetisch determinierte Inhibitoren
1. Hitzeschock 2. Virale Infektionen 3. Bakterielle Toxine 4. Onkogene (myc, rel, E1A) 5. Tumorsuppressorgene (p53) 6. Zytotoxische T-Zellen 7. Oxidanzien 8. Freie Radikale 9. Nährstoffmangel 10. Antimetabolite	1. Bcl 2 2. IAPs 3. Adenovirus E1B 4. Baculovirus p35 5. Baculovirus IAP 6. Cowpox Virus crmA 7. Epstein-Barr Virus BHRF1, LMP-1 8. Afrikan. Schweinefiebertivirus LMW5-HL 9. Herpesvirus γ 1 34.5
3. Therapeutische Agenzien	3. Pharmakologische Agenzien
1. Chemotherapeutische Medikamente Cisplatin Adriamycin Bleomycin Cytosin Arabinosid Methotrexat Vinchristin 2. Strahlentherapie (γ -Strahlen) 3. UV Bestrahlung 4. Hyperthermie	1. Calpain Inhibitoren 2. Cysteinproteasen-Hemmer 3. Tumor Promotoren PMA Phenobarbital α -Hexachlorocyclohexane
4. Toxine	
1. Ethanol 2. α -Amyloid Peptid	

Zellen benötigen eine Reihe von stimulierenden Signalen zum Überleben wie genügend Nährstoffe, Wachstumsfaktoren, Hormone sowie Kontakte zur extrazellulären Matrix und den umgebenden Zellen. Fallen diese Faktoren weg, wird das zelleigene Selbstmordprogramm aktiviert (Raff 1992; Grossmann 2002). Weitere Auslöser der Apoptose sind externe, zellschädigende Agenzien, die ihre Wirkung durch Oberflächenrezeptoren oder direkt am Zellkern vermitteln: Dazu zählen Viren und Bakterien, deren Toxine, Onkogene, Tumorsuppressorgene, zytotoxische T-Zellen, Oxidanzien, freie Radikale, Antimetabolite und Toxine (Thompson 1995; Granville 1998; Savitz 1998; Wagener 1999).

Die verschiedenen Apoptose-induzierenden Wege eröffnen auch Ansatzpunkte für therapeutische Optionen, wie Chemotherapie, Radiotherapie und Hyperthermie. Dabei reagieren Zelltypen je nach Zelltodspezifität und -sensitivität unterschiedlich auf verschiedene Dosierungen. Wie nebenstehende Tabelle zeigt, sind eine Vielzahl chemotherapeutischer Medikamente in der Lage, Apoptose in unterschiedlichen Tumorgeweben zu induzieren (Allen 1993; Hickman 1994; Mesner 1997b; Hannun 1997; Martin 1997; Savitz 1998; Seiter 1998; Tolis 1999; Mani 2000; Pace 2000; Eichhorst 2001; Milner 2002).

Die Wirkungsweise von Chemotherapeutika ist aufgrund der großen Anzahl an Substanzen, der Vielfalt ihrer Angriffspunkte, und der unterschiedlichen Reaktionen einzelner Zelltypen sehr komplex. Viele von

Tabelle 5: Apoptose-assoziierte Medikamente und Apoptose-sensitive Tumorarten

Apoptose-assoziierte Medikamente	Apoptose-sensitive Tumorarten
Adriamycin	Lymphome
Actinomycin D	Leukämien
Ara-C	Kleinzelliges Bronchial-Karzinom
L-Asparaginase	Nicht-kleinzelliges Bronchial-Karzinom
Bleomycin	HNO-Karzinom
BCNU	Ösophagus-Karzinom
Camptothecin	Magen-Karzinom
Chlorambucil	Kolorektales Karzinom
Cisplatin	Leberzell-Karzinom
Colchizin	Pankreas-Karzinom
Cyclophosphamid	Mamma-Karzinom
Dexamethason	Ovarial-Karzinom
Etoposid	Cervix-Karzinom
Fludarabin	Prostata-Karzinom
5'-Flourouracil	Seminom
Gemcitabine	Embryonale Karzinome
Hydroxyurea	Sarkom
Melphalan	Malignes Gliom
Methotrexat	Neuroblastom
Mitoxantron	
Nitrogen Mustard	
Oxaliplatin	
Paclitaxel	
Taxol	
Teniposid	
Topotecan	
Vinchristin	

ihnen induzieren in der Zielzelle Apoptose über das CD95/Fas/APO1-System beispielsweise Adriamycin, Cisplatin, Methotrexat, Cytarabin und Etoposid (Friesen 1999). In der weiteren Signaltransduktion spielen die Caspasenkaskade wie auch das Verhältnis von pro- und antiapoptotischen Faktoren im mitochondrialen Signalweg eine wesentliche Rolle für die Wirksamkeit vieler Medikamente. Ein Überwiegen der proapoptotischen Bax und Bcl-x_S steigert die Empfindlichkeit, die Überexpression von Bcl 2 und Bcl-x_L hingegen kann eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bewirken (Stoetzer 1996; Friesen 1999). Außerdem können Chemotherapeutika über die Aktivierung des Sphingomyelin-Ceramid-Systems zur Apoptose führen, ebenso über eine direkte Stimulation der Mitochondrien oder über eine DNA-Schädigung, die eine Aktivierung von p53 und Bax und sukzessive eine indirekte Induktion des mitochondrialen Wegs nach sich zieht (Gorczyca 1993b; Granville 1998).

Bei Behandlung mittels γ -Strahlen verursachen schon therapeutische Fraktionsdosierungen von 2 Gray meist DNA-Doppelstrang-, vereinzelt auch Einzelstrangbrüche. In der Folge wird p53 rasch hochreguliert und erwirkt einen Arrest des Zellzyklus zur Reparatur der Läsion. Übersteigen die Schäden jedoch die Reparaturkapazitäten, leitet p53 direkt oder wiederum durch Aktivierung von Bax auf mitochondrialem Weg die apoptotische Zelldegradation ein. Daneben können γ -Strahlen auch durch die Aktivierung des CD95/Fas/APO1-Systems oder des Sphingomyelin-Ceramid-Systems Apoptose induzieren (Belka 1998; Sheard 1999; Mirzaie-Joniani 2002). Ferner kann durch Hyperthermie – eine lokale Erwärmung des Gewebes auf 44°C – direkt eine Erhöhung der Zelltodrate erreicht sowie die Wirksamkeit von Zytostatika unterstützt werden. Dabei kann das Apoptosesignal durch Ceramid oder das CD95/Fas/APO1-System vermittelt werden (Dyson 1986; Barry 1990; Takano 1991; Kerr 1994; Sakakura 1998).

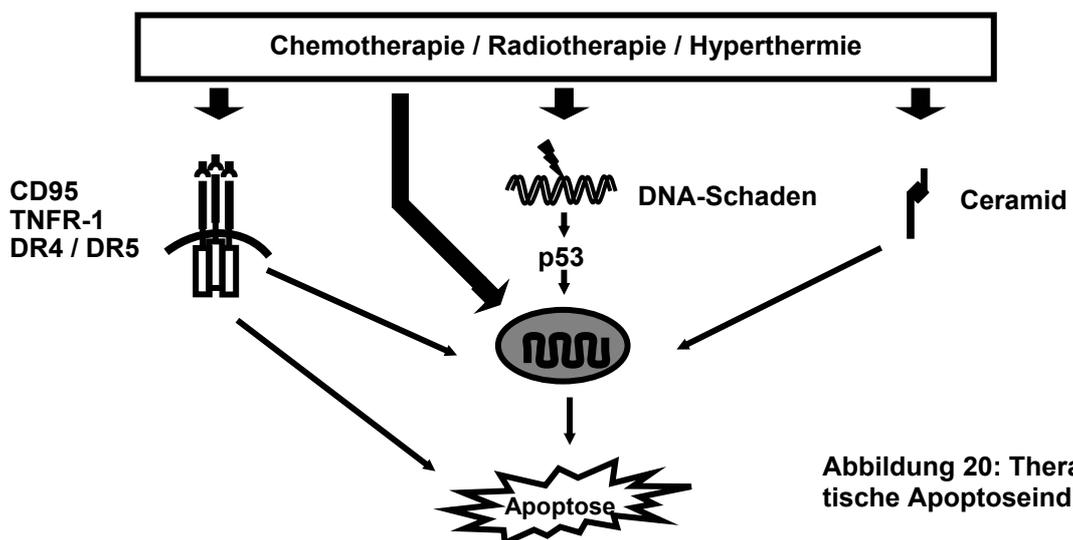


Abbildung 20: Therapeutische Apoptoseinduktion

2.1.9 Nachweisverfahren von Zelltod

Zur qualitativen Beschreibung und quantitativen Erfassung von Zelltodprozessen können eine Vielzahl von Methoden eingesetzt werden. Sie setzen an verschiedenen Stellen des Zelltodgeschehens an und weisen hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität zum Teil deutliche Unterschiede auf. Im Folgenden sind die gebräuchlichsten Methoden zum Zelltodnachweis mit ihren Anwendungsmöglichkeiten aufgelistet und ihre Eignung für qualitative und quantitative Untersuchungen sowie die dabei ungefähr anfallenden Kosten auf einer Skala von „-“ (=ungünstig) bis „+++“ (=sehr gut bzw. sehr günstig) angegeben:

Tabelle 6: Nachweisverfahren von Zelltod

	Beispiel	Qualitativ	Quantitativ	Kosten
Nachweis auf zellulärer Ebene				
Zellmorphologie				
<i>Elektronenmikroskopie</i>		+++	+	+
<i>Lichtmikroskopie</i>		+	++	++
<i>Durchflußzytometrie</i>		++	++	++
<i>Light Scatter</i>		+	++	++
Integrität der Plasmamembran				
<i>Aufnahme von Farbstoffen</i>	Trypanblau, Propidium, FDA	+	++	++
<i>Freisetzung von zellulären Enzymen und Bestandteilen</i>	LDH, Adenylatzyklase	+	++	++
Funktion der Organellen				
	Rhodamin 123, Acridin Orange	+	+	++
AnnexinV- Phosphatidyl-Serin				
		++	++	++
DNA-Fragmentierung				
<i>Agarose-Gel-Elektrophorese</i>		+	-	++
<i>Zellfraktionierung</i>		+	+	++
<i>Filtration</i>		+	+	++
<i>Umkehrfeld-Gel-Elektrophorese</i>		+	+	++
<i>TUNEL</i>		++	++	+
<i>ISEL</i>		++	++	+
<i>Durchflußzytometrie</i>		++	++	++
<i>Polymerase-Ketten-Reaktion</i>		+++	++	-
Aktivität von Enzymen				
	Caspasen, DNasen	++	++	+
Inhibition von Enzymen				
	ATA, CMK, FMK	++	++	+
Zelltod-Endprodukte				
	PARP, Nukleosomen	++	++	++
Nachweis in flüssigen Medien				
Bestandteile des Zytoskeletts				
	Zytokeratine, Lamine	+	++	++
Intrazelluläre Enzyme				
	NSE, LDH	+	++	++
Bestandteile des Zellkerns				
	Matrixproteine, Nukleosomen	+	++	++
Zelltodenzyme und deren Spaltprodukte				
	Caspasen, PARP, ICAD, Nukleosomen	+	++	++

Nachweis von Zelltod auf zellulärer Ebene

Ursprünglich waren es morphologische Beobachtungen, die zur Charakterisierung der verschiedenen Zelltodarten führten (Kerr 1972; Wyllie 1980). Durch zusätzliche Färbungen konnten zuverlässige quantitative Untersuchungen vorgenommen werden und die Funktionsfähigkeit der Plasmamembran wie auch von zellulären Organellen geprüft werden. Je nach Zelltodart und -stadium sind diese für Farbstoffe permeabel oder nehmen sie aktiv auf.

Weitere elegante Methoden zur qualitativen und quantitativen Zelltodbestimmungen stellen durchflußzytometrische Verfahren und der Einsatz von fluoreszierenden Markern dar. Damit können Größe, Struktur, Funktionsfähigkeit sowie strukturelle und funktionelle Veränderungen relativ einfach beurteilt werden, so auch die Intaktheit der Phospholipid-asymmetrie innerhalb der Plasmamembran, die bei Apoptose aufgehoben ist.

Nachdem der Zusammenhang zwischen Apoptose und Fragmentierung des Chromatins erkannt worden war, wurden Techniken entwickelt, um diesen Prozess nachzuweisen, darunter die DNA-Elektrophorese, durchflußzytometrische Verfahren, Filtrationsassays und Markierung von DNA-Brüchen mit fluoreszierenden Stoffen.

Schließlich eröffnen sich mit zunehmendem Verständnis der regulativen Prozesse und Signalwege während des Zelltods zahlreiche Nachweismöglichkeiten, zu denen die Aktivierung und Inhibierung verschiedener Caspasen ebenso zählen wie das Vorhandensein von spezifischen Substraten in unversehrter oder gespaltener Form (Mesner 1997a).

Zellmorphologie

Anhand von morphologischen Veränderungen – wie Zellschrumpfung, Loslösung der Zelle aus dem Verband mit Nachbarzellen, randständige Kondensation des Chromatins im Zellkern, Fragmentierung des Zellkerns, Bläschenbildung (Budding, Blebbing) und Abschnürung von apoptotischen Körperchen an der Zellmembran sowie Phagozytose durch Nachbarzellen – können apoptotische Zellen deutlich von onkotischen unterschieden werden. Bei letzteren kommt es zu einem Anschwellen der Zelle und deren Organellen, einer unregelmäßigen und diffusen Verklumpung des Chromatins im Zellkern, einem frühzeitigen Rupturieren der Membran und einem ungeordneten Austreten des Zellinhalts in den extrazellulären Raum (Kerr 1995).

Elektronenmikroskopischer Nachweis

Aufgrund seines hohen Auflösungsvermögens lassen sich mittels Elektronenmikroskop die zellulären und subzellulären Vorgänge einschließlich ihrer zeitlichen Abfolge sehr genau beobachten. Allerdings betrifft der apoptotische Zelltod meist nur einzelne Zellen innerhalb eines Gewebes und ist wegen der raschen Phagozytose durch Nachbarzellen häufig schon nach kurzer Zeit (etwa 30 bis 60 min) abgeschlossen. Da mit dem Elektronenmikroskop jedoch nur dünne Gewebsschnitte oder Zellschichten untersucht werden können, deren Zellen sich darüber hinaus in unterschiedlichen Stadien befinden, eignet sich diese Methode nicht zum quantitativen Nachweis von apoptotischen Zellen (Sgonc 1994; Mesner 1997a).

Lichtmikroskopischer Nachweis

Mit dem Lichtmikroskop kann eine größere Anzahl von Zellen beurteilt werden. Allerdings können nur grobe morphologische Veränderungen, wie die apoptotischen Körperchen einzelner apoptotischer Zellen oder die unregelmäßig oder schwach kondensierten Kerne von Verbänden onkotischer Zellen, die oft von neutrophilen Leukozyten oder mononukleären Phagozyten umgeben sind, erkannt werden (Kerr 1995).

Chromatinfärbungen mit Hematoxylin und Eosin, sowie den DNA-bindenden Farbstoffen Hoechst 33258 und 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) und anschließende Fluoreszenzmikroskopie erleichtern das Aufspüren von apoptotischen Zellen. Allerdings stellen normale Zellen mit kondensiertem Chromatin, etwa kleine Lymphozyten, oder kleine Zellfragmente, die beim Gewebeschnitt entstanden, Verwechslungsgefahren dar (Mesner 1997a).

Durchflußzytometrie

Bei der Identifizierung und Charakterisierung von Zellen wird in zunehmendem Maß auf durchflußzytometrische Verfahren zurückgegriffen. Das Prinzip der Methode besteht vereinfacht im Erfassen von Fluoreszenzeigenschaften einzelner Zellen: Zellsuspensionen werden im Zytometer in kleine Tröpfchen atomisiert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit nur eine einzelne Zelle enthalten. Diese Tröpfchen passieren in einer Kanüle nacheinander einen Laserstrahl und mehrere Detektoren. In Lichtverstärkern wird das durch die Zelle gestreute Laserlicht sowie die durch den Laser angeregte Fluoreszenzstrahlung der Zelle gesammelt, verstärkt und gemessen (Mesner 1997a).

Der Hauptvorteil gegenüber der Mikroskopie ist die Quantität der Untersuchungen: Mittels Durchflußzytometrie können Zehntausende von Zellen innerhalb einer Minute beurteilt

werden. Außerdem können durch den breiten dynamischen Bereich der Verstärker präzise die Fluoreszenzintensitäten über vier Potenzen ermittelt werden. Wegen dieser idealen Voraussetzungen wurden viele Färbe- und Fluoreszenzmethoden für die durchflußzytometrische Zelltodcharakterisierung entwickelt. Ein schwerwiegender Nachteil ist allerdings die für die Anschaffung eines Zytometers notwendigen hohen finanziellen Aufwendungen (Darzynkiewicz 1997; Mesner 1997a).

Light Scatter

Eine Anwendung des Zytometers ist das „Light Scatter“-Verfahren. Dabei trifft ein Laserstrahl auf eine Zelle und wird in verschiedene Richtungen gestreut. Aus der Analyse des gestreuten Lichts lassen sich Rückschlüsse über die Größe und Struktur der Zelle ziehen. Die Intensität des nach vorne gestreuten Lichts (forward scatter) korreliert mit der Zellgröße, die Intensität des in einem rechten Winkel zum auftreffenden Laserstrahl gestreuten Lichts (side scatter) mit der Granularität und dem Vorhandensein von intrazellulären lichtreflektierenden Strukturen (Carbonari 1995; Darzynkiewicz 1997).

Während der Onkose wird ein initial gesteigerte, dann schnell abnehmende Fähigkeit der Zelle beobachtet, Licht sowohl nach vorn und zur Seite zu streuen. Diese veränderte Eigenschaft wird durch das anfängliche Anschwellen der Zelle und der früh einsetzenden Plasmamembranruptur mit folgender Freisetzung des Zellinhalts erklärt.

Apoptotische Zellen zeigen eine erniedrigte Intensität im forward scatter – aufgrund des Zellschrumpfungsprozesses – jedoch eine vorübergehend erhöhte Intensität im side scatter, die auf die Kondensation des Chromatins und die Fragmentation des Zellkerns zurückzuführen ist. In späteren Apoptose-Stadien nimmt auch die side scatter-Intensität ab. Wiederum limitieren mechanisch fragmentierte Zellen und isolierte Zellkerne die Spezifität der Methode (Darzynkiewicz 1997).

Integrität der Plasmamembran

Anhand der Plasmaintegrität können lebende von toten Zellen unterschieden werden. Anzeichen für eine erhöhte Permeabilität der Membran sind einerseits die zelluläre Anfärbung mit speziellen Farbstoffen andererseits die Freisetzung von zellulären Bestandteilen, die in intakten Zellen die Plasmamembran nicht passieren können (Darzynkiewicz 1994, 1997; Mesner 1997a).

Aufnahme von Farbstoffen

Zu den Farbstoffen, die die Plasmamembran nur in Zellen mit gestörter Plasmaintegrität überwinden können, zählen kationisch geladene Moleküle, wie Trypanblau, Propidium, Ethidium und 7-Amino-Actinomycin-D (7-AMD). Nach Inkubation mit diesen Farbstoffen werden selektiv Zellen während Onkose, in späten Stadien der Apoptose und nekrotische Zellen markiert. Da im Verlauf der Apoptose die membranöse Transportfunktion bereits vor der Ruptur der Zellmembran gestört sein kann, ist häufig in apoptotischen Zellen eine leichte Färbung vorzufinden (Darzynkiewicz 1994, 1997, Mesner 1997a).

Eine weitere Möglichkeit, die Zellintegrität nachzuweisen, ist die Verwendung des nicht-fluoreszierenden Esterasesubstrats Fluorescein Diacetat (FDA), welches nach der Aufnahme in lebende Zellen durch intrazelluläre Esterasen in das hochfluoreszierende Fluorescein hydrolysiert wird. Bei Gegenfärbung mit Propidiumiodid (PI) erscheinen lebende Zellen grün (Fluorescein), tote Zellen hingegen rot (PI).

Das membrangängige Fluorochrom Hoechst 33342 wird zur speziellen Anfärbung von apoptotischen Zellen eingesetzt. Kurzzeitige Inkubation mit niedrigen Konzentrationen dieses Farbstoffs soll zu besonders kräftigen Einlagerung in apoptotischen Zellen führen, während lebende Zellen eine längere Inkubationszeit benötigen. Nach Gegenfärbung mit PI können die apoptotischen dann von onkotischen, spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden (Carbonari 1995; Darzynkiewicz 1997).

Da jedoch die Membraneigenschaften je nach Zelltyp, Apoptosestadium und Apoptoseauslösung variieren, müssen die Konzentration der Fluorochrome, die Inkubationszeit und -temperatur, sowie die Zusammensetzung der Inkubationsmedien erst optimiert werden, um die beschriebenen Effekte zu erzielen (Mesner 1997a).

Freisetzung von zellulären Bestandteilen

Aufschluss über die Integrität der Plasmamembran liefert auch das extrazelluläre Vorkommen von ursprünglich intrazellulären Bestandteilen oder Enzymen. Eine einfache Möglichkeit zur Quantifizierung von toten Zellen besteht in der Aktivitätsbestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) oder der Adenylatkinase im Kulturmedium.

Der Vorteil der Methoden zur Prüfung der Unversehrtheit der Plasmamembran liegt in der Beurteilbarkeit von großen Zellzahlen und der Quantifizierung des Zelltodvorkommens. Allerdings ist die exakte Bestimmung der Zelltodart oft schwierig, insbesondere in frühen Stadien. Für die Untersuchung einzelner Zellen sowie für die Beurteilung von *in vivo*-

Modellen, bei denen die Zellen oft schon vor der Ruptur der Zellmembran phagozytiert werden, ist ihre Bedeutung ebenfalls eingeschränkt (Mesner 1997a).

Funktion der Organellen

Viele der Tests zur Beurteilung der Lebensfähigkeit von Zellen untersuchen die Funktionsfähigkeit deren Organellen. Das kationischen Fluorochroms Rhodamin 123 (Rh123) reichert sich in Mitochondrien mit intaktem Transmembranpotential an. Bei Gegenfärbung mit Propidiumiodid können lebende Zellen so grün (Rh123) und tote rot (PI) markiert werden. Im Frühstadium wird bei onkotischen Zellen vorübergehend eine verstärkte Einlagerung von RH123 beobachtet, was auf eine temporäre Erhöhung des mitochondrialen Transmembranpotentials hindeutet. Hingegen geht der Abfall des Transmembranpotentials während der frühen Apoptose mit erniedrigter RH123-Akkumulation einher.

Lysosomen intakter Zellen nehmen das metachromatische Acridin Orange (AO) auf, welches rot fluoresziert. Besonders in Zellen mit einer Vielzahl aktiver Lysosomen, wie Monozyten und Makrophagen kann dieser Farbstoff eingesetzt werden (Darzynkiewicz 1994, 1997).

Annexin V - Phosphatidyl- Serin

In lebenden Zellen sind die Phospholipide der Plasmamembran asymmetrisch verteilt. Während Phosphatidylcholin und Sphingomyelin auf der äußeren Oberfläche angeordnet sind, ist Phosphatidylserin nach innen gewandt. Schon in einem frühen Apoptosestadium geht diese Asymmetrie verloren und Phosphatidylserin wird ebenfalls an der äußeren Oberfläche der Zellmembran exponiert (Fadock 1992; Koopman 1994). Das Antikoagulans Annexin V bindet bevorzugt und spezifisch an negativ geladene Phospholipide wie Phosphatidylserin. In Verbindung mit Fluorescein, können apoptotische Zellen mittels Zytometer nachgewiesen werden (Koopman 1994; Vermes 1995; Mesner 1997a).

Während Apoptose reagieren Zellen mit Annexin V nach dem Einsetzen der Chromatinkondensation; jedoch ist die Plasmamembran zu diesem Zeitpunkt noch nicht durchlässig für Propidiumiodid. So können mit einer Kombination von fluoreszierendem Annexin V und PI sowohl lebende Zellen (Annexin V negativ, PI negativ), frühapoptotische Zellen (Annexin positiv, PI negativ) und spätapoptotische oder nekrotische Zellen (PI positiv) identifiziert werden (Darzynkiewicz 1997).

Nachweis der DNA-Fragmentierung

Aufgrund ihres Aufbaus bietet das Chromatin bevorzugte Angriffspunkte für Nukleasen an den Verbindungsstücken zwischen den relativ geschützten Nukleosomen. Nachdem in Agarose-Gel-Untersuchungen bei apoptotischen Zellen charakteristische Bande entdeckt wurden, die der Größe von Nukleosomen und Vielfachen davon entsprachen, wurde dies auf die Aktivierung von Nukleasen zurückgeführt und Techniken entwickelt, um die DNA-Fragmentierung nachzuweisen (Mesner 1997a).

Agarose-Gel Elektrophorese

Ursprünglich wurde die internukleosomale DNA-Fragmentierung mit Hilfe der Agarose-Gel Elektrophorese gezeigt. Nach Isolierung und Präparation wird die DNA auf ein Gel mit 1% bis 2% Agarose aufgetragen und nach Anlegen einer geeigneten Spannung nach Größe und Ladung aufgetrennt. Während bei apoptotischen Zellen typischerweise regelmäßige, voneinander scharf abgegrenzte Bande zu beobachten sind, die auf das überwiegende Vorhandensein von Fragmenten mit einer Länge von 180 Basenpaaren (bp) und Vielfachen davon zurückzuführen ist und den Eindruck einer Leiter vermitteln, zeigt sich bei onkotischen Zellen eine mehr oder weniger unscharfe, „verschmierte“ Verteilung der DNA auf dem Gel, die durch eine unspezifische und zufällige DNA-Spaltung bedingt ist (Kerr 1994; Mesner 1997a).

Die Agarose-Gel-Elektrophorese ist eine einfach durchzuführende und billige Methode, jedoch weist sie einige Mängel auf: Aufgrund ihrer Insensitivität muss eine große Menge an DNA (der Gehalt von etwa 10^6 Zellen) ins Gel geladen werden, um dann mit Ethidiumbromid erkannt zu werden. Bei Verwendung von sensitiveren DNA-bindenden Farbstoffen wie SYBR Green oder Southern Blots kann diesem Manko teilweise abgeholfen werden (Mesner 1997a).

Ein weiterer Schwachpunkt liegt in der fehlenden quantitativen Aussagekraft. Zwar kann mit Agarose-Gel zwischen Apoptose und Onkose unterschieden werden, doch der Prozentsatz der in der Leiter abgebildeten DNA-Menge kann nur schwer abgeschätzt werden. Schließlich werden im Agarose-Gel nur Fragmente mit Doppelstrangbrüchen in einem Bereich von 180 bp bis 10 kbp erfasst. Somit entziehen sich einzelsträngige und hochmolekulare Fragmente dem Nachweis durch diese Methode. Dies fällt besonders ins Gewicht, da bei Apoptose in einigen Zellen einzelsträngige DNA-Brüche (Mesner 1997a) sowie häufig nur Spaltung der

DNA in hochmolekulare Fragmente ohne weitergehende Zerstückelung (Oberhammer 1993) oder völlig ausbleibende DNA-Fragmentierung (Cohen 1992) beobachtet wird.

Zellfraktionierung

Doppelsträngige DNA-Fragmente bis circa 20 kb können aus Kernen extrahiert werden, wenn Zellen unter nicht-denaturierenden Bedingungen in EDTA-Puffer lysiert werden. Durch anschließende colorimetrische oder fluorimetrische Bestimmung ist dann die Quantifizierung der DNA-Fragmente möglich. Alternativ dazu kann eine Radiomarkierung der zellulären DNA vor Eintritt des Zelltods und anschließende szintillatorische Zählung durchgeführt werden.

Aufgrund der relativ exakten Quantifizierung von DNA-Fragmenten können diese Techniken für Studien der zeitlichen Abfolge des Zelltods herangezogen werden. Da jedoch nur die Menge der DNA bestimmt wird, können keine Rückschlüsse auf die Zelltodart gezogen werden. Außerdem kann nicht unterschieden werden, ob die DNA Ergebnis einer gleichmäßig verteilten aber geringen Degradation in allen untersuchten Zellen oder einer überproportionalen Fragmentierung in wenigen Zellen ist (Mesner 1997a).

Filtration

Eine weitere Quantifizierungsmöglichkeit fragmentierter DNA ist durch Filtrationsassays gegeben. Dabei wird die zelluläre DNA vor Beginn des Zelltods ebenfalls radiomarkiert und danach in Filter mit definierter Porengröße eluiert. Während hochmolekulare DNA-Stücke im Filter zurückgehalten werden, können kleine Fragmente die Poren passieren und werden anhand ihrer Markierung quantifiziert. Zwar ist auch diese Methode einfach, schnell und genau, jedoch kann auch damit keine Aussage über die Zelltodart gemacht werden (Mesner 1997a).

Umkehrfeld (Field inversion) Gel-Elektrophorese

Schon vor dem Auftreten der typischen DNA-Leiter aus Fragmenten mit 180 bp und einem Vielfachen davon können während des apoptotischen Zelltods höhermolekulare DNA-Stücke (20-500 kbp) vorgefunden werden. Es wird vermutet, dass in einem ersten Schritt von Endonukleasen DNA-Rosetten (200-600 kbp) und DNA-Schleifen (50 kbp) gespalten werden, ehe in einem zweiten Schritt die internukleosomale Zerstückelung erfolgt oder in einigen Fällen auch ausbleiben kann (Oberhammer 1993). Zum Nachweis dieser hochmolekularen DNA-Fragmente eignet sich besonders die Umkehrfeld-Gel-Elektrophorese. Nach der Extraktion

und Präparation wird die DNA in ein Gel geladen, an das ein elektrisches Wechselfeld angelegt wird. Aufgrund ihrer Trägheit können größere Stücke die Richtungswechsel nur langsamer vornehmen als kleinere und können so separiert werden (Mesner 1997a).

TUNEL

Allen elektrophoretischen Verfahren ist gemein, dass sie die Anzahl der vom Zelltod betroffenen Zellen nicht bestimmen können. Dies ist jedoch mit der TUNEL (Terminal Deoxyribonucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick End Labeling)-Technik möglich:

Das Prinzip besteht in der Markierung der freien 3'OH-Enden der DNA, wie sie auch während Apoptose entstehen, durch Nukleoside, die mit Biotin, Digoxigenin oder FITC versehen sind. Die am häufigsten verwendete Version des Tests benützt als Nukleosid biotinyliertes Deoxyuridintriphosphat (dUTP) (Gorczyca 1993a; Ben-Sasson 1995). Die Bindung der Nukleoside an ein 3'OH-Ende der DNA wird dabei durch ein Enzym namens Terminale Deoxyribonucleotidyl Transferase (TdT) unter Beteiligung von Co^{2+} katalysiert. Nach Beseitigung der überschüssigen Nukleoside wird fluoreszierend markiertes Streptavidin zugegeben, das an die biotinylierten Nukleoside bindet und die Quantifizierung im Fluoreszenzmikroskop oder Durchflußzytometer erlaubt (Gorczyca 1993a; Sgonc 1994; Ben-Sasson 1995; Darzynkiewicz 1997).

Der Vorteil der TUNEL-Technik ist die gleichzeitige Beurteilbarkeit von Morphologie und Färbeverhalten, wodurch sich mit dieser Methode der zeitliche Ablauf von morphologischen Veränderungen und DNA-Fragmentation einordnen lässt. Außerdem lässt sich der Prozentsatz der apoptotischen Zellen genau abschätzen. Diese Vorteile werden unterstrichen durch die Verwendung von Durchflußzytometern, die eine hohe Sensitivität gewährleisten.

Allerdings können dadurch auch DNA-Brüche mit freien 3'OH-Enden, die auf andere Ursachen als Apoptose zurückgehen, wie die Aktivität von Topoisomerase II oder Fragmentierung während des onkotischen Zelltods, zu positiven – wenngleich auch weniger starken – Signalen im TUNEL-Test führen (Gorczyca 1993a; Ben-Sasson 1995; Mesner 1997a).

ISEL

Ein ähnliches Verfahren ist ISEL (In situ end labeling of fragmented DNA), das an Stelle von TdT die DNA Polymerase I zur Bindung der Nukleoside an die freien 3'OH-Enden benutzt (nick translation). Gegenüber der TUNEL-Methode ist ISEL etwas weniger sensitiv, da nur zurückgesetzte und nicht wie bei TUNEL zusätzlich hervorstehende und stumpfe 3'OH-Endigungen markiert werden (Wjisman 1993; Gorczyca 1993a; Gold 1994; Darzynkiewicz 1997).

Durchflußmetrische DNA-Bestimmung

Die durchflußzytometrische Bestimmung des zellulären DNA-Gehalts kann gut mit den TUNEL- und ISEL-Verfahren kombiniert werden. Nach Permeabilisierung der Zellen mittels Detergenzien oder Fixation durch Alkohol oder Aceton tritt bereits fragmentierte DNA aus der Zelle aus. Deshalb zeigen apoptotische Zellen bei Anfärbung der verbleibenden zellulären DNA einen verminderten DNA-Gehalt, der noch unterhalb der sich in der G1-Phase befindenden Zellen liegt („Sub-G1-Peak“). Da bei dieser Art der DNA-Quantifizierung der Status der nicht-apoptotischen Zellen im Zellzyklus mitbestimmt wird, ist auch eine Untersuchung der Zellzyklusspezifität der apoptotischen Zellen möglich (Darzynkiewicz 1997).

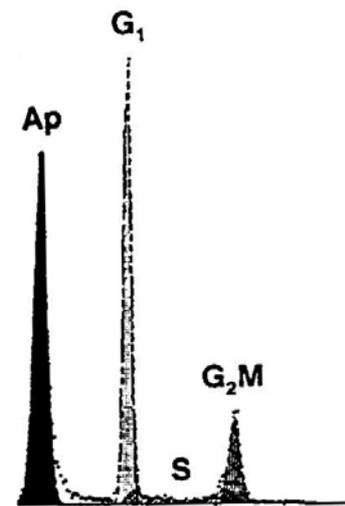


Abbildung 21: Sub-G1 Peak bei apoptotischen Zellen (Darzynkiewicz 1997)

Unter den Sub-G1-Peak fallen allerdings auch mechanisch geschädigte Zellen, Zellen mit niedrigem DNA-Gehalt oder mit abweichender Chromatinstruktur, die für Fluorochrome nur eingeschränkt zugänglich sind, wodurch die Spezifität des Verfahrens sinkt.

Bestimmung der Aktivität von Enzymen und Proteasen

Das zunehmende Verständnis von Enzymen und Proteasen, die an Zelltodprozessen beteiligt sind, eröffnete neue Möglichkeiten, Zellen anhand der Aktivität dieser Enzyme zu charakterisieren. Diese kann auf verschiedene Arten bestimmt werden:

- Durch direkte Bestimmung der Enzymaktivitäten, die während des Zelltods erhöht sind.
- Durch Blockierung der Enzymaktivitäten mittels Inhibitoren
- Durch genetische Modulationen der Enzymaktivität, das heißt Erzeugen von Überexpression (durch Transfektion) oder Unterexpression (durch „Antisense Oligonukleotide“ oder genetischen „knockout“) relevanter Gene.

Zu den Enzymen, deren Aktivität während Apoptose gesteigert ist, zählen die Gewebstransglutaminase, die Deoxyribonuklease und verschiedene Mitglieder der Caspasenfamilie. Voraussetzungen für zuverlässige Aktivitätsbestimmungen sind eine ausreichende Spezifität des Tests, möglichst dem intrazellulären Milieu während Apoptose ähnliche Bedingungen und ein direkter Bezug zwischen der Enzymmenge und dem gebildeten Endprodukt (Mesner 1997a).

Einsatz von Inhibitoren

Während Apoptose sind in einer Zelle sowohl die Proteinsynthese sowie verschiedene Nukleasen und Proteasen aktiviert. Zum Nachweis ihrer Beteiligung an apoptotischen Prozessen können Inhibitoren gegen die Enzyme eingesetzt werden: Die Proteinsynthese wird beispielsweise durch Cycloheximid oder Staurosporin blockiert; Endonukleasen werden in ihrer Aktivität durch Aurintricarboxylsäure (ATA) oder Zink gehemmt; Chloromethylketone (CMKs) und Fluoromethylketone (FMKs) wie auch Peptidaldehyde (YVAD-Aldehyd und DEVD-Aldehyd) sind potente Inhibitoren von Proteasen, darunter auch von Caspasen.

Allerdings ist in den wenigsten Fällen eine gute Selektivität der Inhibitoren gegeben: So hemmt ATA neben Endonukleasen auch eine Reihe von Proteasen, Polymerasen sowie die Proteinsynthese, ebenso wirkt Zink auch inhibierend auf Proteasen. Hingegen weisen Proteasen eine weit geringere Affinität zu FMKs und CMKs auf wie andere Enzyme.

Aufgrund der oft mangelnden Selektivität müssen Inhibitoren-Tests sorgfältig geplant, kontrolliert und vorsichtig interpretiert werden. Zu ihrer Bestätigung können alternative Techniken wie die Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden oder genetischen „knockouts“ herangezogen werden (Mesner 1997a).

Nachweis von Endprodukten

Der intrazelluläre Nachweis von Substraten oder Endprodukten apoptosespezifischer Enzyme bietet darüber hinaus eine zusätzliche Option der Zelltodcharakterisierung. Am bekanntesten sind der Nachweis von Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) sowie von Nukleosomen, die

nach Lyse der Zellen immunologisch mit Antikörpertestsystemen aufgespürt und quantifiziert werden können. Dabei kommt der Spezifität und Sensitivität der eingesetzten Antikörper eine zentrale Bedeutung zu (Kaufmann 1993; Leist 1994; Mesner 1997a).

Nachweis von Zelltod in flüssigen Medien

In Körperflüssigkeiten wie Blutplasma und -serum, Urin, Liquor, Aszites, Pleuraflüssigkeit können Substanzen, die von absterbenden oder abgestorbenen Zellen freigesetzt werden, nachgewiesen werden. Dazu zählen

- Bestandteile des Zytoskeletts, wie Cytokeratine und Lamine,
- vorwiegend intrazelluläre Enzyme, wie die Laktatdehydrogenase (LDH) und die Neuronen-spezifische Enolase (NSE),
- Bestandteile des Zellkerns, wie Nukleosomen und freie DNA, außerdem
- direkt am Zelltod beteiligte Enzyme wie Caspasen und deren Spaltprodukte.

Bestandteile des Zytoskeletts

Intrazelluläre Stützproteine, wie Cytokeratine und Lamine, werden während des Zelltods von Proteasen degradiert, welche dadurch eine Destabilisierung der Zellmembran erreichen. In fragmentierter und somit löslicher Form erscheinen sie in der Blutbahn und können dort mittels immunologischer Nachweisverfahren quantifiziert werden. Von den mehr als 20 bisher charakterisierten Cytokeratinen werden einige Fragmente, deren Serumkonzentrationen in Beziehung mit der Ausdehnung oder dem Wachstum von epithelialen Tumoren stehen, bei Personen mit derartigen Tumorerkrankungen zur Diagnostik, Therapiekontrolle, Rezidiv-erkennung und Prognoseabschätzung eingesetzt.

Ein Beispiel ist der 1993 entwickelte Test CYFRA 21-1, der ein Fragment des Cytokeratins 19 mittels zweier monoklonaler Antikörper erkennt und sich als aussagekräftiger Parameter bei Plattenepithelkarzinomen, insbesondere beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, etabliert hat (Stieber 1993). Untersuchungen neueren Datums stellten einen direkten Zusammenhang zwischen der Freisetzung von CYFRA 21-1 und dem apoptotischen Zelltod her (Sheard 2002).

Intrazelluläre Enzyme

Obligat intrazelluläre Enzyme gelangen erst in die Blutbahn wenn die Plasmamembran porös wird oder zerreißt. Diese beiden Zustände sind zwei wichtige Vorgänge während des Zelltodprozesses. Von den zahlreichen intrazellulären Enzymen werden einige als genereller Zelltodmarker eingesetzt. Prominentester Vertreter ist die Laktatdehydrogenase (LDH) , die in die Isoenzymgruppen 1-5 unterteilt werden kann. Da diese eine gewisse Zellspezifität aufweisen, können sie zur Differenzierung und Lokalisierung des Zell- oder Gewebeschadens herangezogen werden. Erhöhte Konzentrationen der Gesamt-LDH werden im Serum von Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen – vor allem in fortgeschrittenen Stadien – beobachtet, aber auch bei akuten Infekten, Herzinfarkt und ebenso bei intravasaler Hämolyse (Dörner 1998, Thomas 1998).

Tabelle 7: Isoenzyme der LDH und ihre Organspezifität

Isoenzyme der LDH	Organspezifität
LDH-1 und LDH-2	Herz, Erythrozyten und Niere
LDH-3	Granulozyten und Lunge
LDH-4 und LDH-5	Leber, Skelettmuskel, Milz und Lunge

Die Neuronen-spezifische Enolase (NSE) wird hingegen vorwiegend in Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems sowie in Zellen des neuroendokrinen Gewebes angetroffen. Bei Schädigung dieser Gewebe dient sie daher zur Abschätzung der Läsionsgröße. Darüber hinaus wird sie vermehrt bei Personen mit kleinzelligem Bronchialkarzinom freigesetzt und als Serummarker für die Diagnosefindung und Therapiekontrolle verwendet. Die Spezifität der NSE wird jedoch durch ihr Vorkommen in Erythrozyten, Plasmazellen und Thrombozyten eingeschränkt. Hämolyse und zu spätes Abzentrifugieren führt zu falsch-positiven Werten (Fateh-Moghadam 1993).

Bestandteile des Zellkerns

Anteile der nukleären Membran, nukleäre Matrixproteine und die physiologischerweise im Zellkern angesiedelte nukleosomale DNA gewinnen während des Zelltods ebenfalls Zugang zum extrazellulären Raum und zur Blutzirkulation.

Die Quantifizierung der DNA und die Bestimmung qualitativer Besonderheiten der DNA im Serum und Plasma von Tumorpatienten wurde von zahlreichen Arbeitsgruppen hinsichtlich ihrer Eignung für die Diagnosefindung, Therapiekontrolle, Rezidiverkennung und

Prognoseabschätzung untersucht. Durch die Einführung molekularer Methoden, insbesondere der Echtzeit-quantitativen Polymerasenkettenreaktion (Real-time quantitative PCR Taqman), können qualitative und quantitative Analysen gleichzeitig vorgenommen werden. Aufgrund der vielseitigen Indikationsgebiete sowie der breiten Einsetzbarkeit ist mit einer Charakterisierung zahlreicher neuer molekulargenetischer Marker zu rechnen (Anker 2001a,b; Lo 2001a; Johnson 2002; Sidransky 2002).

Zelltodenzyme und deren Spaltprodukte

Auch direkt am Zelltodprozess beteiligte Enzyme wie die Caspasen können in der Blutbahn nachgewiesen und deren Aktivität bestimmt werden. Dafür werden Testsysteme mit Antikörpern gegen spezifische Caspase-Epitope, Inhibitoren oder Substrate, die durch Caspasen modifiziert werden, verwendet. Je nach Ähnlichkeit Struktur oder Spezifität werden dabei mehrere Caspasen gleichzeitig erfasst (<http://www.biochem.roche.com>; Hentze 2001).

Einige der durch Caspasen gespaltenen Substrate wie die Poly-(ADP-Ribose) Polymerase (PARP), der Inhibitor der Caspase-aktivierten DNase (ICAD) sowie Lamine und Cytokeratine sind auch im Serum oder Plasma detektierbar. Beispielsweise wird das Cytokeratin 18 von Caspasen in epithelialen Zellen an einer definierten Stelle prozessiert, wodurch eine Antigenstruktur freigelegt wird, die durch den Antikörper M30 erkannt wird. So kann aus der Konzentration an Cytokeratin gebundener M30-Antikörper im Serum oder Plasma indirekt auf die Caspasen-Tätigkeit geschlossen werden (Leers 1999). Außerdem weist auch ein vermehrtes Vorkommen von Nukleosomen im Serum und Plasma auf eine Aktivierung von Caspase-abhängigen Endonukleasen hin. Dabei kann möglicherweise durch den Grad der DNA-Fragmentierung zwischen verschiedenen Zelltodmodalitäten unterschieden werden: Kleine DNA-Fragmente wie Mono- und Oligonukleosomen sprechen für apoptotischen Zelltod mit ausgedehnter, spezifischer Nukleasenaktivierung; hochmolekulare Fragmente von über 10 kbp für Onkose mit eingeschränkter und unspezifischer Nukleasenaktivierung (Jahr 2001).

Allerdings müssen diese Hypthesen spekulativ bleiben, da die Herkunft der Substanzen nicht sicher zurückverfolgt werden kann, die genannten Veränderungen auch sekundär auftreten können und eine Vielzahl von Zwischenformen der Zelltodarten auf einem Kontinuum zwischen Apoptose und Onkose bekannt sind (Lockshin 2000, Graham 2001).

2.2 Nukleosomen

Chromatin setzt sich aus einer Kette von Komplexen aus DNA und Histonen zusammen. In den menschlichen Zellen sind ungefähr 99% der DNA, und diese in proteingebundener Form, im Zellkern lokalisiert. Nur ein kleiner Anteil liegt als ringförmige Struktur ohne Assoziation an Proteine in den Mitochondrien vor. Das nukleäre Chromatin ist nach einem mehrstufigen Ordnungsprinzip angelegt:

- Die DNA ist in sich selbst verdrillt (etwa 10,5 Basen pro Umdrehung; Durchmesser 2 nm).
- Die DNA ist ca. 1,5-mal um Histone gewickelt. Zusammen bilden sie eine perlenförmige, als Chromatin bezeichnete Struktur mit einem Durchmesser von 11 nm.
- Die DNA-Protein-Kette ist wiederum in sich verdrillt und wird durch weitere Histone stabilisiert, wodurch die 30 nm dicken Chromatinfasern entstehen. Die Histonkomponenten sind dabei zur Innenseite der Fasern angeordnet.
- Die Chromatinfasern bilden Schleifen und sind in sich zu einem Supertwist verdrillt.
- Diese laufen schleifenartig quer durch jedes Chromosom.
- Im Innern der Chromosomen sorgt ein Haltestab aus schlecht löslichen Kernproteinen für die geregelte Kondensation der Chromosomen.

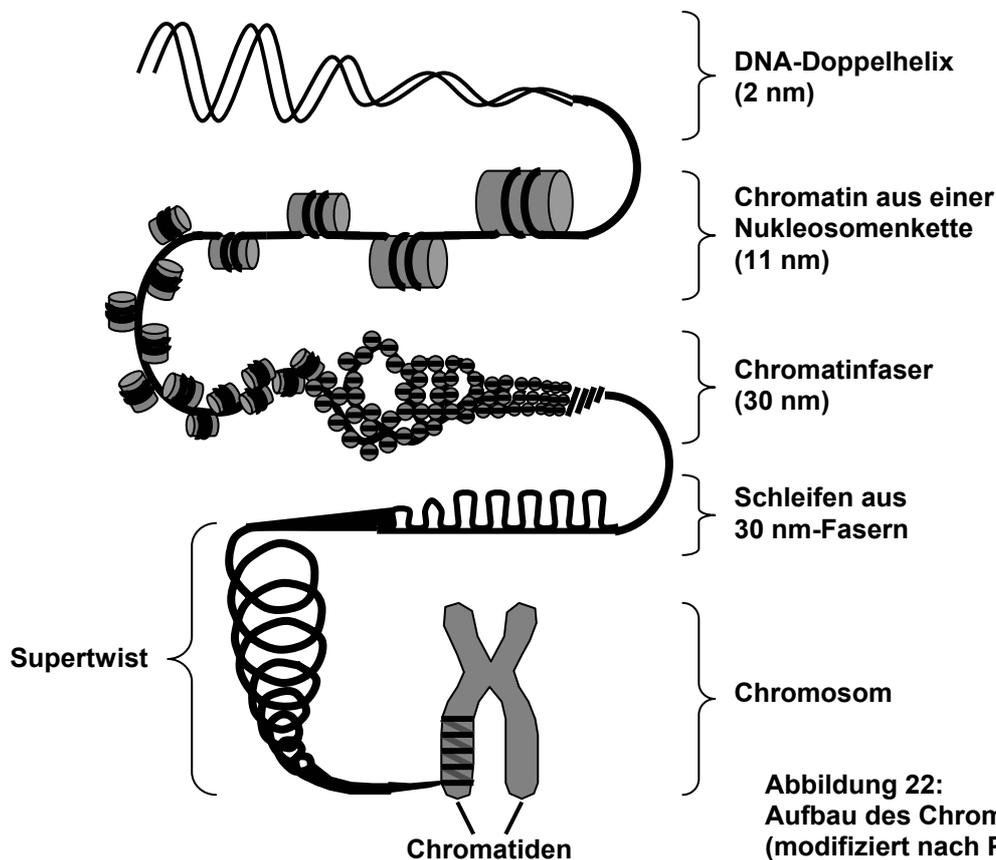


Abbildung 22:
Aufbau des Chromatins
(modifiziert nach Plattner 1997)

Das Chromatin kommt im Zellkern zumeist in kondensierter, maximal komprimierter Form als Heterochromatin vor, in der es gegen exogene und endogene Schädigungen am besten geschützt ist. Im Rahmen von Replikations-, Transkriptions- und Reparaturvorgängen an der DNA kann sie aus diesem kompakten in einen lockeren, dekontensierten Zustand übergehen, um den daran beteiligten Enzymen Zugang zu den entsprechenden Stellen zu gewähren (Plattner 1997; Kornberg 1999).

2.2.1 Struktur und Funktion der Nukleosomen

Die Feinstruktur der Nukleosomen – der Grundbausteine des Chromatins – und ihre Funktionsweise gewähren Einblicke in das alltägliche, dynamische Geschehen um die menschliche Erbinformation:

Die Proteinkomponente der Nukleosomen wird aus den Histonen H2A, H2B, H3 und H4 gebildet. Diese liegen jeweils doppelt und dazu in Dimerstruktur als H2A-H2B und H3-H4 vor. Insgesamt ergibt sich somit ein Kernprotein bestehend aus vier Dimeren eines Histon-Oktamers. Um diesen Komplex winden sich 145 bis 147 Basenpaare DNA und formen mit diesem zusammen den scheiben-ähnlichen Nukleosomenkern mit einem Molekulargewicht von 206 kDa. Benachbarte Nukleosomen werden durch so genannte Linker-DNA verbunden, deren Länge je nach Zelltyp zwischen 10 und 100 Basenpaaren (bp) variiert. An dieser Linker-DNA sind im Abstand von etwa zehn Nukleosomen Histone vom H1-Typ angeordnet, die für die Organisation als Chromatin-Faser von Bedeutung sind (Luger 1997; Rhodes 1997).

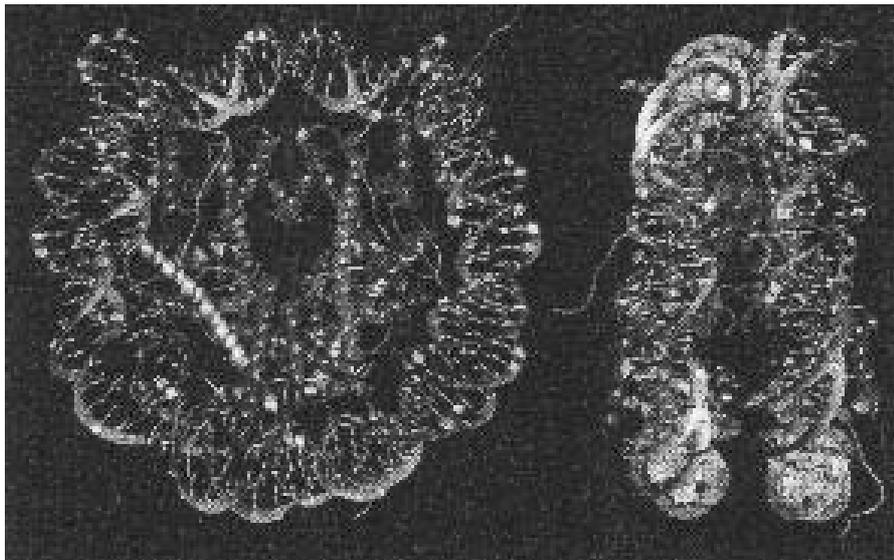


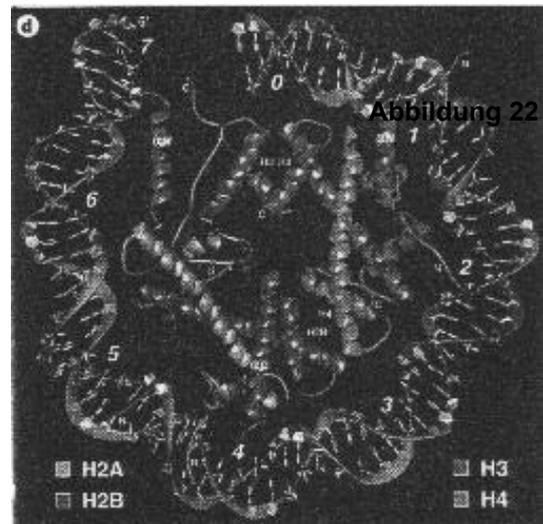
Abbildung 23: Nukleosomenstruktur (Luger 1997)

Die linkshändig gedrehte DNA-Superhelix umgibt das Histon-Oktamer etwa 1,65-mal und ist an der flachen Außenseite der Nukleosomenscheibe angebracht. 121 von 146 bp der DNA sind durch die Interaktion mit den Histondimeren organisiert. Alle 10 bp bestehen Bindungsstellen zwischen den Phosphodiester-Holmen der DNA und den Histonen. Diese 14 Kontakte werden durch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkung zwischen der Proteinhauptkette und den Phosphodiestern stabilisiert und gleichzeitig unspezifisch gehalten, so dass die Bindungen unabhängig von DNA-Sequenzen bleiben. Daneben verleihen Arginin-Seitenketten über nicht-polare Kontakte mit den Desoxyribose-Gruppen zusätzliche Stabilität (Luger 1997; Rhodes 1997).

Die durchschnittliche Anzahl der Basenpaare pro helikaler Windung ist mit 10,2 innerhalb des Nukleosomenkerns reduziert im Vergleich zur Linker-DNA mit 10,6 Basenpaaren pro Windung. Dadurch wird die Anpassungsfähigkeit der DNA im Nukleosomenkomplex wie auch die Positionierung der Nukleosomen hinsichtlich der DNA-Sequenz begünstigt (Luger 1997; Rhodes 1997).

Die Histone sind aus strukturierten trihelikalen Domänen – so genannte Histon-Faltungen – aufgebaut, sowie aus zwei unstrukturierten Endigungen. Die Heterodimere H2A-H2B und H3-H4 entstehen durch einhakenden Kontakt zweier zentraler Histon-Falten. Im Oktamer sind die beiden H3-H4 Dimere zentral angeordnet und stellen die zentralen sechs Bindungsstellen für die DNA-Superhelix bereit; die peripheren H2A-H2B Dimere hingegen sind für die Fixation der in den Nukleosomenkern ein- und austretenden DNA verantwortlich.

Untereinander sind die Histondimere ebenfalls durch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen miteinander oligomerisiert. H3-H3 Interaktionen sorgen für die Assoziation der zentralen Dimere, H2B-H4 Interaktionen für die Anbindung der peripheren Dimere. Darüber hinaus sind mehrere quervernetzende Kontakte bekannt (Luger 1997).



**Abbildung 24: Nukleosomenkern
(Luger 1997)**

Die 15 bis 30 Aminosäure zählenden, unstrukturierten Histon-Endigungen treten aus dem Nucleosomenkern aus; die Ausläufer H2A und H4 verlaufen auf der flachen Seite durch die DNA-Superhelix hindurch, H2B und H3 durchziehen die durch die DNA-Drillung geformten Kanäle. Diese Endigungen nehmen Kontakt zu benachbarten Nucleosomen auf und gewährleisten die internucleosomale Interaktion. Darüber hinaus erhöhen sie die Stabilität innerhalb der Nucleosomenkette und spielen eine Rolle in der Organisation der Chromatinfaser.

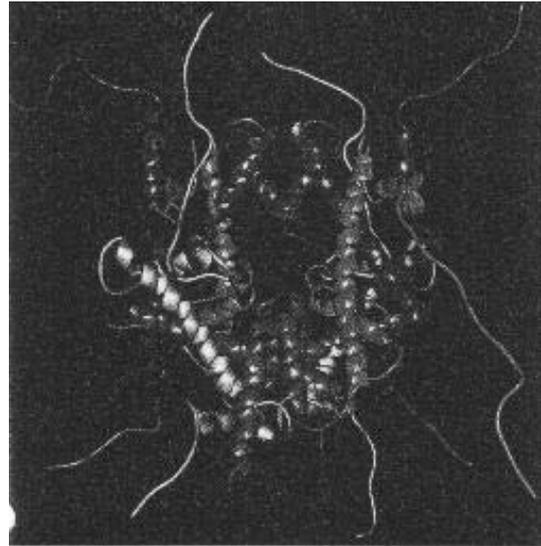


Abbildung 25: Struktur der Histone im Nucleosomenkern (Luger 1997)

Außerdem können sie durch verschiedene chemische Gruppen modifiziert werden, wodurch funktionelle, dynamische Prozesse an der DNA ermöglicht werden (Luger 1997; Rhodes 1997; Kornberg 1999).

Bedeutung und Funktion der Nucleosomen

Neben der Kompaktierung und Stabilisierung der DNA ist Regulation der Transkription von genetischer Information die zentrale Aufgabe der Nucleosomen. Die Gewährung oder Verhinderung des Zugangs von Transkriptionsfaktoren zu den entsprechenden DNA-Sequenzen wird vor allem von den Histonen im Nucleosomenkern reguliert. Auf diese wiederum kann durch Modifikationen der abstehenden Endigungen Einfluss genommen werden. Zunächst wurde das Anfügen und Entfernen von Acetylgruppen und deren Auswirkungen auf die Transkription beobachtet (Grunstein 1998; Kornberg 1999); inzwischen wurden auch Methyl-, Phosphor-, Ubiquitin- und ADP-Ribose-Gruppen in diesem Zusammenhang untersucht (Hagmann 1999; Strahl 2000).

Durch die Übertragung von Acetylgruppen auf die Histonendigungen durch Histonacetyltransferasen (HAT) wird eine lokale Dekondensation des Chromatins, eine Lockerung internucleosomaler Histon-Histon-Kontakte wie auch intranucleosomaler Histon-DNA-Verbindungen bewirkt, wodurch Transkriptionsfaktoren Zugang zur DNA erlangen (Grunstein 1998). Ähnliche transkriptionsfördernde Einflüsse wurden für Phosphorylierungen

und Methylierungen an Histon-Endigungen beschrieben und für die Modifikation mit Ubiquitin- und ADP-Ribose-Gruppen vermutet (Strahl 2000).

Als Gegenspieler der HAT fungieren Histon-Deacetylasen (HDAC), die in Zusammenarbeit mit DNA-bindenden Proteinen an Promotoren ankoppeln und Transkriptionsprozesse unterbinden können. Mit einer Repression der Transkription geht auch eine Kondensierung des Chromatins einher. Eine Beseitigung der Phosphor- und Methylgruppen ist ebenfalls häufig mit einer Verlust der Transkriptionsfähigkeit verbunden (Hagmann 1999; Strahl 2000).

Remodelling des Chromatins

Promotoren und Verstärker transkriptionsaktiver Gene befinden sich meist in den Nukleasehypersensitiven DNA-Linker-Abschnitten. Zumindest für den Zeitraum der Transkription müssen die inhibierenden Nukleosomen von diesen Bereichen entfernt oder abgehalten werden.

Die dynamischen Nukleosomentranslokations-Prozesse werden durch Chromatin-Modelling Komplexe wie die SWI/SNF- und RSC- Proteinkomplexe ermöglicht. Dabei unterbrechen sie die Histon-DNA-Kontakte beginnend an den peripheren Fixationsstellen und schälen die DNA quasi vom Nukleosomenkern ab. Während RNA-Polymerasen die freigelegten DNA-Sequenzen transkribieren, können weitere Verbindungen gekappt werden und das schrittweise Voranrücken der Polymerase ermöglichen.

Der RSC-Komplex ist als bisher einziges Mitglied der SWI/SNF-Familie zur kompletten Ablösung der DNA vom Histon-Oktamer und dessen Transfer zu einem anderen DNA-Molekül fähig. Bei anderen SWI/SNF-ähnlichen Komplexen findet nur eine teilweise Abschälung statt, die freie Histonoberfläche bindet an benachbarte oder entfernte DNA, bildet Schleifen, ehe die Histone als ganze transloziert werden (Kornberg 1999; Bjorklund 1999).

Mitglieder einer zweiten Familie der Chromatin-remodelling Komplexe namens ISWI verursachen keine derartig gravierenden Veränderungen. Sie schaffen Histon-freie DNA-Bereiche indem sie das Histonoktamer entlang der DNA bewegen. Dabei lösen sie jeweils einen peripheren Kontakt der in den Nukleosomenkern eintretenden DNA und knüfen an deren Ausgang einen neuen. Ein zusätzlicher Motor für diesen Gleitvorgang ist die stärkere

helikale Drillung der DNA-Superhelix innerhalb des Nucleosomes, die nach Lösung der Histon-DNA-Kontakte sich etwas aufdreht und den Histonkomplex verschiebt (Widom 1997; Kornberg 1999). Für die Funktion einiger dieser Komplexe, zum Beispiel für den Nucleosomen remodellierenden Faktor NURF, ist die Beteiligung von acetylierten Histonendigungen erforderlich. Eine Übersicht über Chromatinremodelling Komplexe ist in der folgenden Tabelle gegeben (Kornberg 1999):

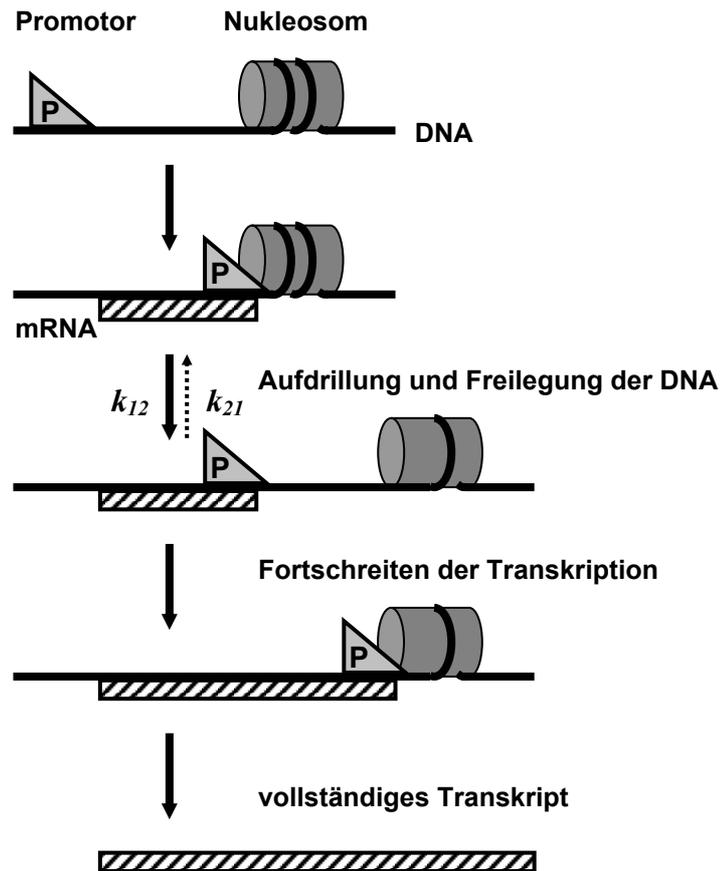


Abbildung 26: Chromatin-Remodelling durch ISWI-Komplexe (Widom 1997)

Tabelle 8: Gruppierung und Charakteristika von Chromatin-Remodelling Komplexen

Chromatin-Remodelling Komplex	Organismus	ATPase	Molekulargewicht (MDa)	Untereinheiten
SWI/SNF-Familie				
SWI/SNF	<i>S.cerevisiae</i>	SWI2/SNF2	2	11
RSC	<i>S.cerevisiae</i>	STH1	1	15
Brahma	<i>D.melanogaster</i>	Brahma	2	ND
H SWI/SNF	<i>H.sapiens</i>	hBRM	2	10
H SWI/SNF	<i>H.sapiens</i>	BRG1	2	10
NRD	<i>H.sapiens</i>	CHD4	1,5	18
ISWI-Familie				
I SWI1	<i>S.cerevisiae</i>	ISWI1	0,4	4
I SWI2	<i>S.cerevisiae</i>	ISWI2	0,3	2
NURF	<i>D.melanogaster</i>	ISWI	0,5	4
CHRAC	<i>D.melanogaster</i>	ISWI	0,7	5
ACF	<i>D.melanogaster</i>	ISWI	0,2	4
RSF	<i>H.sapiens</i>	hISWI	0,5	2

Silencing

Die negative Regulierung des Transkriptionsvorgangs findet neben der Unterdrückung durch Gen-spezifische DNA-bindende-Proteine auch durch so genanntes „Silencing“ statt. Dies geschieht durch die Bildung von Heterochromatin an Chromosomenenden oder an definierten Stellen, die durch entsprechende DNA gekennzeichnet ist, und persistiert während des ganzen Zellzyklus. In hypoacetyliertem Zustand werden die H3- und H4-Proteine dabei von SIR3-, SIR4- oder Tup1/Ssn6-Proteinen gebunden, die sich über mehrere Nucleosomen erstrecken und das Ablesen der darin befindlichen DNA vollständig verhindern (Grunstein 1997).

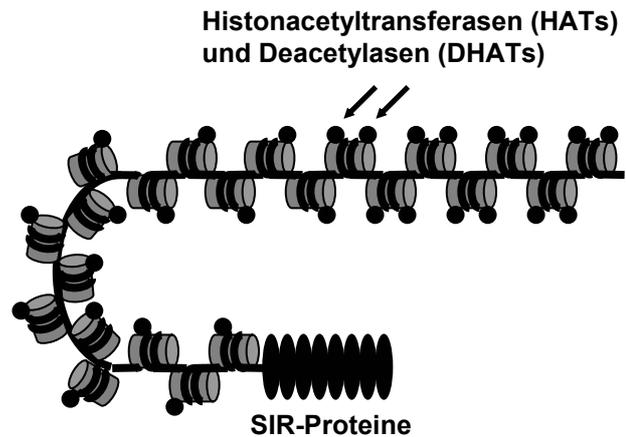


Abbildung 27: Chromatin-Silencing durch SIR-Proteine (modifiziert nach Grunstein 1997)

Sprach-Codierung der modifizierten Histone

Wie am Beispiel der Acetylierung von Histonendigungen dargestellt, können auch Modifikationen der Histonausläufer mit Methyl-, Phosphor-, Ubiquitin- und ADP-Ribose-Gruppen in die Regulation von dynamischen Prozessen am Chromatin – wie der Transkription oder der Replikation – eingreifen. Diese Signale können sich gegenseitig ergänzen, unterstützen oder auch modulieren (Strahl 2000).

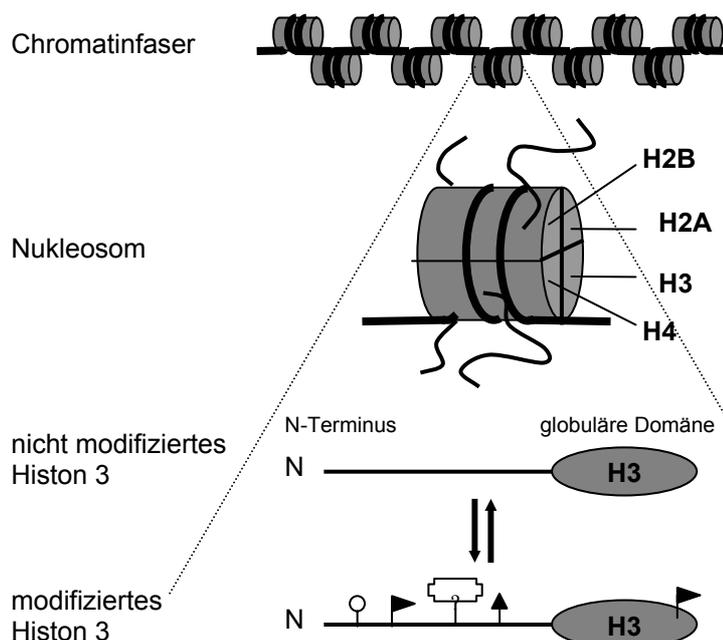


Abbildung 28: Modifikationen der Histone (modifiziert nach Strahl 2000)

Aufgrund der Komplexität der gleichzeitig stattfindenden Histon-Modifikationen, die je nach Stellung im Zellzyklus unterschiedliche Reaktionen bzw. Aktivierungsmuster von Proteinen bewirken können, wird inzwischen von einer Sprache kovalenter Histon-Modifikationen ausgegangen. Der sich ständig ändernde Code wird während des Zellzyklus von unterschiedlichen Proteinen gelesen, die jeweils spezifische Anweisungen ausführen und erlaubt so eine optimale Anpassung an die Bedürfnisse der Zelle (Strahl 2000).

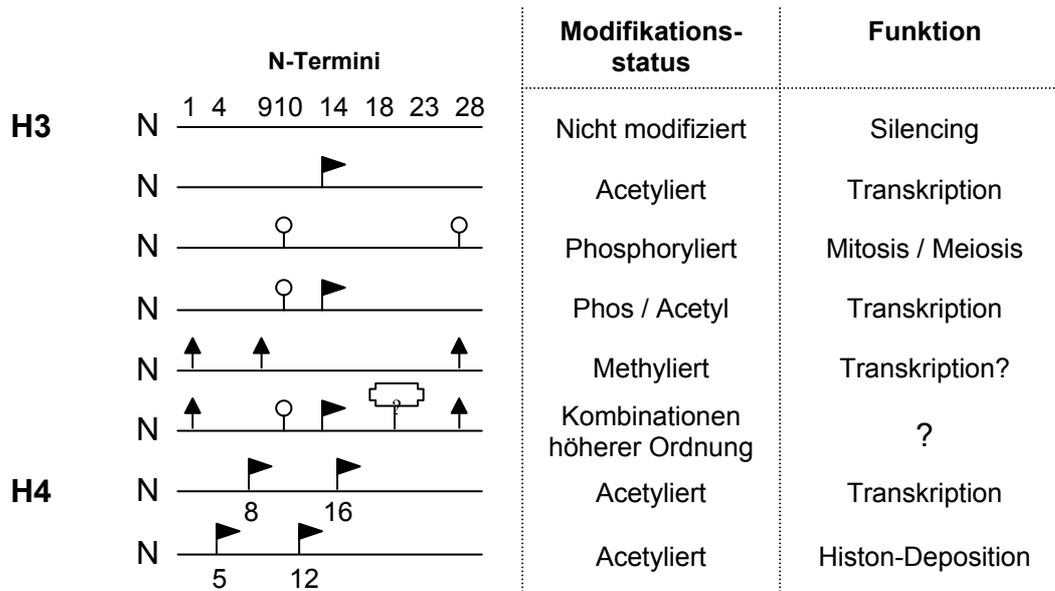


Abbildung 29: Sprachcode der Histonmodifikationen (modifiziert nach Strahl 2000)

2.2.2 Nukleosomen während des Zelltods

Die Veränderungen des Chromatins während des Zelltods hängen vom verbleibenden Energiepotential der Zelle ab: Beim onkotischen Zelltod fallen die Stätten der Energieproduktion und -regeneration zu einem frühen Zeitpunkt aus, wodurch ATP-abhängige Prozesse, wie die Stabilisierung von Membranen und Reparaturvorgänge zusammenbrechen. Das Chromatin verteilt sich zunächst schollig im Zellkern, ehe es ins Zytoplasma und in den extrazellulären Raum freigesetzt wird. Nukleasen, Proteasen und lysosomale Enzyme finden leicht Zugang zur DNA und den eingewobenen Proteinen und teilen diese unspezifisch in Fragmente variabler Größe (Kerr 1994; Leist 1997b; Nicotera 1998; Kanduc 2002).

Bei noch intaktem Energienachschub während des apoptotischen Zelltods werden das Chromatin und andere zelluläre Bestandteile geordnet abgebaut: Im Zellkern kondensiert das

Chromatin und lagert sich an dessen Rändern an. Spezielle Endonukleasen gewinnen Zugang zum Zellkern und spalten es zunächst in große Teilstücke von etwa 50-300 kbp, dann in kleine Einheiten von 180 bp und Vielfachen davon. Dabei können die beiden Fragmentierungsschritte auch unabhängig voneinander vorkommen, ganz ausbleiben und mit unterschiedlichen morphologischen Veränderungen einhergehen (Bortner 1995).

Endonukleasen

Für die Fragmentierung der DNA in apoptotischen Zellen wurden mehrere Endonukleasen verantwortlich gemacht: Zunächst wurden Ca^{2+} - und Mg^{2+} - abhängige Endonukleasen verschiedener Größe, darunter die DNase I, beschrieben (Hewish 1973; Wyllie 1980b), später eine azidophile, kationenunabhängige DNase II (Barry 1993), und einige weitere wie Cyclophiline und DNase γ (Bortner 1995; Tanuma 1994). Eine Verbindung zwischen der apoptotischen Caspasen-Kaskade und DNA-Fragmentation konnte allerdings erst 1998 durch die Entdeckung einer Caspase-3-aktivierten DNase (CAD) und deren Inhibitor ICAD hergestellt werden (Enari 1998; Sakahira 1998). Ohne die Vermittlung von Effektorcaspasen kann die DNA-Fragmentation darüber hinaus durch die Endonuklease G vorgenommen werden (van Loo 2001).

DNase I

DNase I ist ein Polypeptid aus 260 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 30 kDA. Die neutrale und thermostabile Endonuklease hydrolysiert Doppelstrang-DNA zu 5'-Phospho-Oligonukleotiden mit freien 3'-OH-Enden bei einem pH-Optimum bei pH 7,5. Für ihre volle enzymatische Aktivität benötigt sie die Anwesenheit der divalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} oder Mn^{2+} in mikromolaren Konzentrationen (Mannherz 1995; Peitsch 1993,1995). Zusammen mit Ca^{2+} und Mg^{2+} ruft DNase I Einzelstrangbrüche, zusammen mit Mn^{2+} Doppelstrangbrüche in gereinigter DNA hervor. Hingegen wird die endonukleolytische Aktivität durch chelierende Agenzien, Zn^{2+} , Aurintricarboxylsäure (ATA) und Actin inhibiert (Peitsch 1993, 1995).

DNase I wird im rauhen Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und teils als Enzym sezerniert, teils in den perinukleären Vakuolen gespeichert. Von dort gewinnt sie während der Apoptose bei Anstieg der intrazellulären Konzentration der aktivierenden Kationen Zugang zum Zellkern (Mannherz 1995). Nachdem Hewish und Burgoyne bereits 1973 über ihre

Aktivität berichteten (Hewish 1973), wurde DNase I 1980 von Wyllie mit der apoptotischen DNA-Fragmentierung in Verbindung gebracht (Wyllie 1980b).

In großen Mengen wurde sie in der Niere, der Parotis, im Skelettmuskel, in Darmepithelien, Zungenepithelien und Lymphknoten – vornehmlich Organe mit erhöhtem Zellumsatz – nachgewiesen, während im Herzmuskel, der Milz, dem Pankreas und der Leber keine oder nur geringe Aktivität gefunden wurde (Polzar 1994; Zanotti 1995; Peitsch 1995). Eine starke Enzymtätigkeit wurde darüber hinaus im Blutserum und in menschlicher Samenflüssigkeit festgestellt. Serum- DNase I baute dabei nukleäre DNA auf apoptosetypische Weise in Fragmente von 180 bp und Vielfachen davon ab, während dieses Muster bei Verwendung von gereinigter DNase I nicht auftrat. Deshalb ist vom Einfluss eines zusätzlichen Serumfaktors oder von einer chemischen Modifikation der DNase I im Serum auszugehen (Peitsch 1992).

DNase II

DNase II – eine azidophile Endonuklease mit einem Molekulargewicht von 38 kDA – ist unabhängig von den Kationen Ca^{2+} , Mg^{2+} und Mn^{2+} und kann nicht durch Zn^{2+} inhibiert werden, jedoch von Aminosäure-spezifischen Alkylantien. Außerdem ist sie resistent gegenüber Hitze oder Behandlung mit Proteinase K. Ihr Aktivitätsmaximum erreicht sie bei einem pH von 4,5, doch auch bei pH 6,5 zeigt sie noch Aktivität (Barry 1993). Im Gegensatz zu DNase I produziert sie freie 5'-OH-Enden an der von ihr fragmentierten DNA (Bortner 1995).

DNase II ist ein ubiquitäres Enzym in Säugetierzellen und wird in Lysosomen und im Zellkern vorgefunden. Während Apoptose, findet gleichzeitig zum Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eine Azidifizierung statt. Intrazellulär sinkt der pH auf Werte von pH 6,3, intranukleär sorgt eine H^+ -ATPase zusätzlich für ein Konzentrationsgefälle von weiteren 0,2 pH-Einheiten. Beobachtungen von DNA-Fragmentierung ohne Erhöhung der zellulären Ca^{2+} -Konzentration bestärken die mögliche Beteiligung von DNase II am apoptotischen Geschehen (Barry 1992, 1993).

Weitere DNasen

Weitere Endonukleasen mit einer Ähnlichkeit zu DNase I, jedoch unterschiedlicher Struktur oder Aktivierungsmuster wurden als zusätzliche Kandidaten für die apoptotische DNA-Spaltung gehandelt. Darunter befindet sich eine Ca^{2+} - und Mg^{2+} -abhängige Nuklease mit einem Molekulargewicht (MW) von 18 kDa und einer Verwandtschaft zu Cyclophilinen namens NUC 18 (Bortner 1995); des Weiteren eine Kationen-abhängige Endonuklease (MW 33 kDa) namens DNase γ (Tanuma 1994).

CAD / ICAD

Für die Caspase-aktivierten DNase (CAD) – auch als CPAN (Caspase activated nuclease; Halenbeck 1998) und DFF-40 (DNA fragmentation factor 40 kDa; Liu 1997) bekannt – und deren Inhibitor ICAD konnte ein direkter Bezug zu Signalwegen der Apoptose hergestellt werden und die Lücke zwischen Caspasen-Kaskade und Fragmentierung der DNA geschlossen werden. (Enari 1998, Sakahira 1998, McIlroy 1999).

Die 40kDa große, basische CAD besteht aus 343 Aminosäuren und besitzt intrinsische DNase-Aktivität, ist jedoch im Zytosol lebender Zellen mit dem sauren ICAD komplexiert. In diesem Zustand blockiert ICAD die DNase-Tätigkeit von CAD, hingegen nicht jene von DNase I und DNase II (Enari 1998). An zwei definierten Stellen kann Caspase 3 ICAD spalten, wodurch CAD aus dem Komplex freigesetzt wird, Zugang zum Zellkern findet und dort ihre hochspezifische endonukleatische Aktivität entfalten kann (Enari 1998, McIlroy 1999).

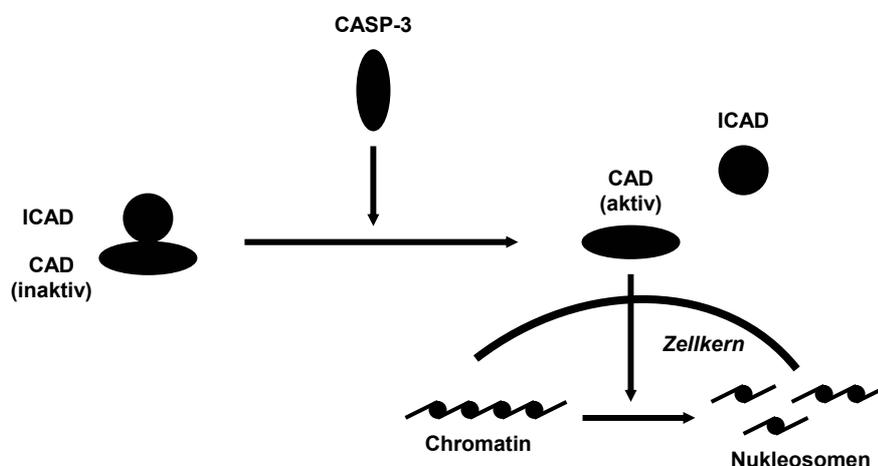


Abbildung 30: Aktivierung von CAD (modifiziert nach Enari 1998)

ICAD liegt in 2 Formen vor: Die lange Version ICAD-L ist ein 45 kDa Protein aus 331 Aminosäuren; bei der kürzeren ICAD-S sind die Aminosäuren 1 bis 261 identisch. In ihren enzymatischen Eigenschaften unterscheiden sich die beiden Formen nur geringfügig. CAD-induzierte DNA-Spaltung konnte durch Aktivierung des Fas-Signalwegs und ebenso durch direkt DNA-schädigende Agenzien wie UV- und γ -Strahlen, Etoposid sowie durch Entzug von Wachstumsfaktoren erzielt werden (Enari 1998; McIlroy 1999).

Endonuklease G

Unabhängig von der Vermittlung durch aktivierte Caspasen kann die DNA-Fragmentation durch die mitochondriale Endonuklease G erfolgen. Das 30 kDa große Protein wird nach Stimulation des mitochondrialen Apoptosesignalwegs durch die Spaltung von Bid zusammen mit Cytochrom C ins Zytoplasma freigesetzt und bewirkt die Apoptose-typische oligonukleosomale Fragmentierung des Chromatins. Durch Bcl 2 kann die Ausschüttung der Endonuklease G und des Cytochroms C aus den Mitochondrien inhibiert werden (van Loo 2001).

2.2.3 Zirkulierende Nukleinsäuren im Plasma und Serum

Zirkulierende Nukleinsäuren wurde im Plasma und Serum bereits 1948 von Mandel und Metais mittels einer Perchlorsäure-Fällung nachgewiesen (Mandel 1948). Bei gesunden Personen beträgt die vorgefundene DNA-Konzentration zwischen 10 und 30 ng/ml (Steinman 1975; Sorenson 1994; Anker 2000); bei Patienten mit SLE und anderen entzündlichen Erkrankungen wurden höhere Werte gemessen (Shapiro 1983; Amoura 1997); Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen wiesen noch höhere Level an zirkulierender DNA auf (Leon 1977; Shapiro 1983; Maebo 1990; Fournie 1995).

Generell kann zirkulierende DNA in Form von freier, ungebundener DNA, komplexiert mit Histonen als Nukleosomen, assoziiert mit anderen Proteinen oder eingeschlossen in apoptotische Körperchen („apoptotic bodies“) vorkommen. Die genauen Anteile der einzelnen Komponenten können interindividuell wie auch intraindividuell variieren. In Untersuchungen in Plasma von SLE- und Tumorpatienten konnte gezeigt werden dass der überwiegend Teil der DNA in Fragmenten von 150-200 bp, 400 bp, 600 bp und 800 bp als Mono- und Oligonukleosomen vorliegt (Rumore 1990; Giacona 1998; Jahr 2001).

Bei Gesunden und Patienten mit benignen Erkrankungen können diese nukleosomalen Komplexe von Lymphozyten, von nukleären Blut- oder anderen Körperzellen stammen, bei Patienten mit Tumoren zusätzlich von Tumorzellen, die Anschluss an das Gefäßsystem gefunden haben. Prinzipiell können sie passiv im Rahmen des apoptotischen oder onkotischen Zelltods sowie von lysierten zirkulierenden Tumorzellen freigesetzt oder aktiv von lebenden Zellen sezerniert werden (Stroun 2000; Lichtenstein 2001).

An einzelnen Zellen konnte zwar beobachtet werden, dass die zellulären Bestandteile, unter anderem auch bereits fragmentierte DNA, in apoptotische Körperchen verpackt werden und von Makrophagen und Nachbarzellen phagozytiert und abgebaut werden. Allerdings scheint dieses System für physiologische Verhältnisse ausgelegt und unter Situationen eines massiv gesteigerten Zelltodvorkommens überlastet zu sein. Die Nukleosomen werden somit vermutlich aus apoptotischen Zellen oder Körperchen in den extrazellulären Raum freigesetzt und können dann Zugang zum Gefäßsystem finden (Kornbluth 1994; Rumore 1990; Franek 1991; Giacona 1998; Stroun 2000; Jahr 2001; Lichtenstein 2001).

Inzwischen wurden eine Reihe von Zelltodformen mit unterschiedlichen apoptotischen und onkotischen Anteilen identifiziert, die mit einem variierenden Grad an intrazellulärer Chromatinfragmentierung einhergehen (Leist 2001). Zwar werden bei gezielter Apoptose-Auslösung das vermehrte Vorkommen von mono- und oligonukleosomaler DNA, bei Onkose-Induktion die überwiegende Präsenz von großen DNA-Stücken im Plasma berichtet (Jahr 2001), doch dürfte es sich bei der Komplexität der normalerweise *in vivo* gleichzeitig ablaufenden Zelldegradierungsvorgänge an verschiedenen Zelltypen anhand der Art der zirkulierenden DNA-Fragmente nur schwer rekonstruieren lassen, welcher Todesform genau jene Zellen erlagen, aus denen sie freigesetzt wurden.

Komplizierend kommt hinzu, dass auch eine spontane und aktive Freisetzung nukleosomaler DNA aus Lymphozyten *in vitro* sowie im Tiermodell beobachtet wurde. In einem *in-vitro*-Experiment bewegte sich die Konzentration der freien DNA im Medium bei unterschiedlich langer Inkubationszeit in engen Grenzen und pendelte sich auf diese Konzentration auch in einem neuen Medium schnell ein, was auf einen homöostatischen Mechanismus schließen lässt (Anker 1975; Stroun 2000).

Eine weitere theoretische Quelle stellen lysierte zirkulierende Tumorzellen oder Mikrometastasen dar. Allerdings können sie allein die hohen Konzentrationen für zirkulierende Nukleosomen bei Tumorpatienten nicht erklären (Sorenson 1994; Stroun 2000).

Metabolismus der zirkulierenden Nukleosomen

Da bei Hämodialyse große Mengen von DNA in mono- oder oligonukleosomaler Struktur freigesetzt und in die Blutbahn geschwemmt, die mit Abschluss der Behandlung abrupt endet, kann die Elimination der Nukleosomenkonzentration im Blut direkt verfolgt werden. Dabei wurde eine Halbwertszeit von nur vier Minuten beobachtet (Rumore 1992). Genauere Differenzierungen ergaben, dass etwa 90% der Nukleosomen während dieser initialen, schnellen Phase, der restliche Anteil in einer zweiten, langsameren Phase entfernt werden (Burlingame 1996). Im Tiermodell wurde außerdem mit zunehmender Menge injizierter Mononukleosomen eine Verlangsamung der Eliminationsgeschwindigkeit festgestellt (Gauthier 1996). Dies deutet auf einen sättigbaren Beseitigungsmechanismus der zirkulierenden Nukleosomen hin.

Die Leber dient als Hauptaufnahmeort für die aus der Blutbahn entfernte nukleosomale DNA. Dort waren in einer Studie von Gauthier *et. al.* zehn Minuten nach Injektion über 70% der bereits eliminierten DNA lokalisiert. Hingegen sind Niere, Milz, Magen, Darm, Herz und Lunge mit Aufnahmeraten von unter 1% für die Beseitigung von zirkulierenden Nukleosomen nur von zweitrangiger Bedeutung (Gauthier 1996).

Generell wurde eine Abhängigkeit der Eliminationsgeschwindigkeit von der Zusammensetzung zirkulierender DNA beobachtet: Einzelstrang-DNA wurde schneller abgebaut als Doppelstrang-DNA, besonders dann, wenn diese mit Proteinen assoziiert war (Emlen 1982, 1984). Zudem wurde die Beseitigung von nukleosomaler DNA durch die zusätzliche Gabe von Einzelstrang-DNA verzögert, was auf einen gemeinsamen, sättigbaren Entsorgungsmechanismus zurückzuführen sein könnte (Gauthier 1996).

Für den Abbau und die Elimination der zirkulierenden DNA kommen mehrere Systeme in Frage:

- Bereits in der Blutbahn kann eine Degradierung durch Endonukleasen erfolgen,
- die DNA kann durch Antikörper komplexiert und präzipitiert werden,
- Makrophagen und andere Mitglieder des Retikulo-Endothelialen Systems (RES) können die DNA phagozytieren, oder
- der Abbau und die Verwertung der DNA findet in der Leber statt.

Durch DNasen werden im Blut größere DNA-Protein-Komplexe gespalten und die aus den Komplexen herausragende DNA abgebaut. Danach erfolgt erst die weitere Zerstückelung der besser konservierten DNA-Anteile. Während die Eliminationsrate der großen Komplexe in etwa derjenigen freier DNA entspricht, geht die Beseitigung der bereits verdauten DNA deutlich verzögert vonstatten, so dass möglicherweise die Erkennung von exponierter DNA für die entsorgenden Instanzen eine wesentliche Rolle spielt (Emlen 1988).

Eine gesteigerte Endonukleasenaktivität wurde – vermutlich korrespondierend mit einer erhöhten DNA-Konzentration – im Plasma von Patienten mit akutem Nierenversagen, fortgeschrittenen Lebererkrankungen, akuter hämorrhagischer Pankreatitis sowie mit Mamma-karzinom, HNO- und urogenitalen Tumoren beobachtet. Verringerte Aktivität fand sich hingegen bei Patienten mit SLE (Macanovic 1997).

Darüber hinaus kann zirkulierende DNA, sofern sie nicht rasch und effizient abgebaut und entfernt wird, antigenen Charakter annehmen und die endogene Antikörper-Produktion anregen, wie bei Patienten mit SLE festgestellt wurde (Bell 1990; Machanovic 1997; Amoura 1997; Pisetzky 1997). Neben Anti-DNA-Antikörpern (Tan 1966) und Anti-Histon-Antikörpern wurden schließlich auch Anti-Nukleosomen-Antikörper im Serum und Plasma von SLE-Patienten nachgewiesen, die aufgrund ihres frühen Auftretens eine führende Rolle in der Pathogenese einnehmen (Amoura 1994; Burlingame 1994; Monestier 1996; Rosen 1999).

Unspezifisch wird extrazellulären DNA – sei es im Gewebeverband, als frei zirkulierende oder in apoptotische Körperchen verpackte DNA – auch von Zellen des Retikulo-Endothelialen System (RES) wie Monozyten, Makrophagen, gewebständige Histozyten, dendritische Zellen der Epidermis und der Darmmukosa sowie phagozytierende Endothelzellen eliminiert. Diese Zellen besitzen eine große Anzahl von Lysosomen, die eine

Reihe von Nukleasen und Proteasen, darunter auch eine saure, der DNase II ähnliche Endonuklease, enthalten, die die Zerstückelung der aufgenommenen DNA vornehmen. Die Histon-Oktamere hingegen werden durch verschiedene Cathepsin-Proteasen abgebaut (Odaka 1999; Savill 2000).

In der Leber wird Einzelstrang-DNA fast vollständig über einen sättigbaren Mechanismus beseitigt, wobei die DNA an der Oberfläche von nicht-parenchymalen Leberzellen wie den Kupffer'schen Sternzellen abgebaut wird. Doppelsträngige, mit Histonen assoziierte DNA findet sich nur zu etwa 70% in der Leber wieder. Dabei werden zumindest die Histon-Komponenten von nicht-parenchymalen Leberzellen internalisiert und intrazellulär zerlegt. Das Schicksal der protein-gebundenen DNA ist noch nicht geklärt: Möglicherweise werden die kompletten Nukleosomen rezeptorvermittelt in die nicht-parenchymalen Leberzellen aufgenommen und dort abgebaut oder die DNA wird an deren Zelloberfläche fragmentiert, während die Histone intrazellulär zerkleinert werden (Gauthier 1996).

Akute-Phase Proteine wie das C-reaktive Protein (CRP) und das Serum-Amyloid P (SAP) liegen bei bakteriellen Infektionen häufig in hohen Konzentrationen vor und können dann die Elimination der zirkulierenden Nukleosomen verzögern. Ob dieser Effekt auf einer kompetitiven Verdrängung an den Rezeptoren der auch für den Katabolismus der Akut-Phase Proteine zuständigen Leberzellen oder auf einer direkten Interaktion beruht, ist bisher noch nicht geklärt (Burlingame 1996). Allerdings ist die Bindungsfähigkeit der Akut-Phase Proteine an die positiv geladenen Histon-Komponente bekannt, wodurch sie diese neutralisieren und ihre Affinität zum hepatischen Rezeptor schwächen können (Du Clos 1991, 1996; Burlingame 1996).

Bedeutung von zirkulierenden Nukleosomen

Aufgrund ihrer antigenen Eigenschaften und der Produktion von Anti-Nukleosomen-Antikörpern wurde bereits ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von zirkulierenden Nukleosomen und einigen Autoimmunerkrankungen wie SLE nachgewiesen (Fournie 1988; Amoura 2000).

Auch für die Generation von Metastasen könnten sie eine wesentliche Rolle spielen. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass zirkulierende Tumor-DNA von gesunden Zellen aufgenommen werden kann und diese Zielzellen durch die transfizierten aktiven Onkogene in maligne Zellen transformieren kann (Garcia-Olmo 1999).

Zirkulierende Nukleosomen können zudem zum Schutz von Tumorzellen gegenüber der körpereigenen Abwehr beitragen: Sie werden vor allem von Tumorzellen, aber auch von Lymphozyten und natürlichen Killerzellen Rezeptor-vermittelt aufgenommen (Le Lann 1997, Hengartner 2001), prozessiert und blockieren die durch natürlichen Killerzellen induzierte Lyse von Tumorzellen. Gegenüber freier DNA oder Histonen allein sind Nukleosomen um ein Mehrfaches wirkungsvoller (Le Lann 1997).

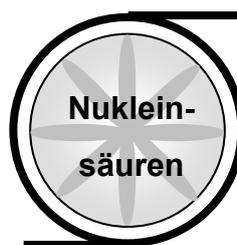
Differenzierung der zirkulierenden Nukleinsäuren

Das Interesse an quantitativen Analysen über zirkulierende Nukleinsäuren bei verschiedenen Erkrankungen war lange Zeit begrenzt, da aus ihrer Präsenz nicht auf ihren spezifischen Ursprung geschlossen werden konnte. Mit der Entdeckung neoplastischer Charakteristika der DNA im Plasma von Tumorpatienten in Form einer reduzierten Strang-Stabilität der DNA Ende der 80er Jahre durch M Stroun und P Anker (Stroun 1987, 1989) und der Etablierung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als neue molekulare Untersuchungsmethode in den 90er Jahren erlebte die Forschung an zirkulierenden Nukleinsäuren einen enormen Aufschwung (Jen 2000). Mittlerweile wurden eine Reihe qualitativer, tumorspezifischer Veränderungen sowie weitere Formen zirkulierender Nukleinsäuren identifiziert und bei verschiedenen malignen Erkrankungen untersucht:

Abbildung 31: Qualitative Veränderungen und Erscheinungsformen zirkulierender Nukleinsäuren

Qualitative Veränderungen

tumorspezifische Mutationen ←
 Mikrosatelliten-Instabilität ←
 Verlust der Heterozygotität ←
 Epigenetische Phänomene ←



Erscheinungsformen

➔ Nukleäre DNA in nukleosomaler Konfiguration
 ➔ RNA
 ➔ Mitochondriale DNA
 ➔ Fetale DNA in maternalem Blut
 ➔ Bakterielle DNA
 ➔ Parasitäre DNA
 ➔ Virale DNA

Tumorspezifische Mutationen

Mutationen sind ein im Tumorgewebe häufig beobachtetes Phänomen, die auf ineffiziente Reparatursysteme hinweisen und zur Entwicklung und Progression der Erkrankung durch Aktivierung von Onkogenen oder Deaktivierung von Suppressorgenen beitragen. Als charakteristische Mutationen, die in vielen Tumoren vorzufinden sind, gelten Veränderungen der p53-, Bcl2-, c-myc- oder ras-Gene. Aufgrund der gewöhnlich nur an wenigen, spezifischen Stellen auf Codon 12 auftretenden Mutationen eignet sich besonders das ras-Onkogen zu vergleichenden Untersuchungen (Sorenson 2000; Hayashi 2000; Kopreski 2000). Ras-Mutationen werden am häufigsten in Pankreas- (Sorenson 1994; Yamada 1998; Mulcahy 1998; Castells 1999), kolorektalen (Anker 1997), gastrointestinalen (Mulcahy 2000; Sorenson 2000), und Bronchial-Karzinomen (Cooper 1997; Schneider 2000) sowie chronisch myeloischen Leukämien (Vasioukhin 1994) angetroffen und sind schon in frühen Stadien vorhanden (Wagener 1999).

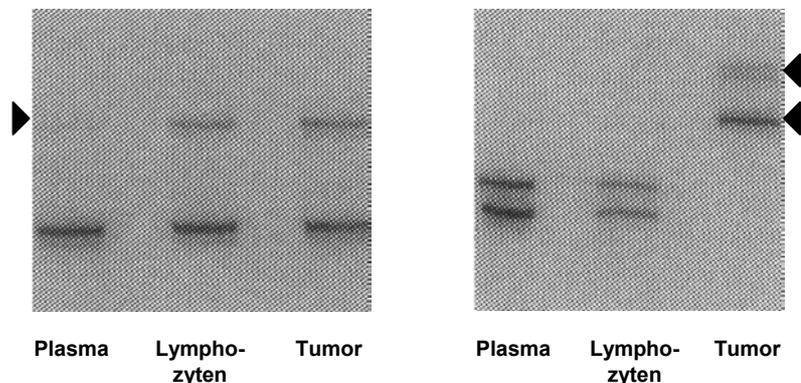
Mikrosatelliten-Instabilität

Neben den kodierenden können auch nicht-kodierende Genabschnitte von Mutationen betroffen sein. Besonders anfällig dafür sind kurze

repetitive Sequenzen ohne funktionelle Bedeutung, so genannte Mikrosatelliten, die beim Entlanggleiten der DNA-Polymerase an der zu kopierenden DNA während der Replikationsphase verloren gehen oder zusätzlich

eingefügt werden. In normalen Zellen werden diese Lesefehler durch Mismatch-Reparatursysteme bereinigt; in Tumorzellen sind diese oft blockiert oder geschädigt. Dadurch werden die veränderten Loci nicht korrigiert; vielmehr erhalten und vermehren sich die fehlerhaften Sequenzen im Laufe der kommenden Zellgenerationen.

Abbildung 32: Mikrosatelliten-Instabilität (Chen 1996)



So werden mit der Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) zwei wesentliche Eigenschaften einer Tumorzelle weitergegeben:

- die genetische Instabilität (aufgrund der fehlenden Reparatur) und
- die Klonalität (durch die Verbreitung identischer Mutationen).

Während bei normalen Zellen eine spezifische Mikrosatellitensequenz nur sehr selten mutiert ist und durch PCR-Amplifikation nicht erfasst wird, ist sie in Tumorzellen aufgrund deren Klonalität zu einem weit höheren Prozentsatz vorhanden und kann leicht detektiert werden (Bevilaqua 1998). Derartige Mikrosatelliteninstabilitäten beschrieben 1996 als erste Chen beim Bronchialkarzinom (Chen 1996) und Nawroz beim HNO-Karzinom (Nawroz 1996). Seither wurden sie mehrfach bestätigt und ein Zusammenhang mit einer Reihe weiterer Karzinome hergestellt – so beim Bronchial- (Sozzi 1999; Bruhn 2000; Gonzales 2000), HNO- (Coulet 2000), Nierenzell- (Goessl 1998), Blasen- (Steiner 1997) und Mammakarzinom (Mayall 1999; Shaw 2000) sowie beim Melanom (Nakayama 2000).

Verlust der Heterozygotität

Jenseits der Feststellung von Mutationen innerhalb der Mikrosatelliten-Sequenzen kommt diesen Genabschnitten auch Bedeutung bei der Markierung von speziellen DNA-Regionen zu, in welchen sich oft Tumorsuppressorgene befinden. Bei der Replikation der DNA gehen allerdings diese markierenden Gensequenzen weit häufiger verloren, als Mutationen in den Suppressorgenen selbst auftreten. Da meist nur ein Allel betroffen ist, wird dieser Vorgang als Verlust der Heterozygotität (loss of heterozygosity = LOH) bezeichnet (Bevilaqua 1998).

Sind keine bekannten „Hot Spots“ mit Mutationen von Onkogenen oder Suppressorgenen vorhanden, eignen sich die Mikrosatelliteninstabilität und der Verlust der Heterozygotität als alternative klonale Marker für den Nachweis von Tumor-DNA im Plasma und Serum (Sidransky 1997; Chen 1999; Anker 1999, 2001a; Lo 2001a; Johnson 2002).

Epigenetische Phänomene

Neben tumorspezifischen, genetischen Mutationen können auch Veränderungen bezüglich der DNA-Methylierung zu Funktionsverlusten von Suppressorgenen oder zur Aktivierung von Onkogenen führen. In Tumor-DNA wird häufig eine Hypermethylierung von so genannten „CpG Inseln“ beobachtet, die sich in der Nähe von Promotoren befinden und diese in ihrer Gen-regulierenden Funktion stören. Dadurch kommt es zum Ausfall wichtiger Tumor-

abwehrender Systeme, die an der Suppression von Onkogenen, an DNA-Reparaturprozessen, an der Progression des Zellzyklus und der Apoptose-Induktion beteiligt sind (Herman 2000a).

In gesunden Zellen sind die seltenen CpG-Regionen außerhalb der „Inseln“ gewöhnlich stark methyliert, während die CpG-Inseln frei von Methylgruppen sind. So können in den daran anschließenden Genen Transkriptionsvorgänge stattfinden. In Tumorzellen kehren sich die Verhältnisse um: Anstelle der CpG-Regionen sind dort die nahe am Promotor liegenden CpG-Inseln hypermethyliert, was eine Hemmung der Transkription nach sich zieht. Darüber hinaus kann auch die Methylgruppen-übertragende DNA-Methyltransferase (DMTase) in ihrer Konzentration, ihrer Aktivität oder ihrer Bindungsspezifität verändert sein und eine generelle oder partielle Hypermethylierung bewirken. Im Gegensatz zu Mutationen sind diese Effekte jedoch reversibel: Nach medikamentöser Entfernung der Methylgruppen von den CpG-Inseln sind die angekoppelten Promotoren wieder vollständig wirksam (Herman 2000a,b).

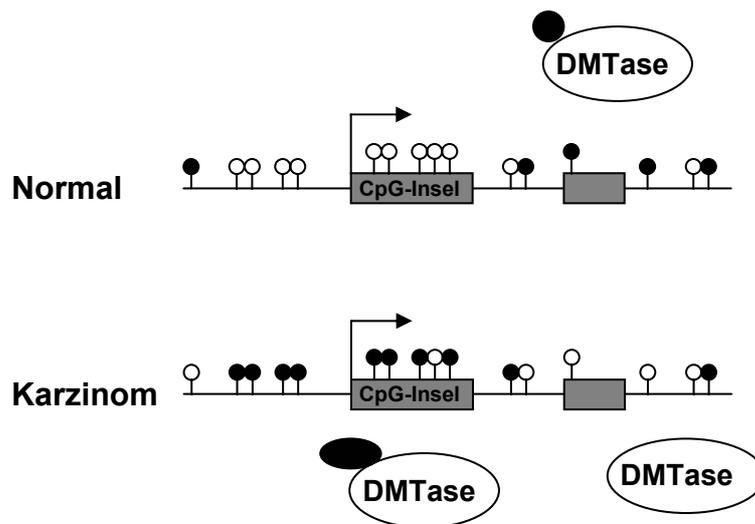


Abbildung 33: Methylierungsmuster bei gesunden und Karzinomzellen
(● methyliert; ○ nicht methyliert; modifiziert nach Herman 2000a)

Ausgedehnte Untersuchungen wurden an DNA aus dem Tumorgewebe und aus Blutproben von Patienten mit verschiedenen soliden Tumoren – wie Nierenzell-, Kolon-, Magen-, HNO-, Bronchial-, Prostata-, Cervix-, Schilddrüsen-Karzinomen – und hämatologischen Neoplasien vorgenommen (Baylin 1998, 2000; Esteller 1999, 2001; Herman 2000a,b; Jones 2001).

Dabei wurden Methylierungen in CpG-Inseln in der Nähe von Promotoren Zellzyklus-regulierender Gene wie Rb, CDKN2A, p16, p14 und p15, von Tumorsuppressorgenen wie p73, APC und BRCA1, von DNA-Reparaturgenen wie GSTP1, MGMT und hMLH1 sowie

von Genen, die in Zelladhärenz, Apoptose und Metastasierung involviert sind, wie CDH1, TIMP3 und DAPK gefunden. Bei einigen anderen, strukturell oder funktionell verwandten Genen wie p53 oder BRCA2 wurden keine typischen Promotor-CpG-Inseln oder Hypermethylierungen angetroffen.

Hypermethylierungen an den oben aufgezählten Regionen traten bei verschiedenen malignen Erkrankungen in typischen Mustern auf. So konnte ein Methylierungs-Profil humaner Tumorzellen erstellt werden, das für primär- oder differentialdiagnostische Zwecke eingesetzt werden kann (Esteller 2001).

Verschiedene Erscheinungsformen der zirkulierenden Nukleinsäuren

Die bisherige Erörterung quantitativer und qualitativer Eigenschaften zirkulierender DNA bezog sich auf nukleäre DNA in nukleosomaler Konfiguration. Zahlreiche akute und chronische, benigne Erkrankungen entzündlicher, autoimmuner und traumatischer Art waren bisher Gegenstand von Untersuchungen; ebenso maligne Erkrankungen wie gastrointestinale, Bronchial-, Pankreas- und Mammakarzinome jeweils bei Diagnose und im Therapieverlauf. Generell korrelierte das quantitative Vorkommen der DNA häufig mit der Akuität und dem Stadium der Krankheit; allerdings wurden auch gegenläufige Tendenzen berichtet (Leon 1977; Shapiro 1983; Maebo 1990; Sorenson 1994; Fournie 1995; Amoura 1997; Lo 1999a,b;2000a).

Qualitative Veränderungen im Sinne von Mutationen, Mikrosatelliten-Instabilität, Verlust der Heterozygotität und Hypermethylierungen wurden insbesondere an DNA von Tumorpatienten vorgefunden. Als mögliche Einsatzgebiete dieser Untersuchungen bieten sich an:

- die Bestimmung der Erstdiagnose,
- die Bestimmung der Differentialdiagnose,
- das Therapiemonitoring,
- die Beurteilung der Therapieeffizienz
- die Erkennung einer residualen Erkrankung
- die Erkennung eines Rezidivs sowie
- die Abschätzung der Prognose.

Neben tumorspezifischer DNA konnten auch deren Transkripte nicht nur in den Tumorzellen selbst sondern auch im Plasma und Serum nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um verschiedene Messenger-RNA, zum Beispiel Tyrosinase-RNA, Telomerase-RNA, 5T4-RNA und Mammaglobin-RNA (Kopreski 1999, 2001; Chen 2000; Poon 2000b; Gal 2001). Die Detektion zirkulierender tumorspezifischer RNA schließt die Lücke zwischen der Beschreibung genetischer Veränderungen und der Bestimmung tumorspezifischer Proteine.

Mitochondriale DNA ist im Vergleich zur nukleären DNA kürzer, ringförmig und nicht mit Histon-Proteinen assoziiert. Durch spezifische genetische Fingerabdrücke kann sie identifiziert und auch im Serum und Plasma quantifiziert werden. Außerdem können auch an ihr Mutationen und tumorspezifische Charakteristika erkannt und zu der Art und dem Stadium der Grunderkrankung in Beziehung gesetzt werden (Fliss 2000; Sidransky 2000).

Fetale DNA wurde schon vor einer Dekade im maternalen Blut festgestellt. Sie gelangt insbesondere durch Transfusion von fetalen Erythroblasten in den mütterlichen Blutkreislauf (Bianchi 1990; 2001, Sekizawa 2000). In dem für sie fremden Milieu gehen viele Erythroblasten auf apoptotischem Weg zugrunde und setzen ihre DNA frei. Andere überleben teilweise sogar noch mehrere Jahrzehnte nach der Schwangerschaft und führen zum Bild eines molekularen Mikrochimärismus (Lambert 2001). Der wiederum kann Ursache von Autoimmunerkrankungen wie SLE, Sklerodermie oder Thyreoiditis sein, die gehäuft bei Frauen nach durchlebter Schwangerschaft auftreten (Bianchi 1992, 1998, Lo 1997). In einigen Fällen wurde beobachtet, dass die fetalen Zellen in Organe einwandern und zu Parenchymzellen ausdifferenzieren. Dabei ist nicht entscheidend, ob die Schwangerschaft erfolgreich verlaufen ist und zur Geburt eines Kindes führte oder nicht.

Erhöhte Konzentration von fetaler DNA wurde in Verbindung mit verschiedenen pathologischen Situationen beobachtet: Mütter, die eine Präeklampsie oder eine Frühgeburt entwickelten, hatten deutlich höhere Werte an fetaler DNA im Plasma; außerdem Mütter von Feten mit einem Down-Syndrom (Leung 1998; Bianchi 1998, 2001, Lo 1997, 2000c; Poon 2000a; Zhong 2001).

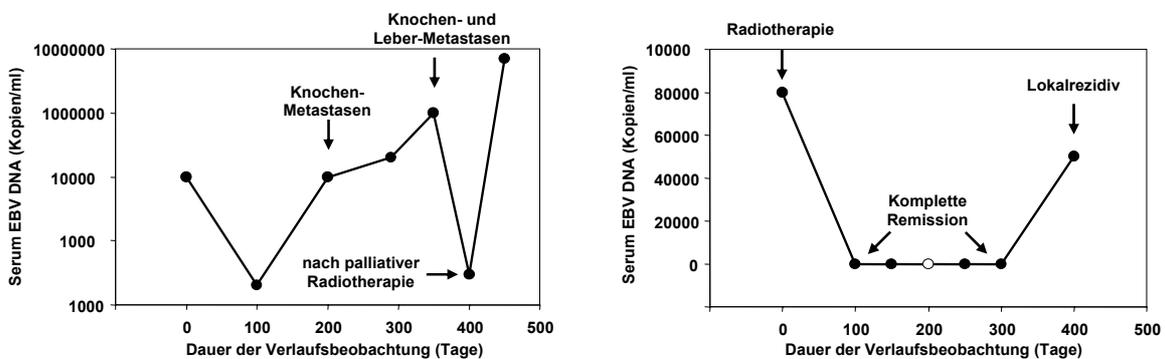
Auch bakterielle DNA kann im Blut aufgrund spezifischer Sequenzen nachgewiesen werden, jedoch wurde bisher noch keine Korrelation zu infektiösen Krankheitsbildern hergestellt.

Aus dem Blut von Patienten mit Malaria tropica wurde DNA von Plasmodium falciparum isoliert. Dabei wurde Plasmodien-DNA bei allen erkrankten Personen vorgefunden, bei einer Personen sogar noch vor dem positiven mikroskopischen Befund. Kontrollpersonen waren hingegen frei von DNA (Gal 2001).

Bei Personen mit Virus-assoziierten Tumorerkrankungen wurden erhöhte Konzentrationen der entsprechende Virus-DNA in der Zirkulation nachgewiesen, im Besonderen:

- DNA des humanen Papilloma-Virus (HPV) bei Patientinnen mit Cervix-Karzinom
- DNA des Epstein-Barr-Virus (EBV) bei Patienten mit nasopharyngealen Karzinomen und Lymphomen

Bei letzteren wurde auch die Kinetik während einer radiotherapeutischen Behandlung ermittelt. Dabei sanken die Werte in fast allen Fällen ab und blieben bei Personen mit einer anhaltenden Remission auf einem konstant niedrigen Niveau. Beim Auftreten eines Rezidivs oder von Metastasen stiegen sie auf ähnlich hohe Werte wie zum Diagnosezeitpunkt wieder an; dabei ging der Anstieg oft mehrere Monate der bildgebenden Rezidivdiagnostik voraus (Lo 1999b).



Abbildungen 34 und 35: EBV-DNA bei Patienten mit nasopharyngealem Karzinom (modifiziert nach Lo 1999b)

Eine genauere Analyse der Daten zur Identifizierung von Patienten mit einer erhöhten Radiosensitivität sowie zur Abschätzung der Prognose stehen noch aus. Auch mit anderen EBV-assoziierten Tumorerkrankungen wie beim Magenkarzinom (Lo 2001b), Non-Hodgkin's Lymphom (Lei 2002) sowie beim Mamma-, Bronchial-, Colon- und Prostatakarzinom (Grinstein 2002) wurden quantitative EBV-DNA-Bestimmungen zur Diagnosefindung vorgenommen und ähnliche Ergebnisse erzielt.

3 Methodischer Hintergrund des Nukleosomentests

Im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen sollte eine methodische Überprüfung der Anwendbarkeit des Cell Death Detection – ELISAs^{plus} in flüssigen Medien sowie die Validierung der klinischen Aussagekraft an unterschiedlichen Patientenkollektiven vorgenommen werden. Als methodische Voraussetzungen für den Einsatz einer diagnostischen Methode bei klinischen Fragestellungen waren dabei insbesondere zu berücksichtigen:

1. Standardisierte Testdurchführung
2. Spezifische Nachweisbarkeit des nachzuweisenden Agens (analytische Spezifität)
3. Sensitive Nachweisbarkeit des nachzuweisenden Agens im entsprechenden Medium (analytische Sensitivität)
4. Konstante Nachweisbarkeit innerhalb eines Testansatzes (Intraassay- Impräzision)
5. Konstante Nachweisbarkeit innerhalb verschiedener Testansätze (Interassay- Impräzision)
6. Quantifizierbarkeit des nachzuweisenden Agens (Standardkurve, Einheit)
7. Vergleich verschiedener Matrices (Serum und Plasma)
8. Stabilität des zu untersuchenden Agens im entsprechenden Medium
9. Langzeitstabilität und Lagerungsbedingungen des Mediums
10. Störende Einflüsse durch intravitale Faktoren (in vivo)
11. Störende Einflüsse durch postvitale Faktoren (in vitro)
12. Störende Einflüsse durch die Testdurchführung (in vitro)

3.1 Immunchemische Nachweis- und Messverfahren

Grundlage für immunchemische Nachweismethoden und Messverfahren ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Dabei gehen Antigen und Antikörper eine spezifische, reversible Bindung ein. Nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip bindet der jeweilige spezifische Antikörper an ein Epitop des Antigens. Hochmolekulare Antigene, wie auch Nukleosomen, besitzen meist mehrere Epitope.

Präzipitationstechniken bildeten den Anfang bei der Entwicklung von immunchemischen Nachweismethoden, später kamen die Antigen-Antikörper-Bindung in der Nephelometrie und der Turbidimetrie dazu. Bei diesen Methoden liegt die untere Nachweisgrenze bei etwa 10 -

100 ng/ml. Für ihre Anwendung ist die Ausgewogenheit des Größenverhältnisses Antigen/Antikörper entscheidend.

Durch die Markierung von Antigenen oder Antikörpern mit fluoreszierenden Gruppen, später auch chemilumineszenten Gruppen und Enzymen sowie Radioisotopen wurde das Spektrum der analytischen Möglichkeiten enorm erweitert. Da durch die Markierung auch kleinere Mengen analytisch erfaßt wurden, konnte die Nachweisgrenze herabgesetzt werden. Außerdem konnten mit zunehmender Unabhängigkeit der Methoden von der Molekülgröße Nachweismethoden für kleine wie auch für sehr große Antigene entwickelt werden.

Bei enzymimmunchemischen Testsystemen sind spezifische Markerenzyme an die im Überschuss zugesetzten Antigene oder Antikörper gekoppelt. Nach Zugabe eines geeigneten Substrats katalysieren diese Enzyme eine charakteristische Reaktion, deren Endprodukt dann photometrisch leicht erfaßt und gemessen werden kann. Typische Markerenzyme sind die saure Meerrettich-Peroxidase, die alkalische Phosphatase und die β -Galaktosidase. Dabei kann der Enzym-Immuno-Assay (EIA) als kompetitive Variante von dem nicht-kompetitiven Enzym-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) unterschieden werden.

Zur Verbesserung der Spezifität werden in einem Testsystem häufig zwei Antikörper eingesetzt, die das zu detektierende Antigen an zwei verschiedenen Epitopen erkennen und in „Sandwich“-Manier daran binden. Nach Reaktion eines Substrats mit der entsprechenden Markierung eines der Antikörper (AK) können die Komplexe quantifiziert werden.

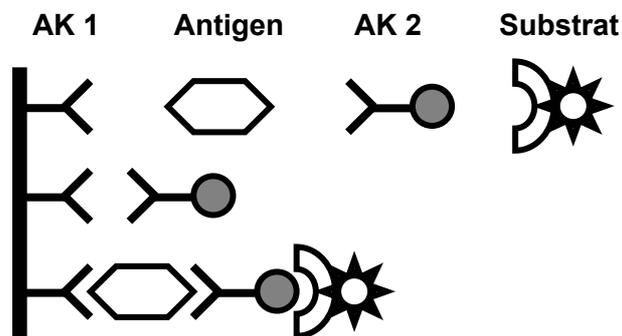


Abbildung 36: Prinzip eines Sandwich-Assays mit zwei Antikörpern

In den Tests können sowohl mono- als auch polyklonale Antikörper zum Einsatz kommen. Klassischerweise erfolgt die Produktion von polyklonalen Antikörpern durch Inokkulation

von entsprechenden Antigenen auf Labortiere und nachfolgender Gewinnung der Seren, welche infolge der Immunantwort der Tiere erhöhte Antikörpertiter aufweisen.

Die Spezifität der Antikörper trägt entscheidend zur Qualität des Testsystems bei. Polyklonale Antikörper binden an verschiedene Epitope und sind deshalb bei geringen zu erfassenden Konzentrationen von Vorteil, allerdings zu Lasten der Antigenspezifität. Monoklonale Antikörper binden hingegen nur an spezifische Epitope und erreichen somit eine besseren Antigenspezifität (Thomas 1998; Dörner 1998).

3.2 Methodische Grundlagen des Ausgangstests

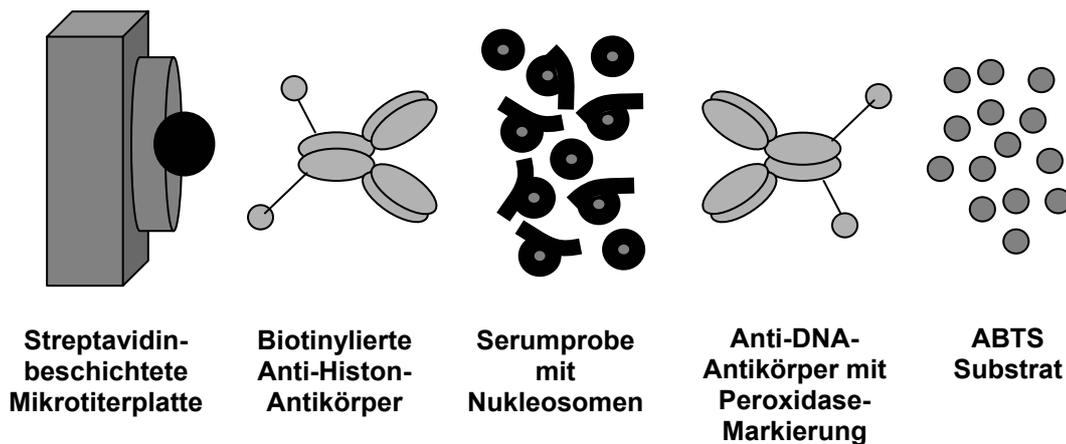
Für die hier dargestellten Untersuchungen wurde der Cell Death Detection - ELISA^{plus} (=CDDE-Test) von Roche Diagnostics, Mannheim, (Katalog-Nummer 1774 425) bezogen.

Testprinzip des Cell Death Detection – ELISAs^{plus}

Beim Cell Death Detection - ELISA^{plus} handelt es sich um einen nicht-kompetitiven Enzymimmunoassay, bei dem zwei monoklonale Maus- Antikörper nach dem oben beschriebenen quantitativen Sandwich-Prinzip zur Anwendung kommen.

Der Festphasen-Antikörper ist gegen die Proteinkomponente der Nukleosomen, die Histone, gerichtet, der mit Peroxidase markierte Antikörper gegen DNA. Somit ist das Vorhandensein von beiden Nukleosomen-Komponenten, Histone und DNA, Voraussetzung für die Detektion der zu bestimmenden Agenzien.

Im Testansatz wird zu einer Serumprobe mit den darin enthaltenen Mono- und Oligonukleosomen ein Puffergemisch mit definierten Konzentrationen der beiden Antikörper zugegeben. Während der Festphasenantikörper reversibel an die Histon-Komponente bindet und diese an die Wand der Mikrotiterplatte fixiert, reagiert der Detektionsantikörper mit der DNA-Komponente. Nach Beseitigung aller ungebundenen Antikörper durch mehrere Waschschrte, wird dem Testansatz ein Substrat im Überschuss zugesetzt, welches durch die an den Anti-DNA-Antikörpern gekoppelte Peroxidase umgesetzt wird und zu einem Farbumschlag führt. Dieser ist somit direkt proportional zu der im Antikörper-Sandwich detektierten Nukleosomenmenge. Bei einer geeigneten Wellenlänge kann der Grad des Farbumschlags photometrisch quantifiziert und über eine Kalibrationskurve die Konzentration der Nukleosomen ermittelt werden.

Abbildung 37: Testprinzip des Cell Death Detection – ELISAs^{plus}

Verwendete Materialien

Die verwendeten Materialien sind in zum Teil bereits gebrauchsfertiger Form im Testkit enthalten oder werden auf folgende Weise vor der Testdurchführung vorbereitet:

- PBS (Phosphate Buffer Saline): Gebrauchsfertige Lösung, die 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, x 2 H₂O und 0,2 g KH₂PO₄ in einem Liter H₂O enthält und auf pH 7,4 justiert ist.
- Inkubationspuffer: Gebrauchsfertige Lösung, die PBS mit 1% Rinder Serum Albumin, 0,5% Tween 20 und 1 mM EDTA enthält.
- Anti-Histon-Biotin: Tablette eines lyophilisierten und biotinylierten Anti-Histon-Antikörper Panels, die in 450 µl bidestilliertem H₂O aufgelöst wird.
- Anti-DNA-POD: Tablette eines lyophilisierten und mit Peroxidase markierten Anti-DNA-Antikörper Panels, die in 450 µl bidestilliertem H₂O aufgelöst wird.
- Immunoreagens: 1/20 Volumenanteile der biotinylierten Anti-Histon Antikörper und 1/20 Volumenanteile der Peroxidase markierten Anti-DNA Antikörper werden vorsichtig mit 18/20 Volumenanteilen Inkubationspuffer homogenisiert.
- Substratpuffer: Gebrauchsfertige Lösung, die 1047,5 mg Zitronensäure, 62,5 mg Natriumperborat x 3 H₂O, 9,77 mg CaCl₂ x 2 H₂O, 1335 mg Na₂HPO₄ x 2 H₂O in 125 ml enthält und auf pH 4,5 justiert ist.
- Substrat: Drei Tabletten mit 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-sulfonat) (ABTS), die unmittelbar vor Gebrauch in 15 ml Substratpuffer gelöst werden und lichtgeschützt gelagert werden müssen.
- Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte und Adhäsiv-Folien

Antikörper

Beim CDDE-Test werden monoklonale, aus Mäusen gewonnene Antikörper verwendet: Die Anti-Histon-Antikörper stammen aus dem Mausklon H11-4 und besitzen eine spezifische Affinität für die Histone H1, H2a, H2b, H3 und H4. Die Anti-DNA-Antikörper wurden im Mausklon M-CA-33 gezüchtet und erkennen Einzel- und Doppelstrang-DNA.

Durch das Sandwichverfahren werden nur nukleäre Mono- und Oligonukleosomen aus eukaryotischen Zellen erfaßt. Sowohl in Mitochondrien, prokaryotischen Zellen, als auch in Bakterien und Viren ist die DNA nicht mit Histonen assoziiert und liegt deshalb auch nicht in Nukleosomenform vor. Auch RNA ist nicht an Histone gebunden und wird so nicht detektiert (Plattner 1997).

Vorgehensweise bei der Testdurchführung

Die Testdurchführung erfolgte nach der von den Herstellern empfohlenen Vorgehensweise (<http://www.biochem.roche.com>):

Je 20 µl des zu testenden Probenmaterials werden in eine Vertiefung einer Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert. Dazu werden 80 µl eines Immunoreagens', bestehend aus biotinylierten Anti-Histon-Antikörpern, Peroxidase-markierten Anti-DNA-Antikörpern und Inkubationspuffer, gegeben, mit einer Adhäsivfolie bedeckt und für 2 Stunden auf einem Mikrotiterplatten-Rüttler bei 500 g inkubiert.

Während dieser Inkubationszeit reagiert der Anti-Histon-Antikörper mit der Histon-Komponente der Nukleosomen und fixiert den Komplex mittels des Biotins an die Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte. Außerdem bindet der Anti-DNA-Antikörper an die DNA-Komponente der Nukleosomen.

Nach Entfernen der noch ungebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen mit je 300 bis 400 µl Inkubationspuffer werden die fixierten Komplexe mit 100 µl ABTS (2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-sulfonat)) inkubiert, die Mikrotiterplatte mit einer Adhäsivfolie verschlossen und bei 250 g gerüttelt. Das Substrat reagiert mit der Peroxidase-Markierung der Anti-DNA-Antikörper und bewirkt eine zu diesen Antikörpern proportionale Farbveränderung, die photo-metrisch bei $\delta=405$ nm gegen die Substratlösung als Blank

(Referenzwellenlänge $\delta=492$ nm) quantifiziert wird. Während der Testhersteller für die Inkubation des ABTS-Substrats eine „ausreichende Farbentwicklungszeit von ca. 10 bis 20 min“ angibt, wurde diese von uns auf 30 min standardisiert (siehe unten).

Interpretation mittels eines Anreicherungsfaktors

Bei der ursprünglichen Version des Cell Death Detection - ELISAs^{plus} handelt es sich um ein semiquantitatives Messverfahren. Im Gegensatz zu quantitativen Methoden, welche Ergebnisse in genauen Konzentrationsangaben liefern, wird hier der gemessene zu einem negativen oder positiven Kontrollwert in Relation gesetzt. In den Testanweisungen wird das Mitführen einer Negativkontrolle und die Berechnung eines Anreicherungsfaktors (AF) gemäß folgender Formel empfohlen:

$$\text{AF} = \frac{\text{mU der Probe}}{\text{mU der nicht behandelten Negativprobe}}$$

mU = Absorption (optische Dichte)

Da semiquantitative Verfahren in der klinischen Routine wegen ihrer eingeschränkten Aussagekraft nur sehr selten eingesetzt werden und aufgrund einer mangelhaften Inter-Assay Impräzision des CDDE-Tests (siehe unten) wurde in den hier vorgestellten Untersuchungen auf die Interpretation mittels eines Anreicherungsfaktors verzichtet und stattdessen eine Kalibrationskurve etabliert, deren Herstellung im folgenden Kapitel beschrieben ist.

Zum Nachweis von Nukleosomen können zelluläre Fraktionen und Zellüberstände nach Zellyse-Behandlung in das Testsystem eingesetzt werden. Daneben können nach Herstellerangaben theoretisch auch körpereigene Flüssigkeiten wie Serum, Plasma und Urin zur Quantifizierung von Nukleosomen verwendet werden.

3.3 Modifikationen und Standardisierung des Ausgangstests

Die nur semiquantitativen Ergebnisse sowie die ungenügende Vergleichbarkeit von an verschiedenen Tagen durchgeführten Testläufen limitierten den Einsatz der ursprünglichen Version des Cell Death Detection - ELISAs^{plus} für klinische Fragestellungen und wurden auch von anderen Arbeitsgruppen moniert (Leist 1994). Diese Mängel ließen sich auf folgende Ursachen zurückführen:

1. Das Fehlen einer definierten Farbentwicklungszeit nach Zugabe des ABTS-Substrats oder alternativ das Fehlen eines Stop-Reagens‘.
2. Die Verwendung eines Anreicherungs-faktors zur Interpretation der Ergebnisse, der sich auf eine Negativkontrolle mit einer sehr hohen Interassay-Impräzision bezog.
3. Das Fehlen einer Kalibrationskurve zur direkten Quantifizierung der Nukleosomen.

Standardisierung der Farbentwicklungszeit

Da der CDDE-Test ein manuelles Testverfahren ist, treten bei den einzelnen Pipettierschritten leichte Verzögerungen auf. Diese bekommen besonders bei der Zugabe des ABTS Substrates Gewicht, da sie je nach Positionierung einer Probe auf der Mikrotiterplatte zu unterschiedlich langen Inkubationszeiten führen. Beträgt die Pipettierzeit für alle 96 Vertiefungen der Mikrotiterplatte etwa 90 Sekunden, resultiert daraus bei einer Farbentwicklungszeit von 10 Minuten eine Differenz von circa 15 % zwischen der ersten und letzten Vertiefung. Um eine vertretbare Messungenauigkeitsgrenze von 5 % nicht zu überschreiten und die Gesamt-Testzeit dennoch möglichst niedrig zu halten, wurde deshalb die ABTS- Inkubationszeit auf 30 Minuten festgelegt.

Eine definierte Farbentwicklungszeit kann auch durch eine Unterbrechung mittels eines Stop-Reagens‘ erreicht werden. Da die Messung zu einem festgelegten Zeitpunkt denselben Effekt erzielt, wurde diese Maßnahme für die Austestungsphase gewählt.

Standardkurve

Für eine direkte Quantifizierung der Nukleosomen mit hoher Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Testläufen wurde eine Kalibrationskurve aus nukleosomenreichem Referenzmaterial hergestellt, welches auf folgende Weise gewonnen wurde:

Von drei gesunden Blutspendern wurden je 10 ml EDTA-Blut gemischt und bei 37 °C und einer CO₂-Sättigung von 5% über 24 Stunden inkubiert. Bei dem auch als „Mixed Lymphocyte Reaction“ (MLR) bekannten Prozess, induzieren die Lymphozyten in den jeweils als fremd erkannten Lymphozyten der anderen Spender Apoptose, wodurch große Mengen an Nukleosomen freigesetzt werden (O’Flaherty). Nach einem Zentrifugationsschritt, wurde der nukleosomenreiche Überstand dekantiert und lyophilisiert. Bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C war das Material mindestens 12 Monate stabil.

Nach Resuspension in 500 μ l bidestilliertem H₂O wurde das Referenzmaterial vor der Durchführung des Tests mit Inkubationspuffer so verdünnt, dass nach der definierten Farbentwicklungszeit von 30 Minuten die niedrigste Verdünnungsstufe Extinktionswerte von etwa 2500 Milli-Units (mU) optischer Dichte (OD) erreichte, was im oberen Messbereich des Photometers liegt. Die entsprechende Verdünnung des für die Austestung vorliegenden Standardmaterials wurde mit einem Volumenanteil Serum und 23 Volumenanteilen Inkubationspuffer bestimmt. Durch weitere Verdünnungsschritte (1:24, 1:32, 1:48, 1:64, 1:96, nur Inkubationspuffer) wurde eine lineare Standardkurve erstellt, die durch den Ursprung des Koordinatensystems lief.

Messeinheit

Als Messeinheiten der Skalierung wurden so genannte Arbitrary Units (AU) eingeführt. Diese Units geben eine an der Standardkurve orientierte, relative Konzentrationsangabe der Nukleosomen im getesteten Material an. Der höchste Standardwert erhielt definitionsgemäß einen relativen Wert von 1000 AU. Nach der definierten ABTS-Inkubationszeit von 30 Minuten entsprachen somit 1000 AU einer optischen Dichte von 2500 mU, 500 AU entsprachen 1250 mU, 250 AU entsprachen 625 mU und so weiter.

Während die Werte optischer Dichte mit Farbentwicklungszeit zunahmen und trotz deren Festlegung auf 30 Minuten in mehreren Testläufen variieren konnten, waren die Arbitrary Units aufgrund ihres direkten Bezug zur Standardkurve stabiler. Insgesamt besaß die Standardkurve folgende Kenngrößen:

Tabelle 9: Kenngrößen der Standardkurve

Standard	Verdünnung mit Inkubationspuffer	Optische Dichte nach 30 min	Arbitrary Units
Standard 1	1:24	2500 mU	1000 AU
Standard 2	1:32	1875 mU	750 AU
Standard 3	1:48	1250 mU	500 AU
Standard 4	1:64	938 mU	375 AU
Standard 5	1:96	625 mU	250 AU
Standard 6	Inkubationspuffer	0 mU	0 AU

Probenmaterialien

Da für diese Untersuchungen die Bestimmung der Nukleosomen in einem möglichst einfach zu gewinnendem Probenmaterial angestrebt wurde, kamen als Matrices Serum, Plasma und Urin – in weiterem Sinne Liquor, Aszites und Pleurapunktat – in Frage. Für die methodischen Untersuchungen wurden einige dieser Materialien ausgetestet (siehe unten). In den klinischen Untersuchungen kam dann Serum zur Anwendung.

Gewinnung und Vorbehandlung des Probenmaterials

Aus der Cubitalvene wurde möglichst hämolysefrei 10 ml Blut mittels eines Einmal-Blutabnahmebestecks in ein mehrere Kaolin-Kugeln enthaltendes Röhrchen (Fa. Kabe) entnommen, welches im klinischen Routinealltag für Serumbestimmungen verwendet wird.

Nach einem möglichst zügigen Transport ins Zentrallabor wurde längstens ein bis zwei Stunden nach Blutabnahme die Vollblutprobe für 10 min bei 3000 g zentrifugiert und das überstehende Serum dekantiert. Unverzüglich wurden 900 µl dieses Serums mit 100 µl einer 100 millimolaren Ethylendiamin-Tetraacetat-Säure (EDTA)-Lösung versetzt, gut gemischt und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Die EDTA-Lösung wurde nach folgender Rezeptur hergestellt:

- | | |
|--|-------------|
| 1. Auflösen eines 5 mM TRIS-Puffers in bidestilliertem H ₂ O | 605 mg/l |
| 2. Zugabe von 154 mM physiolog. NaCl-Lösung (0,9%) | 9 000 mg/l |
| 3. Zugabe von 100 mM EDTA | 37 200 mg/l |
| 4. Sorgfältiges Homogenisieren, bis alle festen Bestandteile gelöst sind. | |
| 5. Einstellen des Puffers auf pH 8,0 durch Titration mit NaOH. | |
| 6. Luftdicht abschließen und bei 4 °C kühl lagern (Haltbarkeit circa 12 Monate). | |

Möglichst bald darauf, zumindest jedoch noch am selben Tag wurden die so behandelten Seren aliquotiert, in 2 ml Plastikgefäße (Fa. Greiner) gefüllt und bei –20 °C tiefgefroren. Insgesamt wurden je drei Aliquots mit EDTA-versetztem Serum und drei weitere mit nativem Serum für Nachbestimmungen mit mindestens 300 µl Inhalt eingefroren. Innerhalb von sechs Monaten wurden jeweils eines der „behandelten“ Aliquots aufgetaut und darin die Nukleosomenkonzentration bestimmt.

Vorbereitung der Proben für die Testdurchführung

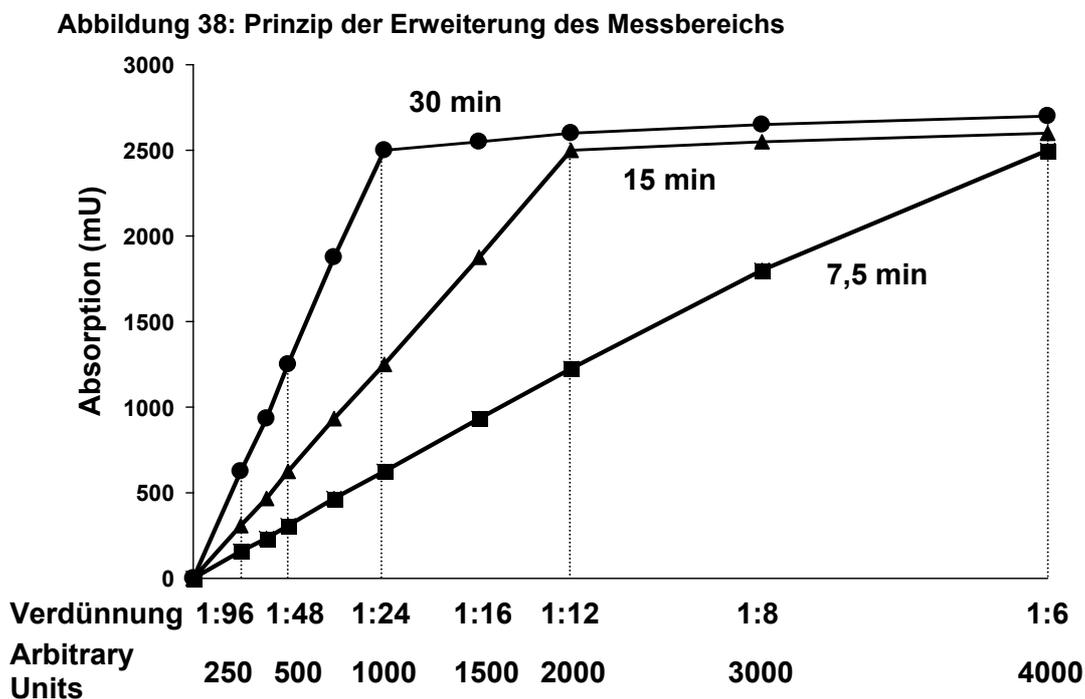
Vor Einsetzen der Probe ins Testsystem wurde sie für drei Sekunden mit dem Vortex homogenisiert, mit Inkubationspuffer in einem Volumenverhältnis von 1:4 verdünnt (20 µl Serum und 60 µl Inkubationspuffer) und nochmals für drei Sekunden gevortext. Von dieser verdünnten Serumprobe wurden dann 20 µl in die Mikrotiterplatte pipettiert.

Mehrfachbestimmungen

Für alle methodischen Untersuchungen sowie den ersten Teil der klinischen Untersuchungen, bei dem die Serumwerte von Personen mit verschiedenen Erkrankungen verglichen wurden, wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Aufgrund der sehr guten Intra-Assay-Impräzision (siehe unten) wurde bei den Verlaufsuntersuchungen auf Einzelbestimmungen übergegangen. Allerdings wurde darauf geachtet, dass alle Werte eines vollständigen, individuellen Verlaufs innerhalb einer Testdurchführung gemessen wurden, um die Inter-Assay Variabilität als mögliche Ursache von Ungenauigkeiten innerhalb eines Verlaufs auszuschließen.

Erweiterung des Messbereichs

Die meisten der vermessenen Serumproben befanden sich im normalen Messbereich bis 1000 AU. Durch eine Erweiterung des Messbereichs konnten weitere Verdünnungen und Nachmessungen der wenigen Seren mit höheren Werten umgangen werden: Dazu wurden zusätzliche Standards mit niedrigeren Verdünnungen (1:6, 1:8, 1:12, 1:16) eingesetzt und zusätzliche photometrische Bestimmungen nach 7,5 und 15 Minuten durchgeführt.



Aufgrund der direkten Proportionalität der Verdünnungsschritte innerhalb der Standardkurve erreichte die 1:6 Verdünnung nach 7,5 Minuten Farbentwicklungszeit Absorptionen von etwa 2500 mU optischer Dichte, die 1:12 Verdünnung nach etwa 15 Minuten.

Durch die zusätzlichen Messungen nach 7,5 und 15 Minuten wurde der Messbereich um den Faktor 2 (bei der 1:12-Verdünnung) auf 2000 AU und den Faktor 4 (bei der 1:6-Verdünnung) auf insgesamt 4000 AU ausgedehnt. Zwar fielen bei den kürzeren Substrat-Inkubationszeiten die Verzögerungen durch die manuellen Pipettierschritte stärker ins Gewicht, jedoch konnte bei den ohnehin sehr hohen Werten die Verzerrungen in Kauf genommen werden – umso mehr, da dadurch ein neuer Testansatz mit einem zusätzlichen Interassay-Impräzisionsfehler vermieden wurde.

3.4 Bewertung der analytischen Qualität

Präzision

Die Präzision ist die Kenngröße zufällig auftretender Fehler, welche durch technische Mängel während der Analyse zustande kommen. Leichte Ungenauigkeiten beim Pipettieren, Temperaturschwankungen bei Inkubationsschritten und minimale Photometerabweichungen können nicht vollständig ausgeschlossen werden und führen zu Abweichungen in beide Richtungen des zu erwartenden Sollergebnisses.

Die Präzision, beziehungsweise die aus den Fehlern resultierende Impräzision, wird ausgehend von der Gauss'schen Normalverteilung durch den Variationskoeffizienten VK beschrieben, welcher aus der Standardabweichung s und dem Mittelwert \bar{x} einer Messreihe bestimmt wird. Als prozentuales Maß wird damit die relative Streuung oder Varianz der Messwerte um den Mittelwert angegeben und kann als Vergleichsparameter zwischen Mittelwerten verschiedener Höhe dienen:

$$\text{VK (\%)} = \frac{s * 100}{\bar{x}}$$

Demnach besitzt ein Testsystem mit einer hohen Präzision und somit einer geringen Streubreite um den Mittelwert einen niedrigen VK-Wert.

Intraassay-Präzision

Die Präzision kann auf die mehrmalige Bestimmung einer Probe innerhalb eines Testdurchlaufs bezogen werden (Präzision in der Serie). Sie wird dann als Repetierbarkeit bezeichnet. Idealerweise werden mehrere Proben-Pools mit unterschiedlich hohen Konzentrationen des Analyten gebildet, welche jeweils mindestens zehnmal in einem Testansatz vermessen werden. Die Streuung um den Mittelwert wird nach obiger Formel durch den Intraassay-VK ausgedrückt. Aufgrund größerer prozentualer Schwankungen bei niedrigen Analyten-Konzentrationen sinkt die Präzision im unteren Messbereich ab; die Varianz nimmt dementsprechend zu.

Interassay-Präzision

Die Streuung zwischen verschiedenen Messreihen (Präzision von Tag zu Tag) wird durch den Interassay-VK angegeben. Dieser ist ein Maß für die Reproduzierbarkeit des Testes. Verschiedene Proben-Pools werden in mehrere (mindestens zehn) Teste eingesetzt und aus den Messwerten die Varianzen errechnet. Wegen der größeren Anzahl potentieller Fehlermöglichkeiten ist die Interassay-Präzision in der Regel geringer als die Intraassay-Präzision.

Richtigkeit und Vergleichbarkeit

Die Richtigkeit einer Methode kann mittels Referenzmaterialien oder -methoden festgestellt werden. Außerdem kann durch die Zugabe definierter Mengen an Reinsubstanz der Linearitätsbereich sowie die Wiederfindungsrate geprüft werden. Allerdings gelten solche Additionsversuche nur als Näherungen an den „richtigen“ Wert. In engem Zusammenhang damit steht die Vergleichbarkeit zweier Methoden, wenn parallel an verschiedenen Testgeräten oder mit bereits etablierten Verfahren gearbeitet wird (Dörner 1998).

4 Methodischer Hintergrund der klinischen Evaluation

4.1 Patienten

Für die klinische Evaluierung des Nukleosomentests wurden insgesamt Seren von 590 Personen ausgewertet, davon 527, die im Zeitraum vom August 1996 bis zum Januar 1999 im Klinikum Großhadern in Behandlung waren.

4.1.1 Gesunde Personen

Als Kontrollgruppe dienten Seren von 63 freiwilligen, gesunden Blutspendern, die hinsichtlich klinischer und klinisch-chemischer Unauffälligkeit überprüft wurden. Die Einschlusskriterien für diese Kontrollgruppe wurden folgendermaßen definiert:

- C-reaktives Protein (CRP): < 0,5 mg/dl
- Kreatinin: < 1,1 mg/dl
- Gamma Glutamyl-Transferase (GGT): < 28 U/l
- Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT): < 24 g/dl
- Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT): < 17 g/dl
- unauffälliges Blutbild

Des Weiteren wurde anhand eines standardisierten Fragebogens auf frühere und potentielle, aktuelle Erkrankungen sowie auf Allergien und die Art der Lebensführung (Rauchen, Alkohol, Stress) eingegangen. Die Altersverteilung reichte von 20 bis 60 Jahren (Mittelwert: 34,6 Jahre, Median: 32 Jahre). Es nahmen 34 Frauen und 29 Männer an der Studie teil. Zur Beurteilung der Variabilität der individuellen Werte wurden zusätzlich bei fünf dieser Probanden zweiwöchentlich Blutabnahmen über einen Zeitraum von vier Wochen vorgenommen.

4.1.2 Patienten mit benignen Erkrankungen

Als weiteres Kontrollkollektiv wurden 109 Seren von Patienten mit benignen Erkrankungen untersucht, darunter 38 Personen mit benignen gastrointestinalen Erkrankungen, 13 mit benignen pulmonalen Erkrankungen, 37 mit benignen gynäkologischen Erkrankungen und 21 mit anderen benignen Erkrankungen. Die Mittelwert der untersuchten Personen betrug 51,5 Jahre, der Median 53 Jahre (Bandbreite: 13 bis 90 Jahre). 67 der 109 Personen waren weiblichen, 42 männlichen Geschlechts. Die einzelnen Patientengruppen schlüsselten sich wie folgt auf:

Tabelle 10: Patienten mit benignen Erkrankungen

Benigne Erkrankungen	Anzahl der Patienten	Benigne Erkrankungen	Anzahl der Patienten
1. Benigne pulmonale Erkrankungen	13	3. Benigne gynäkologische Erkrankungen	37
Akute Bronchitis	3	Endometriose	5
Atelektase	1	Ovarialzyste	26
BOOP-Syndrom	1	Thekom	1
Lungenabszeß	2	Uterus myomatosus	3
Lungenfibrom	1	Zervizitis	2
Mukoviszidose	1		
Pneumonie	1		
Z.n. Lungentransplantation	3		
2. Benigne gastrointestinale Erkrankungen	38	4. Andere benigne Erkrankungen	21
Adenom	3	Abszess	1
Adhäsionen	2	Endokarditis	1
Akute Blutung	1	Gonarthrit	1
Analfistel	1	Hämangiom	1
Appendizitis	1	Hyperthyreose	1
Cholangitis	3	Kardiomyopathie	1
Cholezystolithiasis	5	KHK	3
Colitis	2	Lipom	2
Divertikulitis	3	Morbus Werlhof	1
Duodenalfistel	1	Osteitis	2
Hämorrhoiden	1	Osteomyelitis	1
Ileitis	2	Post-Partal-Schock	1
Leberzirrhose	1	Pseudotumor cerebri	1
Leistenhernie	2	Struma nodosa	4
Narbenhernie	2		
Pankreatitis	3		
Primär biliäre Zirrhose	1		
Subileus	3		
Ulcus ventriculi	1		

Aus diesen Patienten wurden 50 mit akuten Infekten nach Wertlage des C-reaktiven Proteins in fünf Gruppen (jeweils N = 10) eingeteilt und mit den Nukleosomenwerten korreliert:

Gruppe I:	CRP ≤ 1 mg/dl
Gruppe II:	1 mg/dl < CRP ≤ 5 mg/dl
Gruppe III:	5 mg/dl < CRP ≤ 10 mg/dl
Gruppe IV:	10 mg/dl < CRP ≤ 20 mg/dl
Gruppe V:	20 mg/dl < CRP

Verlaufsbeobachtung während antibiotischer Therapie

11 dieser Patienten wurden darüber hinaus über einen Zeitraum von etwa einer Woche im Verlauf während antibiotischer Therapie beobachtet. Dabei wurde bei den täglichen Routineblutabnahmen die Kinetik der Nukleosomen bestimmt und mit den CRP- und Leukozytenwerten in Beziehung gesetzt.

4.1.3 Patienten mit malignen Erkrankungen

Ferner wurden Serien von 418 Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen untersucht. Die Altersverteilung der Patienten reichte von 16 bis 91 Jahren (Mittelwert (MW): 59,8 Jahre, Median: 61 Jahre). Es befanden sich darunter 217 Frauen (W) und 201 Männer (M).

Tabelle 11: Patienten mit malignen Erkrankungen

Maligne Tumore	Anzahl der Patienten	Alter		Geschlecht	
		MW	Bandbreite	W	M
Bronchial-Karzinom	60	60,7	37-84	16	44
Kolorektales Karzinom	79	62,5	39-84	19	60
Kolon-Karzinom	30	61,2	40-75	8	22
Rektum-Karzinom	28	63,2	39-84	5	23
Sigma-Karzinom	21	63,5	40-82	6	15
Andere gastrointestinale Karzinome	49	62,1	24-86	21	28
Ösophagus-Karzinom	8	56,3	46-78	1	7
Magen-Karzinom	17	65,4	28-86	8	9
Hepatozelluläres Karzinom	10	58,2	24-79	4	6
Gallenblasen-Karzinom	3	65,7	63-70	3	0
Pankreas-Karzinom	11	64,0	41-79	5	6
Mamma-Karzinome	61	57,7	32-83	61	0
Ovarial-Karzinom	45	59,1	26-81	45	0
Andere gynäkologische Karzinome	20	52,0	22-91	20	0
Korpus-Karzinom	4	71,5	60-91	4	0
Zervix-Karzinom	15	44,3	22-81	15	0
Vulva-Karzinom	1	88,0	88	1	0
Lymphom	40	58,3	27-85	18	22
Non-Hodgkin's-Lymphom	28	63,3	27-82	12	16
Hodgkin's-Lymphom	8	44,6	27-71	5	3
Plasmozytom	4	51,0	33-85	1	3
Nierenzell-Karzinom	20	59,2	20-85	10	10
Prostata-Karzinom	17	64,6	48-86	0	17
Andere Karzinome	27	56,4	16-78	7	20
HNO-Karzinom	8	56,0	22-76	0	8
AML	3	52,7	39-72	2	1
Histiozytom	2	50,5	44-57	0	2
Karzinoid	3	70,7	64-76	0	3
Leiomyosarkom	2	66,0	65-67	0	2
Osteosarkom	1	59,0	59	1	0
Melanom	3	33,0	16-51	1	2
Schilddrüsen-Karzinom	2	66,0	54-78	1	1
Adenokarzinom unklarer Genese	3	60,7	40-75	2	1

Blutproben wurden jeweils vor der operativen Primärtherapie beziehungsweise vor Chemo- oder Radiotherapie entnommen, um die spontane Nukleosomenkonzentration im Serum zu erfassen.

Verlaufsbeobachtung nach operativer Therapie

Von diesen Patienten wurden 18 über einen Zeitraum bis zu 14 Tagen nach operativer Entfernung des Tumors beobachtet und die Nukleosomenkinetik im Serum bestimmt. Je nach Art des Eingriffs wurden die postoperativen Blutabnahmen zu unterschiedlichen Zeitpunkten vorgenommen; es lagen jedoch mindestens drei, im Mittel 4,7 Blutentnahmen im Verlauf pro Patient vor.

Tabelle 12: Patienten mit malignen Tumoren nach Operation

Maligne Tumore	Anzahl der Patienten	Alter		Geschlecht		Stadium			
		MW	Bandbreite	W	M	1	2	3	4
Bronchial-Karzinom	5	60,2	37-83	1	4	3	2	0	0
Kolorektales Karzinom	6	64,3	53-81	0	6	0	0	3	3
Magen-Karzinom	3	66,3	55-77	1	2	1	2	0	0
Pankreas-Karzinom	1	57	57	0	1	0	0	1	0
Mamma-Karzinom	1	50	50	1	0	1	0	0	0
Nierenzell-Karzinom	1	72	72	0	1	0	1	0	0
Prostata-Karzinom	1	61	61	0	1	0	0	1	0

Verlaufsbeobachtung während Chemotherapie

Aus der Gruppe der Patienten mit soliden Tumoren wurden außerdem 62 Patienten, die eine Chemotherapie erhielten, im Verlauf beobachtet. Bei ihnen kamen je nach Tumorart, -stadium und Progredienz unterschiedliche Therapieschemata zur Anwendung, die meist aus mehreren ein- bis fünftägigen Therapiezyklen bestanden, die durch mehrwöchige Therapiepausen unterbrochen wurden.

Da die Patienten teilambulant in der onkologischen Tagesklinik behandelt wurden, konnten die Blutentnahmen nicht immer engmaschig erfolgen. Idealerweise wurde jeweils vor Therapiebeginn (I) sowie am zweiten (II), und vierten Tag (III) und eine Woche (IV) nach der ersten Dosisgabe Blut entnommen, danach wöchentlich oder vor Beginn des nächsten Therapiezyklus (V-XII).

Tabelle 13: Patienten mit malignen Tumoren während Chemotherapie

Maligne Tumore	N	Alter & Geschlecht				Stadium				Therapieart		
		MW	Bandbreite	W	M	1	2	3	4	Prim	Rez	pOP
Bronchial-Karzinom	13	56,4	41-72	6	7	0	0	1	12	10	3	0
Nicht-kleinzellig (NSCLC)	6		41-72	4	2	0	0	1	5	4	2	0
Kleinzellig (SCLC)	7		55-66	2	5	0	0	0	7	6	1	0
Kolorektales Karzinom	25	59,4	40-79	6	19	0	0	8	17	3	11	11
Kolon-Karzinom	15		45-75	4	11	0	0	2	13	3	8	4
Sigma-Karzinom	6		40-79	2	4	0	0	5	1	0	0	6
Rektum-Karzinom	4		57-66	0	4	0	0	1	3	0	3	1
Lymphom	17	52,2	27-72	4	13	0	9	5	3	13	4	0
Hodgkin's Lymphom	6		27-58	3	3	0	5	1	0	5	1	0
Non-Hodgkin's Lymphom	9		51-72	1	8	0	4	2	3	7	2	0
Plasmozytom	2		33-44	0	2	0	0	2	0	1	1	0
Sonstige Karzinome	7	59,6	41-71	0	7	0	0	0	7	2	5	0
Ösophagus-Karzinom	2		46-56	0	2	0	0	0	2	2	0	0
Pankreas-Karzinom	3		41-71	0	3	0	0	0	3	0	3	0
Sarkom	2		65-67	0	2	0	0	0	2	0	2	0

(N=Anzahl der Patienten, Prim=Primärtherapie, Rez=Rezidivtherapie, pOP=postoperative Therapie)

Gleichzeitig wurden – nach Möglichkeit – vor jedem Zyklus die für die einzelnen Tumorarten jeweils relevanten Tumor-assoziierten Antigene bestimmt. Diese sind im Folgenden mit den Anwendungsgebieten, den Methoden und den Grenzwerten aufgelistet:

Tabelle 14: Charakteristika der untersuchten Tumor assoziierten Antigene

Tumor-assoziierte Antigene	Anwendungsgebiet	Methode	Grenzwert
Carcino-Embryonales Antigen (CEA)	Nicht-kleinzelliges Bronchial-Karzinom Kleinzelliges Bronchial-Karzinom Kolorektales Karzinom Pankreas-Karzinom Ösophagus-Karzinom	AxSym (Abbott)	3,0 ng/ml
Cytokeratin 19 Fragmente (CYFRA 21-1)	Nicht-kleinzelliges Bronchial-Karzinom Ösophagus-Karzinom	ElecSys 2010 (Roche)	2,0 ng/ml
Neuronen-spezifische Enolase (NSE)	Kleinzelliges Bronchial-Karzinom Sarkom	Kryptor (Pharmazia)	12,5 ng/ml
Pro-Gastrin-releasing Peptide (ProGRP)	Kleinzelliges Bronchial-Karzinom	ELISA (ALSI / IDL)	30 pg/ml
Cancer Antigen 19-9 (CA19-9)	Kolorektales Karzinom Pankreas-Karzinom	ElecSys 2010 (Roche)	37 U/ml
Squamous Cancer Cell Antigen (SCC)	Ösophagus-Karzinom	Kryptor (Pharmazia)	2,5 ng/ml

Verlaufsbeobachtung während Radiotherapie

Des Weiteren wurden 16 Patienten während primärer oder sekundärer Radiotherapie im Therapieverlauf beobachtet. Das Therapieschema sah bei den meisten Patienten eine tägliche Bestrahlungseinheit mit einer Dosis von je 2 Gy über einen Zeitraum von 4 bis 6 Wochen (mit Therapiepausen an den Wochenenden) vor, so dass insgesamt 40 bis 60 Gy appliziert wurden. Dabei variierte das Bestrahlungsvolumen je nach Tumorart und -größe.

Tabelle 15: Patienten mit malignen Tumoren während Radiotherapie

Maligne Tumore	N	Alter & Geschlecht				Stadium				Therapieart		
		MW	Bandbreite	W	M	1	2	3	4	Prim	Rez	POP
Bronchial-Karzinom	6	65,5	38-84	1	5	0	0	6	0	2	4	0
HNO-Karzinom	4	64,5	55-76	0	4	0	1	3	0	2	1	1
Lymphom	4	62,8	52-73	1	3	0	2	1	1	1	3	0
Kolorektales Karzinom	2	58,0	48-68	0	2	0	0	2	0	0	0	2

(N=Anzahl der Patienten, Prim=Primärtherapie, Rez=Rezidivtherapie, pOP=postoperative Therapie)

Blutentnahmen wurden jeweils vor der ersten Bestrahlung (I) sowie drei (II), sechs (III), 24 (IV), 72 (V) Stunden und eine Woche (VI) nach Beginn der Radiatio vorgenommen, im Folgenden zudem jeweils vor Beginn der ersten wöchentlichen Bestrahlungseinheit (VII-XII).

4.2 Statistische Methoden

4.2.1 Bewertung der klinisch-diagnostischen Qualität

Für die Validierung der klinisch-diagnostischen Qualität eines Testes sind von Bedeutung:

1. Die diagnostische Spezifität gegenüber Kontrollkollektiven
2. Die diagnostische Sensitivität
3. Der positive und negative prädiktive Wert

Die Übereinstimmung zwischen einem Testergebnis und dem, was zu messen beabsichtigt war, wird als Validität oder Brauchbarkeit eines Testverfahrens bezeichnet (Dörner 1998).

Spezifität und Sensitivität

Eine optimale Validität wird erreicht, wenn alle Gesunden im Test unauffällig sind (hohe diagnostische Spezifität) und alle Kranken als krank erkannt werden (hohe diagnostische Sensitivität). Dies ließe sich theoretisch erreichen, wenn Gesunde und Kranke bezüglich des

Parameters zwei getrennte Gruppen wären, die durch einen günstig gewählten Diskriminationswert voneinander zu trennen wären (Fateh-Moghadam 1993).

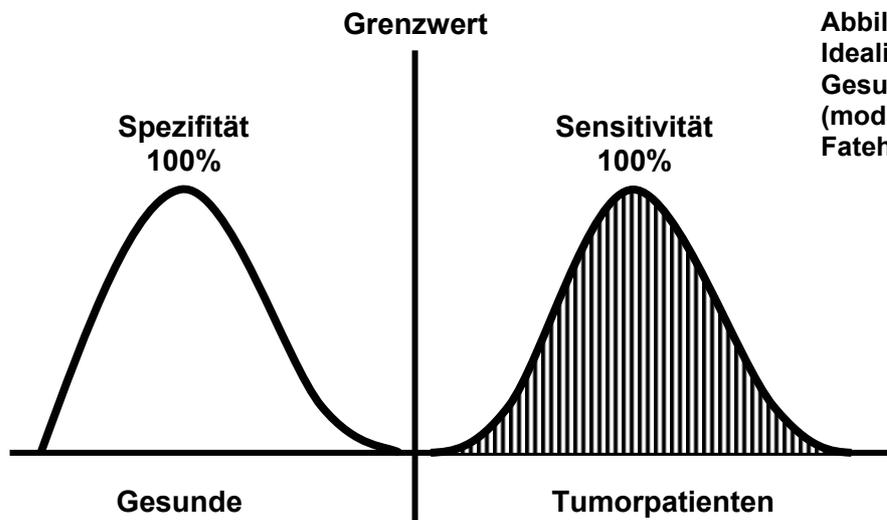


Abbildung 39:
Idealierte Werteverteilung bei
Gesunden und Tumorpatienten
(modifiziert nach
Fateh-Moghadam 1993)

Im klinischen Alltag überlappen sich jedoch beide Gruppen, wodurch eine strikte Trennung nicht mehr möglich ist. Je nach Wahl des Diskriminationswert werden für eine mehr oder weniger große Anzahl kranker Personen fälschlicherweise negative Ergebnisse erzielt, für eine variable Gruppe von Gesunden erhält man hingegen ebenso fälschlicherweise positive Werte (Fateh-Moghadam 1993).

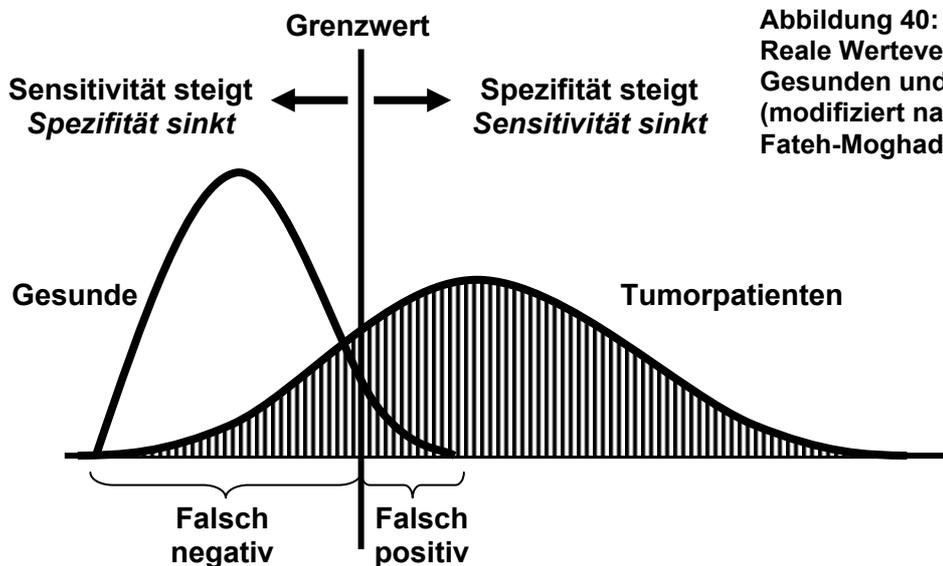


Abbildung 40:
Reale Werteverteilung bei
Gesunden und Tumorpatienten
(modifiziert nach
Fateh-Moghadam 1993)

Komplizierend kommt bei der Bewertung von Parametern zur Diagnostik maligner Erkrankungen hinzu, dass neben den Gesunden auch Personen mit benignen Erkrankungen mit den Personen, die an den entsprechenden Tumoren leiden, hinsichtlich der Wertlagen interferieren können (Stieber 2001).

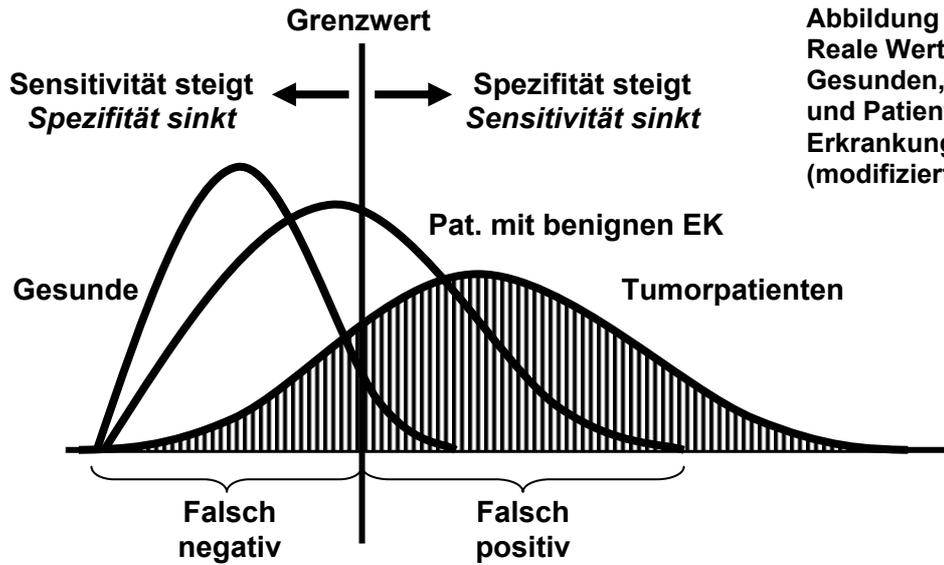


Abbildung 41:
Reale Werteverteilung bei
Gesunden, Tumorkranken
und Patienten mit benignen
Erkrankungen
(modifiziert nach Stieber 2001)

In einer Vierfeldertafel können die Testergebnisse zu den tatsächlichen Verhältnissen – jeweils in dichotomer Weise – in Beziehung gesetzt werden. Die Begriffe der Spezifität, Sensitivität sowie der positive und negative prädiktive Wert beschreiben diese Beziehung und geben zusammen genommen die diagnostische Qualität eines Tests an (Dörner 1998).

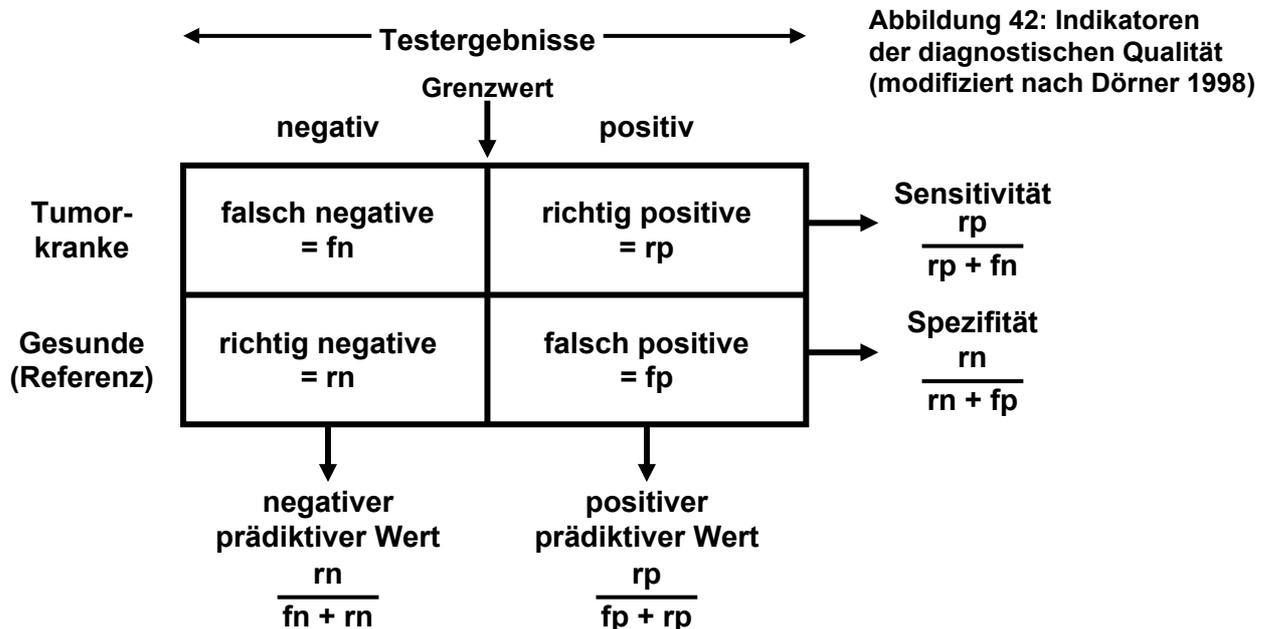


Abbildung 42: Indikatoren
der diagnostischen Qualität
(modifiziert nach Dörner 1998)

Die diagnostische Spezifität und Sensitivität ist demnach definiert als:

$$\text{Diagnostische Spezifität (\%)} = \frac{\text{Anzahl richtig negativer Ergebnisse} * 100}{\text{Anzahl der Nicht-Tumorerkrankten}}$$

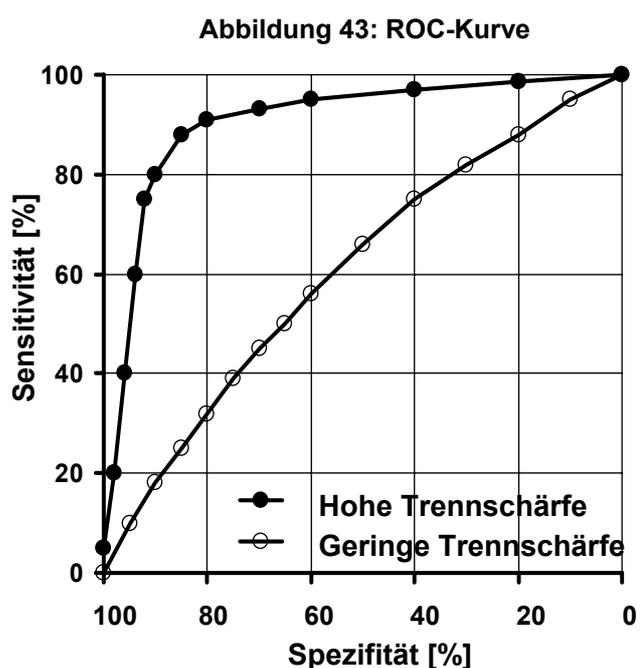
$$\text{Diagnostische Sensitivität (\%)} = \frac{\text{Anzahl richtig positiver Ergebnisse} * 100}{\text{Anzahl der tatsächlich Tumorerkrankten}}$$

Der Grad der Spezifität hängt von der Wahl des Diskriminations-, Grenz- oder Cutoff-Wertes ab: Bei einem hohen Cutoff werden nur wenige Gesunde fälschlicherweise als positiv bewertet (hohe Spezifität), allerdings entgehen viele Erkrankte der Testung (niedrige Sensitivität). Andererseits werden bei einem niedrigen Cutoff viele Erkrankte erfasst (hohe Sensitivität) auf Kosten einer großen Zahl Gesunder, die als krank deklariert werden (niedrige Spezifität). Je nach diagnostischer Intention kann der Cutoff variabel gesetzt und das Spezifitäts-Sensitivitäts-Verhältnis dementsprechend bestimmt werden.

Aus Gründen der diagnostischen Sicherheit sowie der Vergleichbarkeit von Studien wird der Cutoff nach Übereinkunft der European Group on Tumor Markers (EGTM) bei Testverfahren Tumor-assoziiertes Antigen bei einer 95% Spezifität gegenüber Gesunden und Personen mit benignen Erkrankungen gewählt. Damit wird der Prozentsatz der fälschlicherweise Testpositiven auf ein vertretbares Maß von 5% beschränkt und den daraus resultierenden diagnostischen und therapeutischen Konsequenzen sowie der psychischen Belastung für die betroffenen Person Rechnung getragen. Die Sensitivität liegt bei den meisten Tests für onkologische Biomarker im Bereich von 30% bis 60% bei einer 95%igen Spezifität gegenüber Personen mit benignen Erkrankungen.

ROC-Kurven

Das ganze Spezifitäts-Sensitivitätsprofil kann elegant durch „receiver operating characteristic“ (ROC)-Kurven dargestellt werden. Dabei werden die Spezifitäten und Sensitivitäten bei sich stetig verändernden Cutoff-Werten berechnet und in einem Diagramm mit der Ordinate „Sensitivität“ und der Abszisse „Spezifität“ zusammengefasst. Je steiler die Kurve eines Markers ansteigt und sich der linken oberen Ecke nähert, desto größer ist dessen diagnostische Trennschärfe. Je flacher sie verläuft und sich tendenziell der Winkelhalbierenden



angleicht, desto geringer ist sie. Diese Darstellung bietet den Vorteil, dass über das ganze Spezifitäts-Spektrum gleichzeitig die Sensitivitäten mehrerer Marker miteinander sowie das Diskriminanzvermögen eines Markers bezüglich verschiedener Referenzkollektive verglichen werden können.

Prädiktiver Wert

Der positive und negative prädiktive Wert leiten sich ebenfalls aus der Vierfeldertafel ab:

$$\text{Positiver prädiktiver Wert (\%)} = \frac{\text{Anzahl richtig positiver Ergebnisse} * 100}{\text{Anzahl der positiven Ergebnisse}}$$

$$\text{Negativer prädiktiver Wert (\%)} = \frac{\text{Anzahl richtig negativer Ergebnisse} * 100}{\text{Anzahl der negativen Ergebnisse}}$$

Der positive prädiktive Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der in einer gemischten Personengruppe bei einem positiven Testergebnis eine Tumorerkrankung vorliegt. Der negative prädiktive Wert beschreibt entsprechend die Wahrscheinlichkeit, bei einem unauffälligen Testergebnis Tumorfreiheit vorzufinden. Beide Kenngrößen sind im Gegensatz zur Spezifität und Sensitivität von der Prävalenz der Krankheit, das heißt vom Anteil Tumorerkrankter an der Gesamtheit der untersuchten Personengruppe, abhängig (Dörner 1998).

Für die Bestimmung der prädiktiven Werte ergeben sich folgende Formeln:

$$\text{Positiver prädiktiver Wert (\%)} = \frac{\text{Präv} * \text{Sens}}{\text{Präv} * \text{Sens} + \text{Unspez} * (1 - \text{Präv})}$$

$$\text{Negativer prädiktiver Wert (\%)} = \frac{\text{Spez} * (1 - \text{Präv})}{\text{Spez} * (1 - \text{Präv}) + \text{Präv} * \text{Unsens}}$$

Dabei ist „Präv“ = Prävalenz; „Sens“ = Sensitivität; „Spez“ = Spezifität; „Unsens“ = Unsensitivität = 1 – Sensitivität; „Unspez“ = Unspezifität = 1 – Spezifität.

4.2.2 Statistische Verfahren in den Querschnittsuntersuchungen

Die Abschätzung, ob sich die Wertlagen zweier oder mehrerer Gruppen tatsächlich, also signifikant, voneinander unterscheiden, kann anhand verschiedener Testverfahren vorgenommen werden, die je nach Homogenität und Verteilungsmuster der Messwerte innerhalb der untersuchten Gruppen eingesetzt werden.

Der Student-T-Test kommt zur Anwendung, wenn das Verteilungsmuster der Wertlagen in etwa einer Gauss'schen Normalverteilung entspricht. Dann können die Gruppen auch anhand der Mittelwerte ihrer Wertlagen verglichen werden. Bei nicht normal verteilten Werten wird der Wilcoxon-Test herangezogen; hier sind die Mediane der Gruppen im Vergleich aussagekräftiger als die Mittelwerte.

Da die Nukleosomenwerte in den untersuchten Gruppen nicht normalverteilt, sondern rechtsschief waren, wurden nichtparametrische Verfahren bei den Auswertungen verwendet:

- Die Verteilungen der Einzelwerte werden als Punkte-Plots dargestellt. Darüber hinaus werden tabellarisch der Median und die Bandbreite (= Minimum – Maximum), bei größeren Stichproben auch der Mittelwert und die 75%- und 95% Perzentile angegeben.
- Beim Vergleich zweier Gruppen – z.B. hinsichtlich des Nikotin- und Alkoholkonsums, des Geschlechts, des Krankheitsstatus⁴ oder des Metastasierungsgrads – wurde die Signifikanz mittels des Wilcoxon-Tests geprüft.
- Der Vergleich mehrerer Gruppen, die geordnet sind – z.B. nach der Stressbelastung gesunder Personen, den Tumorstadien 1 bis 4 sowie den T-, N- und G-Stadien – wurde anhand einer Rangvarianzanalyse mit dem Trend-Test angestellt.
- Beim Vergleich mehrerer Gruppen ohne Ordnung – z.B. bezüglich der Histologie und Lokalisation der Tumore – wurde eine Rangvarianzanalyse mit multiplen Vergleichen nach Tukey durchgeführt.
- Beim Vergleich mit einer stetigen Variable – wie dem Alter der Personen und der Wertlage des C-reaktiven Proteins bei Personen mit Infekten – wurde eine Einteilung der Variable in Quintilen vorgenommen; dann erfolgte eine Rangvarianzanalyse mit dem Trend-Test.

- Für die multivariate Analyse von mehreren kategorisierten Variablen – z.B. von Alter und C-reaktivem Protein bei Personen mit Infekten sowie bei Tumorgröße und Metastasierungsgrad bei Tumorpatienten – wurde eine Rangvarianzanalyse herangezogen.

4.2.3 Statistische Verfahren in den Longitudinaluntersuchungen

Bei den Verlaufsuntersuchungen während Chemo- und Radiotherapie wurde der Therapieerfolg in die Kategorien „Remission“, „No change“ und „Progression“ eingeteilt. Zur Bewertung einzelner Variablen wurde die Rangvarianzanalyse mit Trend-Test verwendet.

- Die getesteten Variablen sind absolute Größen (Basis-, Maximum-, Minimum-, Endwerte) oder Verhältnisse dieser Größen zueinander (Maximumwert / Basiswert, Minimumwert / Basiswert, Endwert / Basiswert, Basiswert 2 oder 3 / Basiswert 1). Diese Quotienten werden in % angegeben.
- Zusätzlich wurde der absolute **tägliche** Abfall (= Abfall / d) vom Anfangswert (Basiswert vor dem ersten Zyklus = BW-1) zum Endwert (BW-E) bei Chemotherapie bzw. vom Anfangs (BW)- zum Minimumwert (Min) bei Radiotherapie berechnet. Da die Chemotherapien unterschiedlich lange dauerten und die Werte während Radiotherapie unterschiedlich schnell abfielen, konnte durch die Berücksichtigung der Anzahl der Tage (d) bis zum End- bzw. Minimalwert die Dynamik genauer erfasst werden:

$$\text{Abfall / d} = (\text{BW-1} - \text{BW-E}) / \text{d} \quad (\text{Chemotherapie})$$

$$\text{Abfall / d} = (\text{BW} - \text{Min}) / \text{d} \quad (\text{Radiotherapie})$$

- Der prozentuale **tägliche** Abfall vom Anfangs (BW-1)- zum Endwert (BW-E) bei Chemotherapie bzw. vom Anfangs (BW)- zum Minimumwert (Min) bei Radiotherapie wurde mit folgender Formel ermittelt:

$$\text{Abfall / d (\%)} = 100 (1 - \exp((\log(\text{BW-E}) - \log(\text{BW-1})) / \text{d})) \quad (\text{Chemotherapie})$$

$$\text{Abfall / d (\%)} = 100 (1 - \exp((\log(\text{Min}) - \log(\text{BW})) / \text{d})) \quad (\text{Radiotherapie})$$

- Die Halbwertszeit des Abfalls der Nukleosomenwerte wurde errechnet wie folgt:

$$\text{Halbwertszeit (HWZ)} = \text{d} * \log(2) / (\log(\text{BW-1}) - \log(\text{BW-E})) \quad (\text{Chemotherapie})$$

$$\text{Halbwertszeit (HWZ)} = \text{d} * \log(2) / (\log(\text{BW}) - \log(\text{Min})) \quad (\text{Radiotherapie})$$

Eine negative Halbwertszeit bedeutete demnach einen Anstieg der Nukleosomenwerte.

- Als weitere Variable wurde bei den Verlaufsuntersuchungen während Radiotherapie die Fläche unter der Kurve der Werte der ersten Therapiewoche (AUC) berechnet: Da je nach Therapieplanung die wöchentliche Blutabnahme 7 oder 8 Tagen nach Therapiebeginn erfolgte, wurde die Fläche unter der Kurve durch die Anzahl der Tage (d) geteilt, um durch diesen normierten Parameter (AUC / d) eine bessere Vergleichbarkeit zu erhalten.
- Darüber hinaus wurde während Radiotherapie auch die Dauer bis zum Beginn eines anhaltenden Werteabfalls um mehr als 25% nach Erreichen des Maximalwertes (Abfall-Start) als Variable evaluiert.

Für eine potentielle klinische Anwendung wurden die signifikant diskriminierenden Nukleosomenvariablen in Kategorien eingeteilt. Als Rationale für die dabei eingeführten Grenzwerte diente für das Erreichen des Endwertes bei Chemotherapie und zusätzlich des Minimalwertes bei Radiotherapie die 95%-Perzentile gesunder Personen (100 AU). Eine deutliche Veränderung der Kinetik der Basiswerte bei Chemotherapie wurde bei einem Abfall bzw. Anstieg von mehr als 50% angenommen. Für den Start des Abfalls der Werte (1 Tag) und die Fläche unter der Kurve (300 AU/d) bei Radiotherapie wurde ein Wert nahe des Medians ausgewählt. Die Kategorien der Variablen wurden mittels des Chi-Quadrat-Tests auf ihre Signifikanz geprüft.

Für die Untersuchung des multivariaten Einflusses mehrerer kategorisierter Variablen auf den Therapieerfolg wurde der Mantel-Haenszel-Test eingesetzt. Dieses Verfahren kam bei den univariat signifikanten Variablen während Chemotherapie und beim Vergleich von Nukleosomen und Tumormarkern jeweils unter Berücksichtigung klinisch bedeutsamer Parameter zur Anwendung.

Bei allen eingesetzten Methoden wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ als Bedingung für die Unterschiedlichkeit gefordert. Für alle Signifikanzberechnungen wurde Software der Firma SAS benutzt.

5 Ergebnisse

5.1 Methodische Evaluierung des Nukleosomentests

Erste Messungen mit dem Ausgangstest ergaben stark abweichende, nicht korrelierende Ergebnisse in unterschiedlichen Matrices (Serum, Plasma) derselben Personen, die im Tag zu Tag-Vergleich in keiner Weise reproduzierbar waren. Diese Beobachtungen wurden durch Beschreibungen anderer Arbeitsgruppen (Leist 1994) bestätigt und ließen den Einsatz der ursprünglichen Version des Cell Death Detection - ELISAs^{plus} zu laborklinischen aber auch zu Forschungszwecken äußerst problematisch erscheinen.

Für eine mögliche Verwendung des Tests zur Bestimmung der Nukleosomenmenge in flüssigen Medien galt es deshalb, zunächst im Testaufbau und -ablauf die Mängel zu identifizieren, die eine reproduzierbare und präzise Quantifizierung von Nukleosomen verhindern und diese durch entsprechende Modifikationen und Standardisierungen des Testsystems zu beheben. Als besondere Herausforderung erwiesen sich dabei die vielfältigen Regulationsmöglichkeiten der Test-Stellgrößen und die Herstellung eines geeigneten Referenzmaterials mit ausreichender Stabilität.

In einem weiteren Schritt war eine qualitative Bewertung der so modifizierten, neuen Version des CDDE-Tests vorzunehmen einschließlich einer Überprüfung der analytischen Spezifität und Sensitivität sowie der Intra- und Interassay-Präzision.

Aufgrund der initial beobachteten, divergenten Ergebnisse in verschiedenen Matrices erfolgte anschließend eine systematische Untersuchung in Frage kommender Probenmaterialien sowie unterschiedlicher Lagerungsbedingungen und entsprechender Zusätze, die zu einer Optimierung der kurz- und langfristigen Stabilität geeignet sein können.

Die klinische Evaluierung sollte daraufhin mit der Bestimmung der Nukleosomenkonzentrationen im Blut von gesunden Probanden begonnen werden. Dabei fielen drastische Unterschiede in den Wertlagen auf zwischen direkt im Klinikum entnommenen Spender-Blutproben und solchen, die in der Peripherie abgenommen und ins Klinikum transportiert wurden. Diese Beobachtung war der Anstoß für eine ausgedehnte

Untersuchung der präanalytischen Probenbehandlung, die den Einfluss der einzelnen Verfahrensschritte von der Blutabnahme über die Zentrifugation und Lagerung der Proben bis hin zur Vermessung im Testsystem umfasste.

Ergänzend wurden schließlich potentielle störende Einflüsse auf die gemessene Nukleosomenkonzentration wie zirkadiane Schwankungen, Hämolyse, Hyerlipidämie und Kontamination durch Bakterien und Detritus untersucht.

Im Folgenden werden die einzelnen Experimente, der theoretische Hintergrund und die resultierenden Ergebnisse vorgestellt, die im Rahmen der methodischen Optimierung und der anschließenden Validierung des Ausgangstestes durchgeführt wurden. Dabei sind bereits die Modifizierungen und Standardisierungen berücksichtigt. Diese betreffen vor allem:

4. Die Optimierung der Zusammensetzung der im Test verwendeten Reagenzien.
5. Die Definition der Farbentwicklungszeit nach Zugabe des ABTS-Substrats.
6. Die Herstellung eines geeigneten Referenzmaterials und einer entsprechenden Standardkurve.
7. Die optimierte Interpretation der gemessenen Extinktionswerte.
8. Die Vorbereitung der zu vermessenden Proben

5.1.1 Modifikationen und Standardisierung des Nukleosomentests

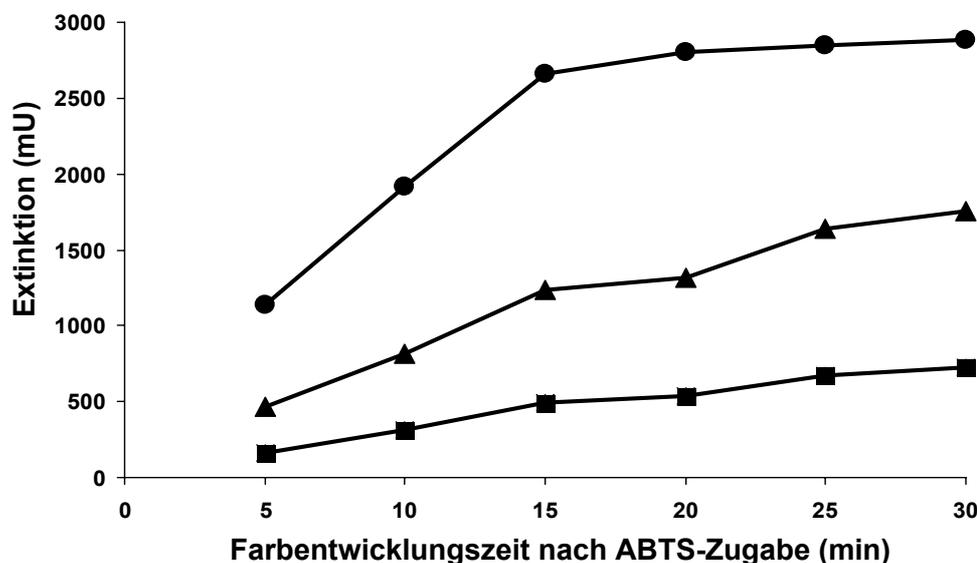
Entwicklung der Werte im zeitlichen Verlauf

Nach Zugabe des ABTS-Substrates ist mit zunehmender Dauer der Inkubationszeit eine stärkere Farbentwicklung durch die Reaktion von ABTS mit der in den Komplexen enthaltenen Peroxidase zu erwarten. Für die Bewertung der Ergebnisse innerhalb eines Testlaufs ist ein linearer, zur Inkubationszeit proportionaler Anstieg der Werte zu fordern. Tritt nach einiger Zeit eine Sättigung der Farbentwicklung auf, muss dies bei der Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt werden; verlangsamt sich die Farbentwicklung bei Erreichen eines bestimmten Absorptionsgrades oder sistiert sie gar, müssen die entsprechenden Proben vorverdünnt werden, um Verzerrungen zwischen den ermittelten Werten vorzubeugen.

Um die zeitliche Farbentwicklung zu verfolgen, wurden photometrische Messungen im Fünf-Minutentakt durchgeführt und drei Proben mit unterschiedlichem Gehalt an Nukleosomen über eine Farbentwicklungs-Zeitspanne von insgesamt 30 Minuten beobachtet. Über diesen Zeitraum zeigten alle Proben eine stetige und zeitlich proportionale Zunahme der Absorptionswerte mit Ausnahme der nukleosomenreichen Probe. Diese stieg zwar linear bis etwa 2500 mU optischer Dichte an, ging dann jedoch in ein Plateau über.

Diese Beobachtungen stimmten mit der theoretischen oberen Messbereichsgrenze des Photometers von 2500 mU bis 3000 mU überein. Proben, die über diesem Wert lagen, mussten in einem neuen Testansatz vorverdünnt werden, um falsch niedrige Werte zu vermeiden.

Abbildung 44: Entwicklung der Werte im zeitlichen Verlauf



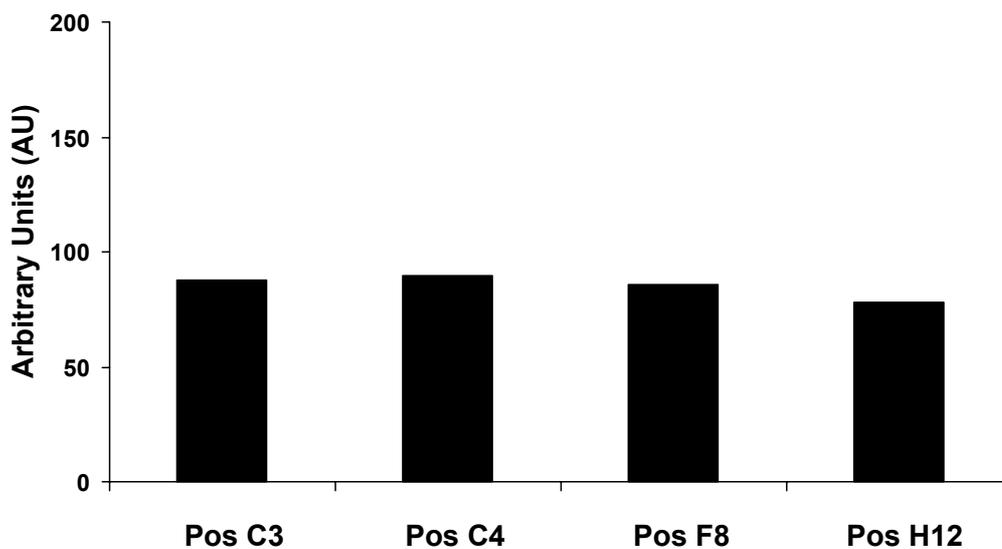
Messzeit

Durch manuelles Pipettieren entstehen Verzögerungen, die vor allem bei der Zugabe des ABTS-Substrates zu Verzerrungen zwischen der ersten und letzten Probe führen können. Wie im Methodenteil beschrieben, wurde deshalb die Inkubationszeit auf 30 Minuten festgesetzt, um den theoretischen Fehler auf vertretbare 5% zu begrenzen.

Inwiefern sich diese Diskrepanz tatsächlich in der Praxis widerspiegelte, wurde anhand von mehreren Proben untersucht, die jeweils am Anfang (Pos C3 und C4), in der Mitte (Pos F8) und am Ende der Mikrotiterplatte (Pos H12) positioniert waren.

Bei photometrischen Bestimmungen nach 10, 20 und 30 Minuten zeigte sich, dass die Werte bei den ersten Messungen geringe Unterschiede aufwiesen, die mit Dauer der ABTS-Inkubationszeit abnahmen.

Abbildung 45: Intra-Mikrotiterplatten-Variabilität



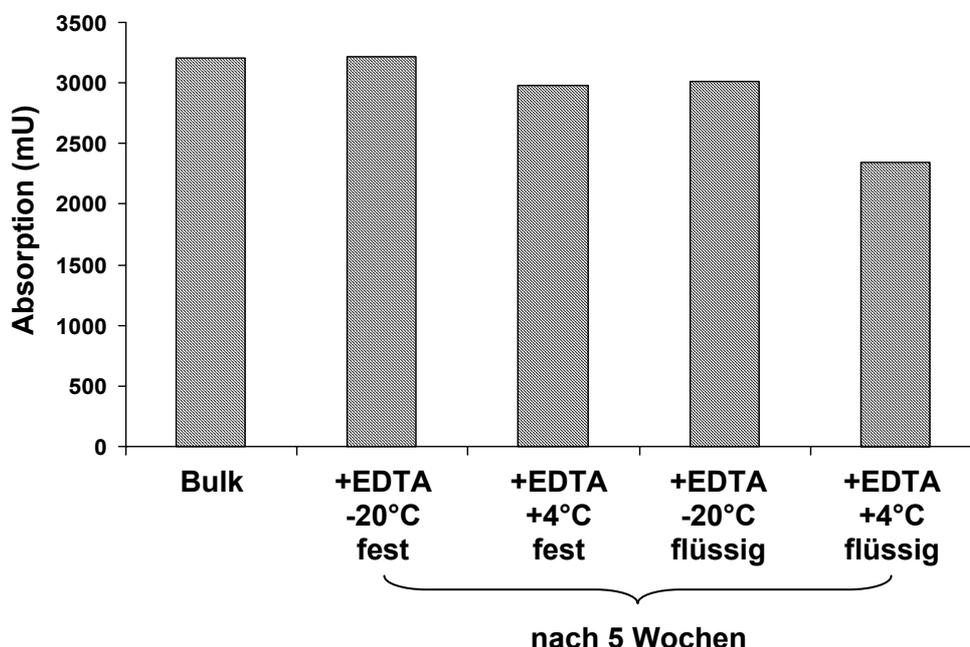
Standardkurve

Stabilität des Standardmaterials

Da das Standardmaterial die Referenz für alle weiteren Testungen darstellt, kommt seiner Qualität und Stabilität große Bedeutung zu. Diese konnte allein durch die Lyophilisierung, also die Trockenpulverisierung des nukleosomenreichen Materials, das durch gemeinsame Inkubation der Blutproben verschiedener gesunder Spender gewonnen wurde, nicht erreicht werden; die Wertlagen sanken bei wöchentlichen Messungen stetig um circa 5% bis 10% pro

Woche ab. Erst nach Zugabe von 10 mM EDTA vor dem Lyophilisierungsschritt wurden für das Standardmaterial über mehrere Wochen stabile Absorptionswerte erzielt.

Abbildung 46: Stabilität des Standardmaterials



Da für die Durchführung eines Testansatzes nur ein Bruchteil des in bidestilliertem Wasser resuspendiertem Standardmaterials benötigt wurde, wurde der Rest aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren. Diese so konservierten Proben konnten mindestens 12 Monate eingesetzt werden, ohne dass eine Minderung der Wertlagen beobachtet wurde.

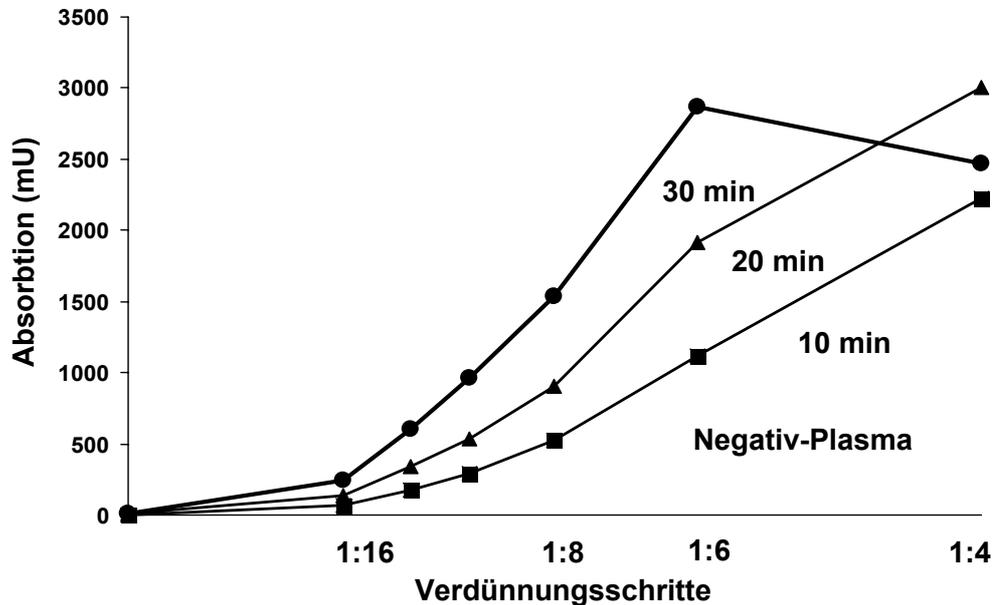
Verdünnung mit Plasma

Die eigentliche Standardkurve wurde durch geeignete Verdünnungsschritte des nukleosomenreichen Standardmaterials erstellt. Als wesentliche Kriterien sollte sie reproduzierbar sein, eine Verdünnungslinearität aufweisen, den Ursprung des Koordinatensystems schneiden und nach der definierten Messzeit mit dem höchsten Wert zwar im oberen Messbereich des Photometers (bei einer Absorption von etwa 2500 mU optischer Dichte), jedoch nicht darüber liegen. Neben der Menge an Nukleosomen im Standardmaterial sind die Art des Verdünnungsmediums und der Verdünnungsgrad des höchsten Standardwertes Variablen, die zur Optimierung der Standardkurve verändert werden können.

Da das Standardmaterial auf Blutplasma-Matrix basierte, lag es nahe, zur Verdünnung nukleosomenarmes Plasma heranzuziehen. Damit konnte eine Standardkurve hergestellt werden, die bei einer 1:6-Verdünnung des höchsten Standardwertes den Kriterien der

Reproduzierbarkeit, Linearität, Ursprünglichkeit und Erfassung des gesamten Photometermessbereichs genügte.

Abbildung 47: Verdünnung des Standardmaterials mit Negativ-Plasma



Verdünnung mit Inkubationspuffer

Die Verwendung von Inkubationspuffer zur Verdünnung des Standardmaterials bietet den Vorteil, dass es absolut nukleosomenfrei und nicht humaner Abstammung ist. Dadurch wird die Reproduktion der Standardkurve erleichtert und mögliche Infektionsrisiken für die Herstellung und Anwendung der Standardmaterialien gesenkt.

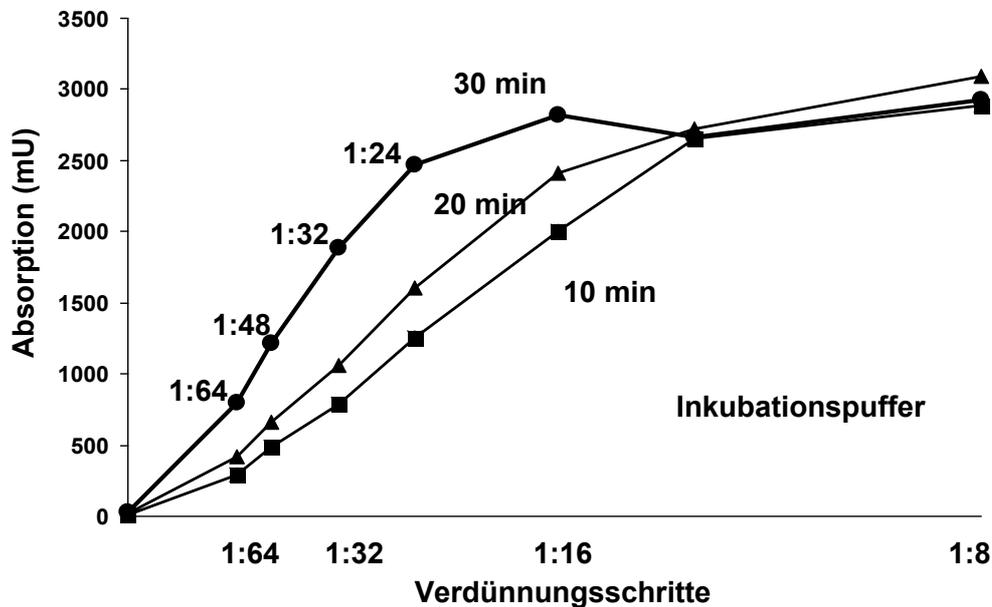
Auch mit diesem Diluens wurde eine reproduzierbare, lineare Ursprungsgerade erhalten, die bei einer 1:24-Verdünnung des obersten Standardwertes nach 30 Minuten Messzeit den ganzen Messbereich des Photometers durchmaß. Als weitere Standardwerte wurden Verdünnungen im Verhältnis 1:32, 1:48, 1:64, 1:96 und nur Inkubationspuffer gewählt.

Die Linearität der Kurve war unabhängig davon, ob jede der Verdünnungen einzeln hergestellt oder durch Weiterreichen des schon verdünnten Materials innerhalb der Verdünnungsreihe hergestellt wurde, sofern jeweils eine ausreichende Homogenisierung der Verdünnungen durch Vortexen über mehrere Sekunden stattgefunden hatte.

Allerdings mussten die Verdünnungen vor der Testdurchführung jeweils neu hergestellt werden, da die Konservierung der schon verdünnten Standards zu Verlusten der Signalstärke

fürten (siehe unten). Aufgrund der oben genannten Gründe wurde im Folgenden die Verdünnung des Standardmaterials mittels Inkubationspuffer für die Erstellung der Kalibrationskurve bevorzugt.

Abbildung 48: Verdünnung des Standardmaterials mit Inkubationspuffer



Verwendung eines synthetischen Standardmaterials

Eine völlige Unabhängigkeit von menschlichen Materialien wäre durch die Verwendung von synthetischen Standards, zum Beispiel Lösungen mit einer definierten Anzahl an Mononukleosomen, zu erreichen. Außerdem könnte an der resultierenden Kalibrationskurve direkt die absolute Konzentration an Nukleosomen abgelesen werden.

Versuche mit bereits fertig synthetisierten Nukleosomen sowie mit Gemischen aus Histonen und DNA, die jeweils mit Inkubationspuffer verdünnt wurden ergaben jedoch weder reproduzierbare Werte, noch eine lineare Kurve. Möglicherweise veränderte sich durch die Verdünnungen die Affinität der einzelnen Komponenten zueinander, die künstlich erzeugten Komplexe interagierten miteinander oder mit der Wand der Reagenzgefäße. Deshalb musste von einer gänzlich synthetischen Standardkurve abgesehen werden.

Relative Skalierung in Arbitrary Units

In dem aus gemischtem Spenderblut hergestellten Standardmaterial konnte die Menge der darin befindlichen Nukleosomen nicht in absoluten Konzentrationen angegeben werden.

Denn es enthielt vermutlich Mono- und Oligonukleosomen verschiedener Länge, die im Test unterschiedliches Bindungsverhalten an die Antikörper erwarten ließen.

In seiner Zusammensetzung ist das verwendete Standardmaterial jedoch den zu untersuchenden Serum- oder Plasma-Proben ähnlicher, als es synthetisches Referenzmaterial wäre. Zudem sind die Nukleosomen im verwendeten Standard natürlicher Art; Serum- oder Plasma-Faktoren, die möglicherweise mit den Nukleosomen interagieren, sind dort in vergleichbarem Verhältnis wie in den zu messenden Proben vorhanden.

Deshalb wurde eine zum Standard relative Quantifizierung der Nukleosomen vorgenommen, deren Messeinheit als „Arbitrary Units“ oder „AU“ benannt. Nach 30 minütiger Messzeit entsprachen 1000 AU einer Absorption von 2500 mU, 500 AU waren 1250 mU, 250 AU waren 625 mU und so fort. Da die Skalierung in Arbitrary Units vor allem von der Standardkurve, und nur in geringem Maß von der Messzeit abhängen, konnte dadurch die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Testdurchläufen verbessert werden. Wie die folgenden Abbildungen zeigen, variierten die Standardkurven in vier verschiedenen Tests hinsichtlich der Absorption, waren jedoch bezüglich der Arbitrary Units nahezu identisch:

Abbildung 49: Vergleich mehrerer Standardkurven nach absoluten Absorptionen

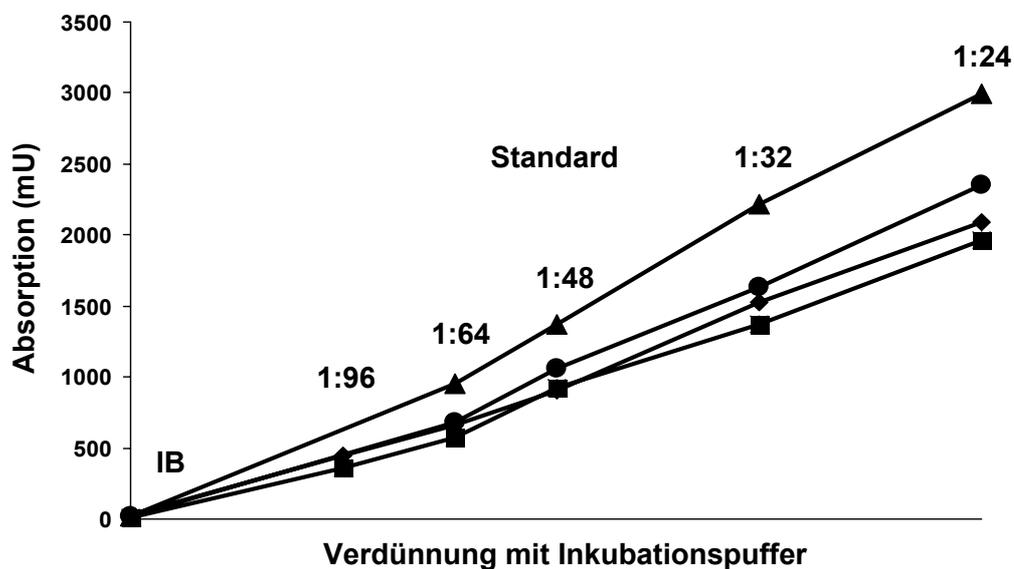
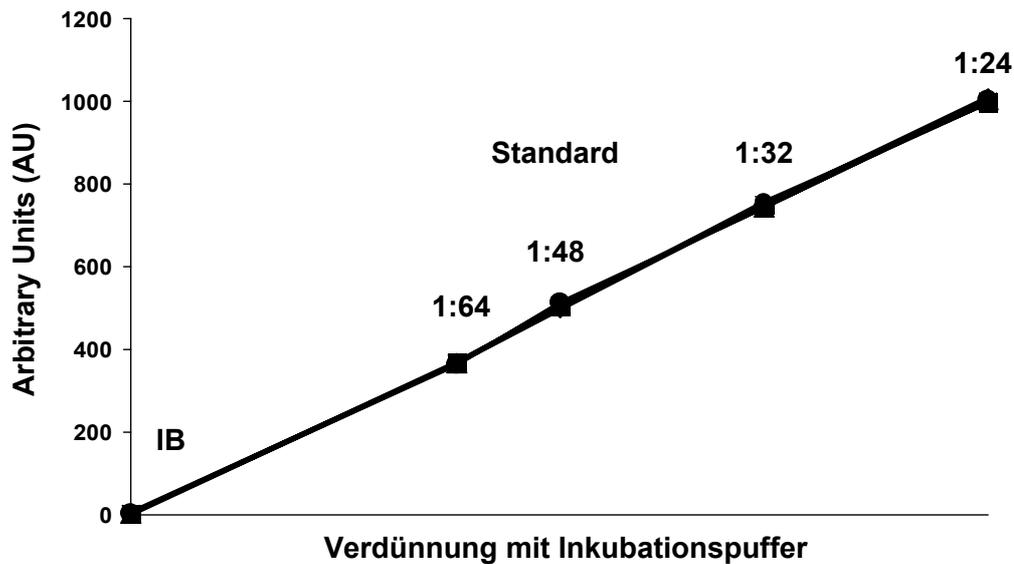


Abbildung 50: Vergleich mehrerer Standardkurven nach relativen Arbitrary Units



Auch im Vergleich von Serum-Proben unterschiedlicher Wertlagen, die jeweils in 10 Tests vermessen wurden, wurde durch die Verwendung der Arbitrary Units ein Absinken der Interassay-Varianz von 12% auf 8% und von 17% auf 13% beobachtet (siehe auch weiter unten).

Optimierung des Messbereichs

Nach der Definition der Messzeit und Festlegung der Standardkurve wurden Testmessungen an einer Reihe von Serum-Proben durchgeführt. Dabei überschritten viele dieser Proben den Messbereich von 1000 AU. Eine Optimierung des Messbereichs konnte durch Regulation mehrerer Stellgrößen erreicht werden:

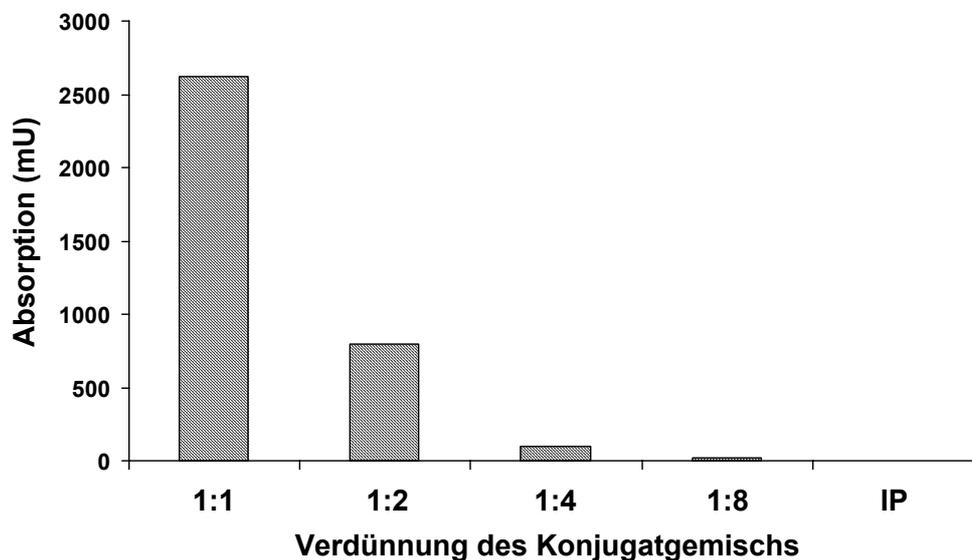
- eine Verdünnung des Konjugat-Gemischs
- einer generellen Vorverdünnung der zu vermessenden Serum-Proben durch
 - ein nukleosomenarmes Serum
 - Inkubationspuffer

Verdünnung des Konjugat-Gemischs

Durch Erhöhung der Inkubationspuffer-Anteils im Konjugat-Gemisch wurde die Konzentration der darin enthaltenen Anti-DNA- und Anti-Histon-Antikörper reduziert. Bei gleich bleibender Affinität gegenüber den Nukleosomen konnte so die Menge der Antigen-Antikörperkomplexe und dadurch das Messsignal verringert werden. Wie die folgende Abbildung zeigt, wurde durch eine Verdünnung des originalen Konjugats mit der gleichen

Menge Inkubationspuffer eine Abnahme der Extinktion auf etwa ein Viertel des Ausgangswertes erzielt. Dieses Verhältnis wurde bei weiteren Verdünnungsschritten gewahrt.

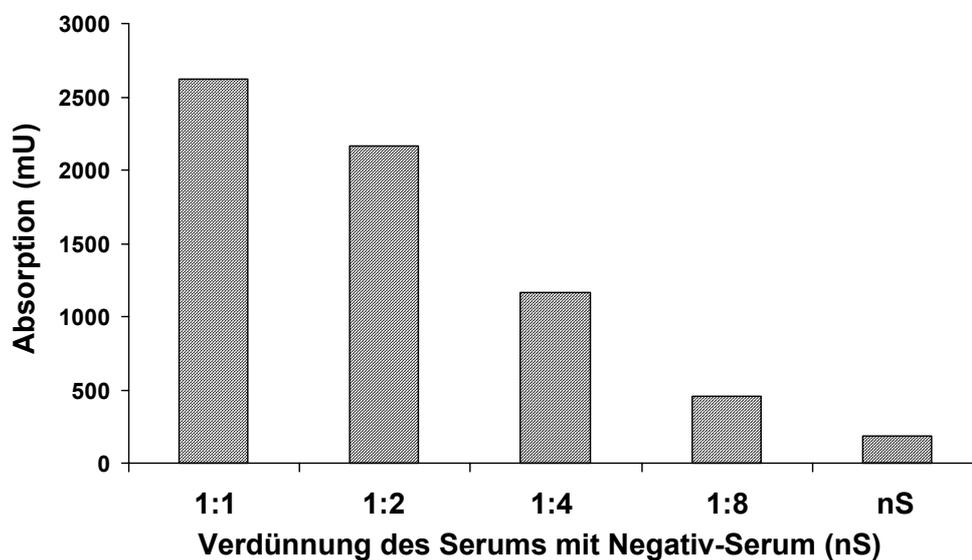
Abbildung 51: Verdünnung des Konjugatgemischs



Verdünnung der Serumproben mit Negativ-Serum

Zugabe von nukleosomenarmem Negativ-Serum zu den zu untersuchenden Serum-Proben bewirkte eine Verdünnung der darin befindlichen Nukleosomenkonzentration und somit eine Reduzierung des Messsignals. Abgesehen vom ersten Verdünnungsschritt der hoch positiven – und damit möglicherweise außerhalb des Messbereichs liegenden – Probe sank die Extinktion bei gradueller 1:2 Verdünnung jeweils um die Hälfte des Ausgangswertes ab. Allerdings wurde aufgrund des geringen Nukleosomenanteils im nukleosomenarmen Negativ-Serum der Nullwert nicht erreicht.

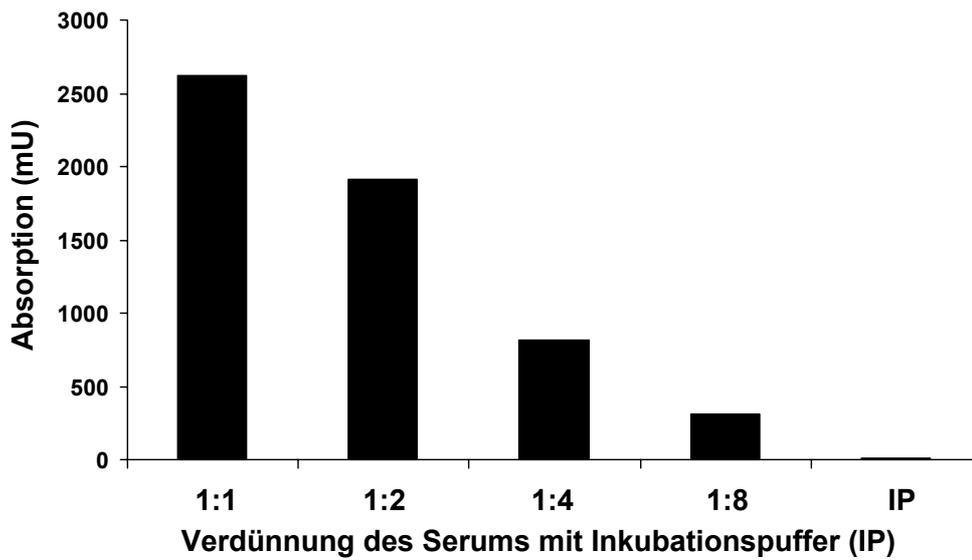
Abbildung 52: Verdünnung der Serumproben mit Negativ-Serum



Verdünnung der Serumproben mit Inkubationspuffer

Ein ähnlicher Effekt wurde durch die Verdünnung der nukleosomenreichen Serum-Probe mit Inkubationspuffer erzielt. Der bei ausschließlichem Einsatz von Inkubationspuffer resultierende Nullwert spiegelt wider, dass dieses Verdünnungsmittel gänzlich von Nukleosomen frei ist.

Abbildung 53: Verdünnung der Serumproben mit Inkubationspuffer



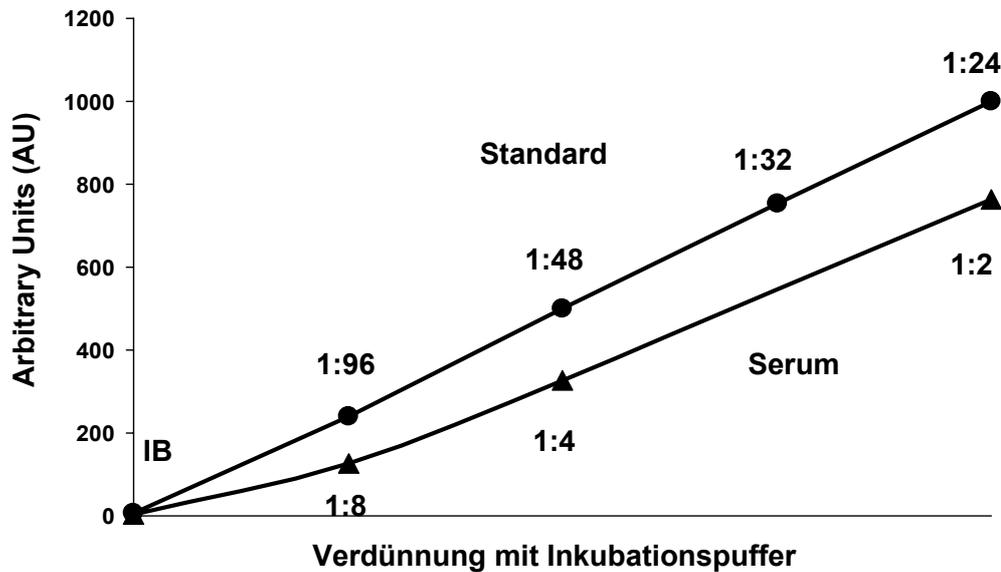
Für die Validierung des CDDE-Tests schien die 1:4-Vorverdünnung der Seren mit Inkubationspuffer praktikabel und ausreichend zu sein, um einen Großteil der Serum-Proben im Messbereich bis 1000 AU zu erfassen. Die Titrierung des Konjugationsgemischs wurde der späteren Weiterentwicklung des Tests vorbehalten.

Verdünnungslinearität

Die Verdünnungslinearität ist ein wesentliches Kriterium für den Einsatz und die Vergleichbarkeit von generell vorverdünnten Seren sowie für eine weitere Verdünnung von Proben, die den Messbereich dennoch übersteigen.

Wie aus der untenstehenden Abbildung ersichtlich ist, wurde mit der schrittweisen Verdünnung der Serum-Proben durch Inkubationspuffer eine reproduzierbare, lineare Ursprungsgerade erhalten. Dabei halbierte sich der Ausgangswert bei jeder weiteren Verdünnungsstufe. Somit konnte eine zum Verhältnis Probe / Inkubationspuffer proportionale Verdünnungslinearität für die Serum-Proben gezeigt werden.

Abbildung 54: Verdünnungslinearität



5.1.2 Qualitative Austestung

Die qualitative Austestung des Nukleosomentests umfasst die Bewertung der

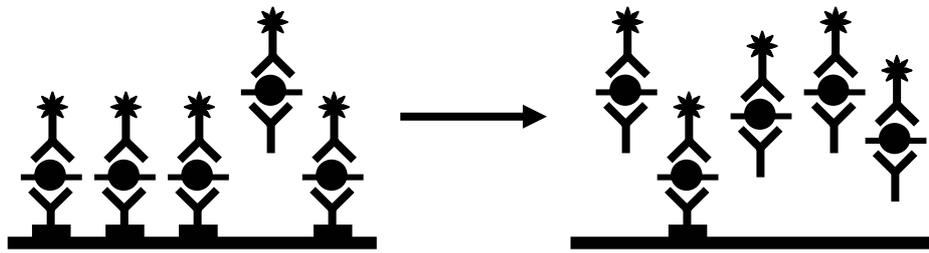
- Analytischen Spezifität
- Analytischen Sensitivität
- Intraassay-Varianz
- Interassay-Varianz

Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität als Qualitätsmerkmal der Antikörper eines ELISAs soll darüber Aufschluss geben, ob Nukleosomen-freie Proben auch tatsächlich kein positives Messsignal hervorrufen können.

Um dies zu überprüfen wurde zum Konjugat-Gemisch, welches biotinylierte Anti-Histon-Antikörper und Peroxidase-markierte Anti-DNA-Antikörper enthält, ein Gemisch titriert, in welchem identische, jedoch native Anti-Histon-Antikörper gelöst waren, die nicht mit Biotin behaftet waren. Letztere konnten zwar an Nukleosomen binden, diese jedoch nicht an die Mikrotiterplattenwand fixieren. So wurden die unfixierten Komplexe beim Waschschrift entfernt und in der photometrischen Messung nicht erfasst.

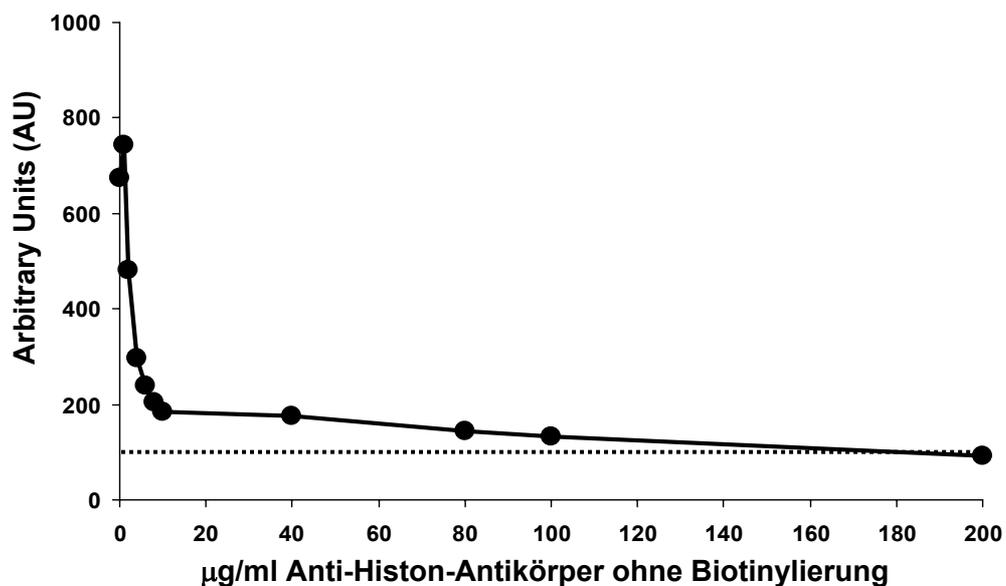
Abbildung 55: Bindeverhalten der Nucleosomen an die Mikrotiterplatte nach Titration von Anti-Histon-Antikörpern mit und ohne Biotin zum Konjugatgemisch



Bei gemeinsamer Inkubation der Anti-Histon-Antikörper mit und ohne Biotin konkurrierten beide um die in der Probe vorhandenen Nucleosomen. Mit zunehmender Menge des zugegebenen Gemischs entfielen dadurch immer weniger Nucleosomen auf die biotinylierten Anti-Histon-Antikörper des Konjugats, die die Nucleosomen an der Mikrotiterplatte verankerten. Dadurch bedingt war eine Abnahme des resultierenden Messsignals zu erwarten.

Diese theoretische Hypothese bestätigte sich bei den durchgeführten Untersuchungen: Mit ansteigender Titration der wieder auswaschbaren, Biotin-freien Anti-Histon-Antikörper nahm das Messsignal dosisabhängig ab und ging fast auf die Nulllinie zurück. Somit war für die Auslösung eines Messsignals das Vorhandensein von Nucleosomen, biotinylierten Anti-Histon-Antikörpern und Peroxidase-markierten Anti-DNA-Antikörpern notwendig.

Abbildung 56: Analytische Spezifität



In weiteren Versuchen wurden nukleosomenreiche Serumproben ausschließlich mit biotinylierten Anti-Histon-Antikörpern oder nur mit Peroxidase-markierten Anti-DNA-Antikörpern inkubiert, ohne dass ein messbares Signal vorzufinden war. Auch wurde

nukleosomenarme Serumproben oder nukleosomenfreies Material wie Inkubationspuffer mit biotinylierten Anti-Histon-Antikörpern und Peroxidase-markierten Anti-DNA-Antikörpern inkubiert, ohne dass eine Erhöhung des Signals festgestellt wurde.

Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität wird durch die untere Nachweisgrenze beschrieben. Sie wird im Besonderen durch die Affinität der Antikörper zu den Nukleosomen beeinflusst. Für ihre Berechnung wurde der Mittelwert der Leerwerte von 14 Testdurchläufen gebildet und die dreifache Standardabweichung hinzuaddiert. Somit ergab sich für die untere Nachweisgrenze ein Wert von 16 AU – bei einer Absorption von 38 mU optischer Dichte.

Intraassay-Varianz

Sowohl die Intra- wie auch die Interassay-Varianz können bei einem Testsystem von der Höhe der Wertlagen abhängen. Deshalb wurden aus einem Gemisch verschiedener Seren jeweils drei spezielle Serumpools hergestellt, die Signale im niedrigen, mittleren und hohen Messbereich hervorriefen. Zur Prüfung der Intraassay-Varianz – der Schwankungsbreite der Messwerte innerhalb eines Testansatzes – wurden die Pools in einer Messreihe zehnmal bestimmt, dann aus den Mittelwerten und Standardabweichungen die Variationskoeffizienten (VK) errechnet. Diese sind in der untenstehenden Tabelle dargestellt. Für den hohen und mittleren Serumpool war der VK mit 3,0% beziehungsweise 4,1% in etwa vergleichbar gering, der VK des niedrigsten Pools war mit 12,8% erwartungsgemäß am größten.

Interassay-Varianz

Für die Bestimmung der Inter-Assay-Varianz, also der Abweichung der Messwerte vom Mittelwert in verschiedenen Testdurchläufen, wurden die drei Serumpools in 14 aufeinander folgenden Messreihen mitgemessen. Ähnlich wie bei der Intraassay-Varianz, waren die resultierenden Variationskoeffizienten bei hohen und mittleren Wertlagen mit 8,6% und 13,5% ähnlich gering, während sie bei sehr niedrigen Wertlagen mit 46% deutlich höher lagen. Die einzelnen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 16: Intra-Assay und Inter-Assay-Varianz

	Intra – Assay N = 10	Inter – Assay N = 10
Pool 1	x = 327 AU VK = 3,0	x = 455 AU VK = 8,6
Pool 2	x = 181 AU VK = 4,1	x = 235 AU VK = 13,5
Pool 3	x = 48 AU VK = 12,8	x = 24 AU VK = 46,0

5.1.3 Matrix und Stabilisierung

Vergleich verschiedener Matrices

Die meisten Parameter werden in einem Routinelabor im Serum oder Plasma bestimmt. Zur Gewinnung von beiden Matrices wird Vollblut nach der Abnahme zentrifugiert, daraufhin der Überstand dekantiert und in den entsprechenden Testsystemen vermessen.

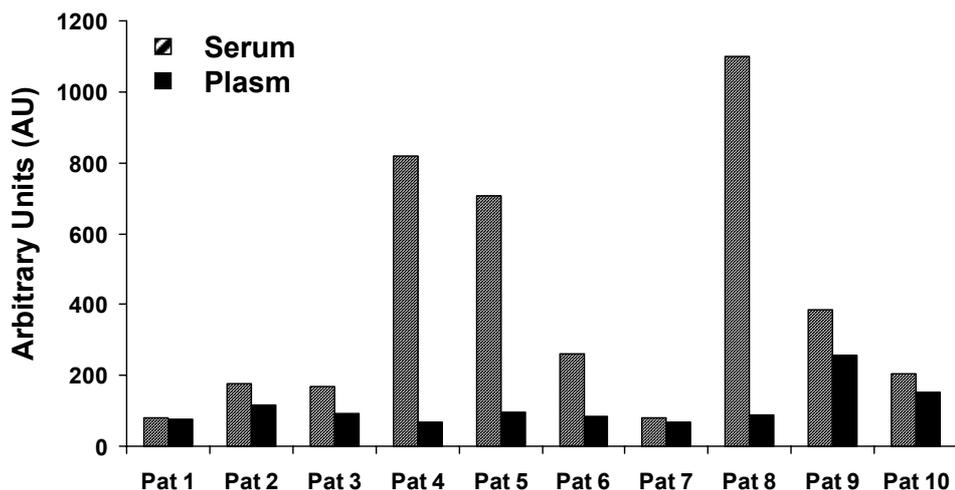
In den für die Serumgewinnung verwendeten Blutröhrchen setzt vor der Zentrifugation ein Gerinnungsvorgang unter Verbrauch von Gerinnungsfaktoren ein, die somit im Überstand nicht mehr vorhanden sind. Zur Erleichterung der Gerinnung sind in den Serumröhrchen zur Oberflächenvergrößerung Kaolin-Kugeln oder Gele vorgelegt.

Die für die Plasmaaufbereitung zur Anwendung kommenden Röhrchen hingegen enthalten Agenzien, die in die Gerinnungskaskade eingreifen und diese antagonisieren, wie das mit Ca^{2+} -Ionen chelierende EDTA oder Citrat und Heparin-Zusätze, die gerinnungsfördernde Faktoren inhibieren. In diesen Röhrchen bleiben die Gerinnungsfaktoren nach der Zentrifugation im Überstand und können dort nachgewiesen werden.

Um abzuschätzen, welche Matrix sich für die Bestimmung der Nukleosomen besser eignet, wurden von zehn Probanden jeweils Serum- und Plasmaproben gewonnen und darin die Nukleosomenkonzentration gemessen. Unter den Probanden waren drei gesunden Personen, vier Personen mit soliden Tumoren, zwei Personen mit akut entzündlichen Erkrankungen und einer Person mit einem akuten Allergieschub.

In neun der untersuchten Probenpaare wurde allenfalls ein geringes Messsignal im Plasma erhalten, während sie im Serum variierten und größtenteils deutlich höher waren. Nur in einem Fall waren die Werte in beiden Matrices vergleichbar hoch. Diese Blutprobe stammte von einem Patienten mit fulminant verlaufender Sepsis und hoch pathologischen CRP-Werten von über 45 mg/dl.

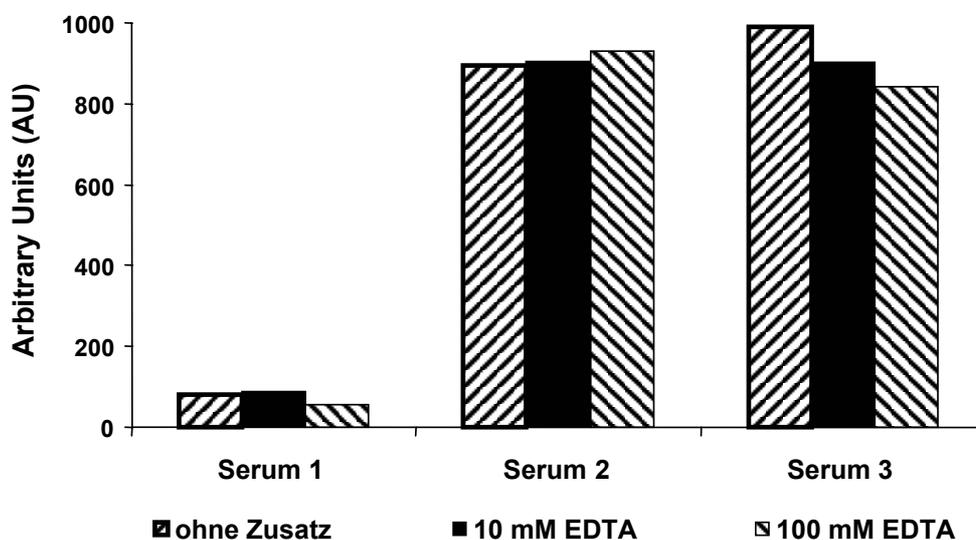
Abbildung 57: Vergleich von Serum und Plasma als Probenmatrix



Stabilisierung mit EDTA

Da in den Serum- und Plasmaproben die Präsenz von Mg^{2+} - und Ca^{2+} -abhängigen Endonukleasen vermutet werden konnte, wurden drei Serumproben 10 mM und 100 mM EDTA als Stabilisator zugegeben, um deren Aktivität zu unterbinden. Danach wurde ohne weitere zeitliche Verzögerung die Nukleosomenkonzentration bestimmt.

Abbildung 58: Stabilisierung der Serumproben mit EDTA

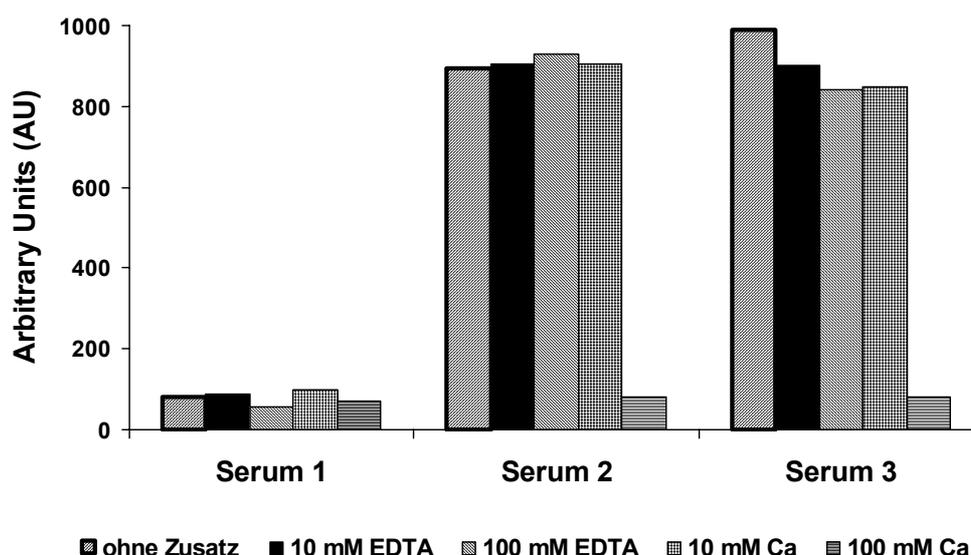


Die Messwerte der verschiedenen Behandlungsformen unterschieden sich für die untersuchten Proben nur geringfügig. Der natürlichen Aktivität von Endonukleasen schien hinsichtlich der gemessenen Nukleosomenkonzentration keine Bedeutung zuzukommen.

Inhibition der Stabilisierung durch Ca^{2+}

Durch Zugabe von Ca^{2+} wurde überprüft, ob die Aktivität eventuell vorhandener Endonukleasen induziert oder gesteigert werden könnte. Allerdings änderten sich die Messwerte bei Zusatz von 10 mM Ca^{2+} nur unwesentlich. Bei einer Konzentration von 100 mM Ca^{2+} jedoch wurde für alle Proben nur noch ein minimales Signal gemessen. Möglicherweise ist dieses Phänomen auf eine Störung des Testsystems als ganzem durch eine Inaktivierung der Antikörper zurückzuführen.

Abbildung 59: Stabilisierung mit EDTA und Inhibition der Stabilisierung durch Ca^{2+}



Vergleich unterschiedlicher Lagerungsbedingungen

Da sich EDTA als Stabilisator für die Lagerung des Standardmaterials bewährt hatte, war zu untersuchen, ob es einen ähnlich Effekt auf die Probandenproben ausübte. Die Serum- und Plasmaproben wurden aliquotiert und in zwei Gruppen aufgeteilt:

- Den Aliquots der ersten Gruppe (Serum und Plasma) wurden nach der Zentrifugation EDTA in einer Konzentration von 10 mM zugegeben, ehe sie für ein, drei, sieben und 21 Tage bei Raumtemperatur (25°C), Kühlschranktemperatur (4°C) oder im Gefrierschrank bei -20°C und -80°C gelagert wurden.

- Die Aliquots der zweiten Gruppe erhielten keinen EDTA-Zusatz und wurden nativ unter den gleichen Bedingungen über die gleichen Zeiträume gelagert.

Nach den genannten Lagerungszeiten wurden die Proben in den Test eingesetzt und vermessen. In folgenden Abbildungen sind exemplarisch für 3 Probanden die Ergebnisse dargestellt:

Abbildung 60: Stabilität von Serum und Plasma mit (+) und ohne (-) EDTA-Zusatz bei Proband 4

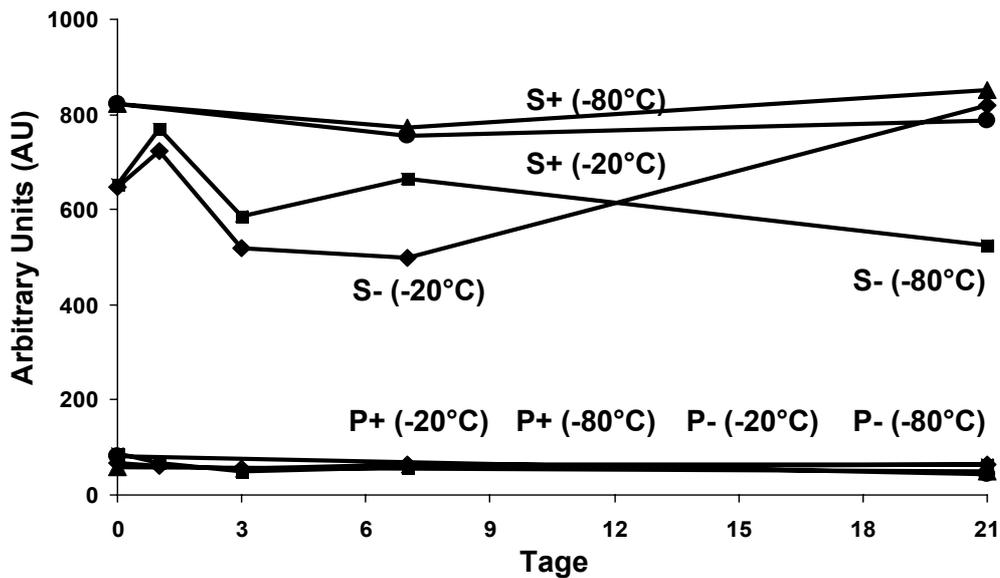


Abbildung 61: Stabilität von Serum und Plasma mit (+) und ohne (-) EDTA-Zusatz bei Proband 5

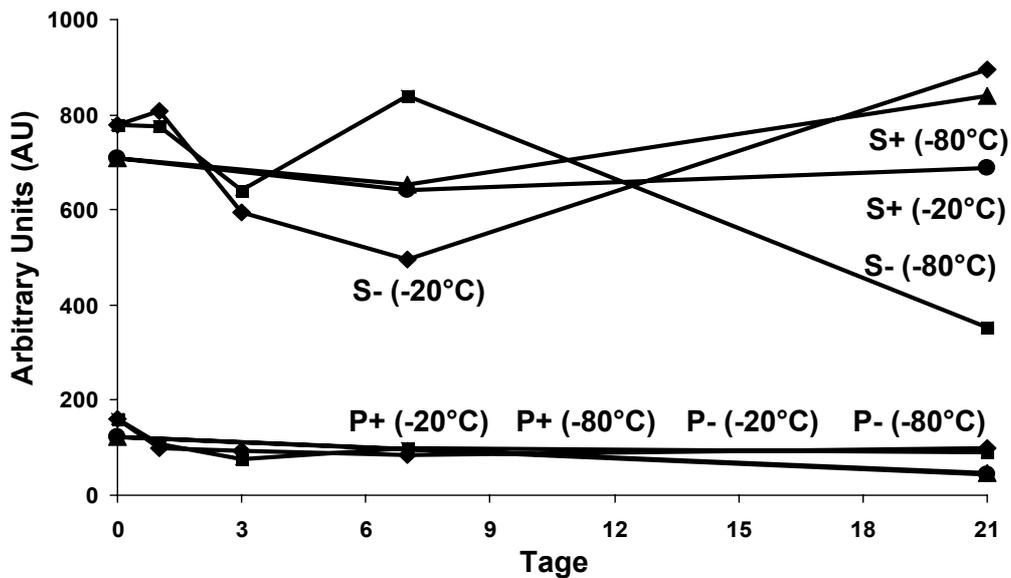
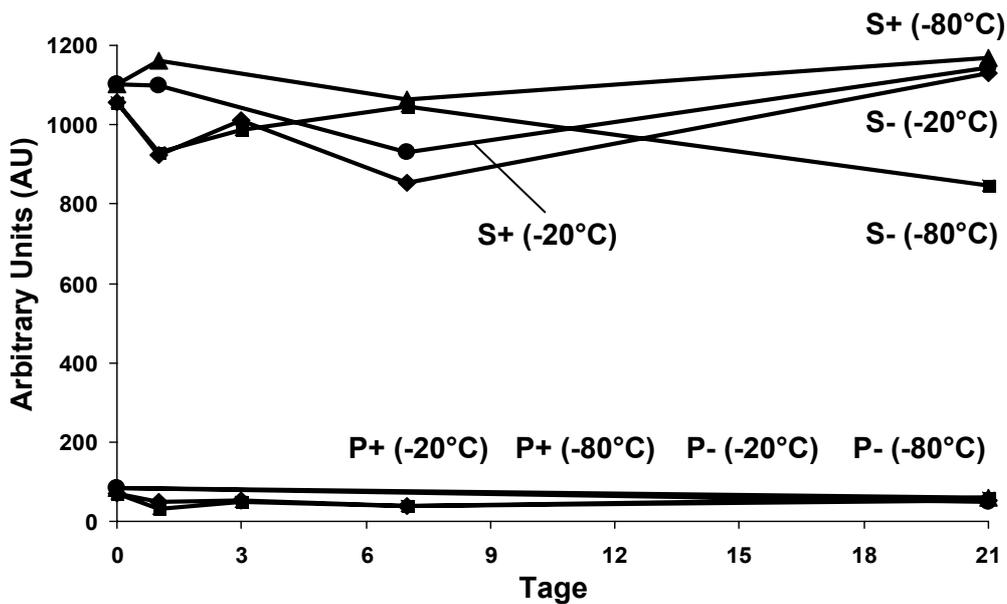


Abbildung 62: Stabilität von Serum und Plasma mit (+) und ohne (-) EDTA-Zusatz bei Proband 8



Einige charakteristische Merkmale konnten bei mehreren Probanden festgestellt werden:

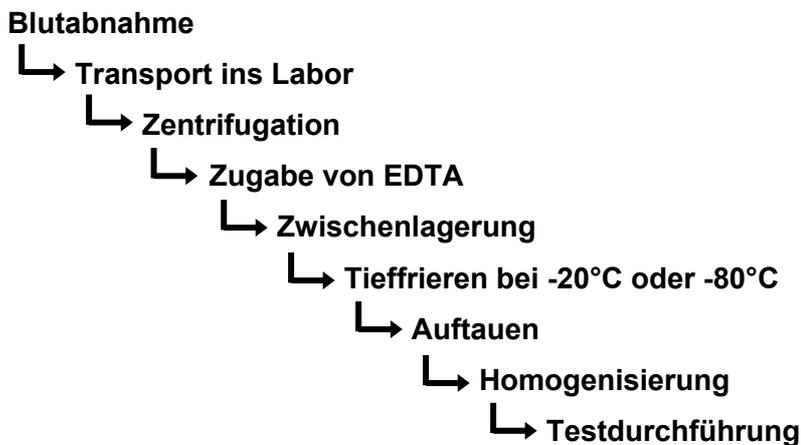
1. Die Plasmen von allen neun Probanden mit geringen Ausgangswerten blieben nach ein, drei, sieben und 21 Tagen auf einem konstant niedrigen Niveau, unabhängig von der EDTA-Zugabe und den Lagerungsbedingungen.
2. Die Seren zeigten je nach Stabilisierung und Lagerungsart variable Verläufe: Bei Raum- und Kühlschrankschranktemperatur sanken die Werte spätestens nach einer bis drei Wochen deutlich ab. Dabei konnte der Zusatz von EDTA nur eine relative Stabilisierung bewirken.
3. Wurden die Seren bei -20°C und -80°C gelagert, wurde kein derartiger Abfall der Werte beobachtet, allerdings waren sie Schwankungen unterschiedlicher Stärke unterworfen. Hier konnte durch die EDTA-Zugabe eine weitgehende Stabilisierung erreicht werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde Serum der Vorzug als Matrix für die Bestimmung der Nukleosomenkonzentration gegeben und bei allen zu untersuchenden Serumproben nach der Zentrifugation eine Stabilisierung mit 10 mM EDTA und die Lagerung bei -20°C oder -80°C vorgenommen.

5.1.4 Präanalytische Probenbehandlung

Die Stabilität des Analyten in der Blutprobe kann während der präanalytischen Aufbereitungs- und Lagerungsphase von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden. Durch diese können die *in vivo*-Verhältnisse verzerrt werden und zu falsch-positiven wie -negativen Messergebnissen führen. Deshalb sind für die Bewertung eines Tests die Untersuchung der präanalytischen Einflussfaktoren und gegebenenfalls eine Standardisierung der präanalytischen Probenbehandlung angezeigt. Die Präanalytik gliedert sich in folgende Abschnitte:

Abbildung 63: Logistischer Ablauf der präanalytischen Probenbehandlung



Unregelmäßigkeiten bei jedem der Schritte können zu Beeinträchtigungen der im Test gemessenen Wertlagen führen. Die möglichen Auswirkungen wurden im Einzelnen überprüft.

Blutabnahme

Venöses Blut wird aus der Cubitalvene durch Einmalabnahme-Besteck liegender oder sitzender Personen entnommen. Dabei befindet sich die Punktionsstelle in etwa auf Höhe des Herzens. Blutabnahme aus Verweilkanülen ist zu vermeiden, da sich um die im Blutgefäß liegenden Kanüle sowie am Eingang ihres Lumens möglicherweise thrombotisches Material ansammeln kann und vermehrt Bruchstücke zugrundegegangener Blutzellen bei der Entnahme mit nach außen geschwemmt werden. Bei der Abnahme aus Portsystemen ist auf genügende Spülung mit physiologischem NaCl zu achten. Aufgrund des Verdünnungseffekts sind die ersten 10 ml des entnommenen Blutes zu verwerfen und erst das darauf gewonnene Blut zu verwenden. Langes Stauen oder Pressen des Armes, „Herumstochern“ sowie starke Aspiration bei Verwendung dünner Nadeln sind ebenfalls zu vermeiden, da durch intravasale Hämolyse oder durch Reizung der Venenwände zusätzliche Zellbestandteile freigesetzt werden können.

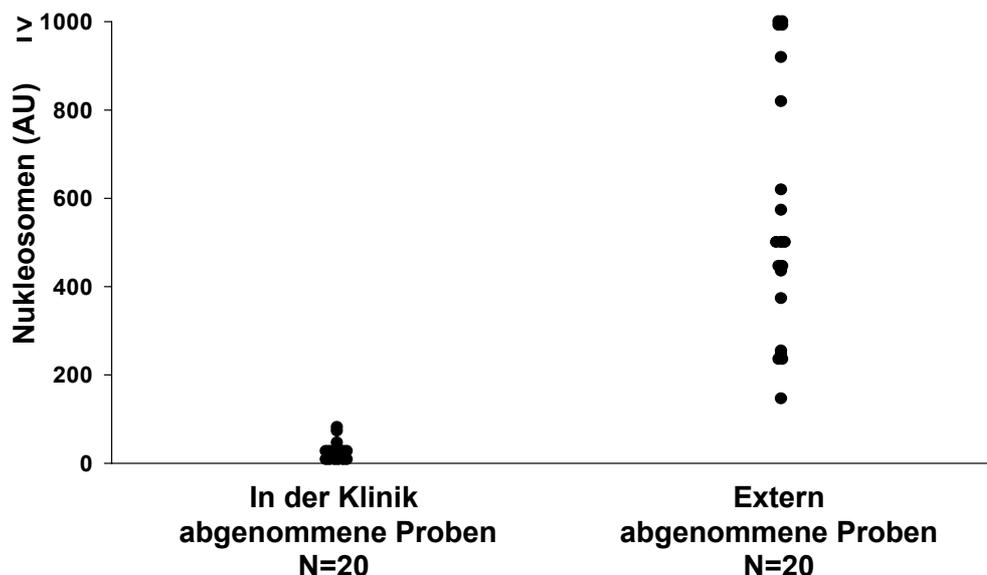
Transport der Blutproben ins Labor

Der Transport ins Labor sollte innerhalb einer Stunde nach Blutabnahme erfolgen, ohne dass die Blutprobe dabei größeren Belastungen ausgesetzt ist. Sonneneinstrahlung und Schütteln können zu einer *in vitro* Hämolyse führen, wodurch die Messungen verfälscht werden.

Bei insgesamt 40 gesunden Probanden wurde Blut für die Nukleosomenbestimmung entnommen. Dabei wurde die Blutabnahme bei einer Gruppe von 20 dieser Personen in der Klinik vorgenommen, wo ein schonender Transport innerhalb von 30 bis 60 Minuten ins Labor gewährleistet war. Bei der anderen Gruppe von ebenfalls 20 hinsichtlich der Altersstruktur vergleichbaren Personen wurde das Blut in einer ambulanten Filiale abgenommen, wo kein Labor verfügbar war. Bis zum Eintreffen im Labor des Klinikums vergingen etwa vier Stunden. Dabei waren die Proben ungekühlt und Temperaturen von circa 35°C ausgesetzt.

Gegenüber den im Klinikum gewonnenen Serumproben wiesen die auswärts abgenommenen Proben fast durchweg deutlich erhöhte Wertlagen auf. Aufgrund der Ähnlichkeit der Probandengruppen dürfte der Unterschied auf die ungeeigneten Transportbedingungen zurückzuführen sein.

Abbildung 64: Einfluß des Transports der Blutproben ins Labor



Die Blutabnahme ist deshalb nach Möglichkeit in einer Einrichtung mit einem direkten und schnellen Zugang zu einem Labor vorzunehmen. Einsendung von Vollblutproben auf dem Postweg dürfen als obsolet gelten.

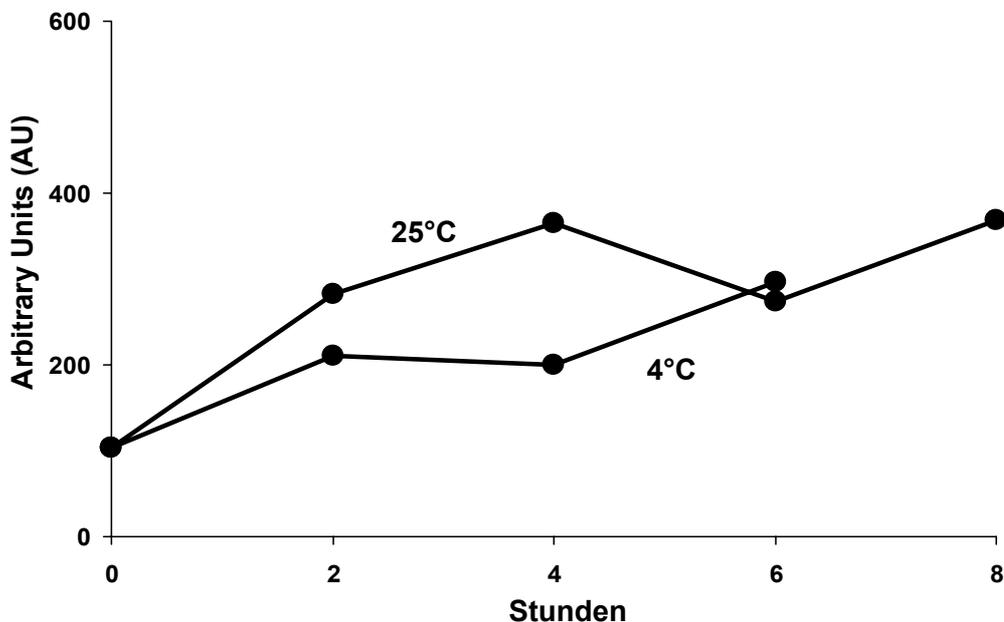
Zentrifugation der Blutproben

Im Zeitraum zwischen Blutabnahme und Zentrifugation können Blutzellen *in vitro* zugrunde gehen und zusätzliche Nukleosomen freisetzen oder das schon in der Probe befindliche Chromatin durch Endonukleasen gespalten werden.

Deshalb wurde die Zeitspanne und die Lagerungsbedingungen zwischen Blutentnahme und der Zentrifugation variiert und deren Bedeutung für die im Test gemessenen Signale untersucht: Die Vollblutproben wurden für 0, 2, 4 und 6 Stunden nach ihrer Entnahme aufbewahrt und bei 37°C, 25°C und 4°C gelagert. Danach wurden sie bei 3000 g zentrifugiert, mit 10 mM EDTA versehen, eingefroren und in einem Testansatz vermessen.

Mit zunehmender Zeitdauer zwischen Blutabnahme und Zentrifugation stiegen die Nukleosomenwerte im Test an. Dieser Effekt war für mehrere Serumproben ähnlich nachweisbar und im Falle der Lagerung bei Raumtemperatur (25°C) oder bei 37°C besonders ausgeprägt; bei Kühlschranktemperatur war der Anstieg weniger deutlich, wie im Folgenden exemplarisch für eine Serumprobe demonstriert ist.

Abbildung 65: Einfluß des Zentrifugationszeitpunkts und der Lagerung



Neben schonender Abnahme und Transport ist somit auf eine möglichst rasche Zentrifugation der Blutproben innerhalb von 2 Stunden nach Entnahme für die verlässliche Nukleosomenbestimmung zu achten.

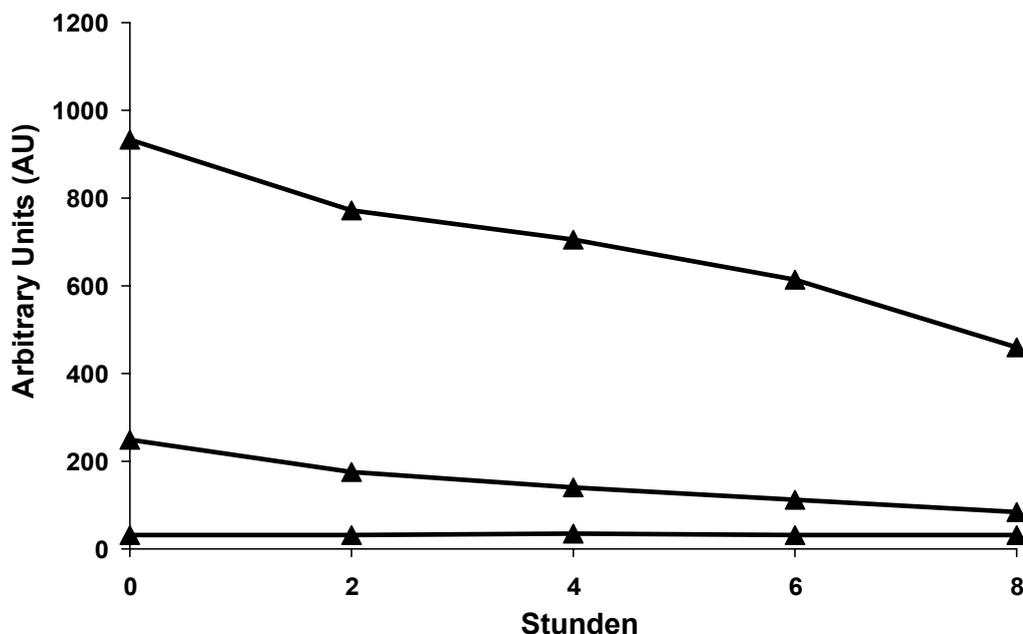
Stabilisierung der Serumproben mit EDTA

Auch nach der Zentrifugation kann die Fragmentierung des Chromatins durch Endonukleasen fortgeführt werden. Dies sollte durch die Stabilisierung mit EDTA, welches das für die Nukleasenaktivität essentielle Ca^{2+} komplexiert, unterbunden werden. Der Einfluss des Zeitpunkts dieser EDTA-Zugabe auf die Messergebnisse wurde in einem weiteren Experiment überprüft:

Nach Zentrifugation wurden drei Serumproben bei 37°C, 25°C und 4°C gelagert, ehe ihnen nach 0, 2, 4, 6 oder 8 Stunden 10 mM EDTA zugegeben wurde. Danach wurden sie sofort bei -20°C eingefroren.

Mit zunehmendem zeitlichem Abstand zwischen Zentrifugation und EDTA-Zugabe sanken die Messsignale im Test linear ab, so dass nach acht Stunden nur noch ungefähr die Hälfte des ursprünglichen Signals vorgefunden wurde. Sehr niedrige und sehr hohe Werte bildeten die Ausnahmen und zeigten wenige Veränderungen, wohl aufgrund der fehlenden Möglichkeit, noch weiter abzusinken, oder weil der Rückgang der Werte über dem erfassten Messbereich lag. Bei diesen Beobachtungen hatte die Lagerungstemperatur keinen wesentlichen Einfluss. Die folgende Abbildung zeigt den Effekt für drei Seren bei Raumtemperatur (25°C).

Abbildung 66: Einfluß des Zeitpunkts der Probenstabilisierung mit EDTA



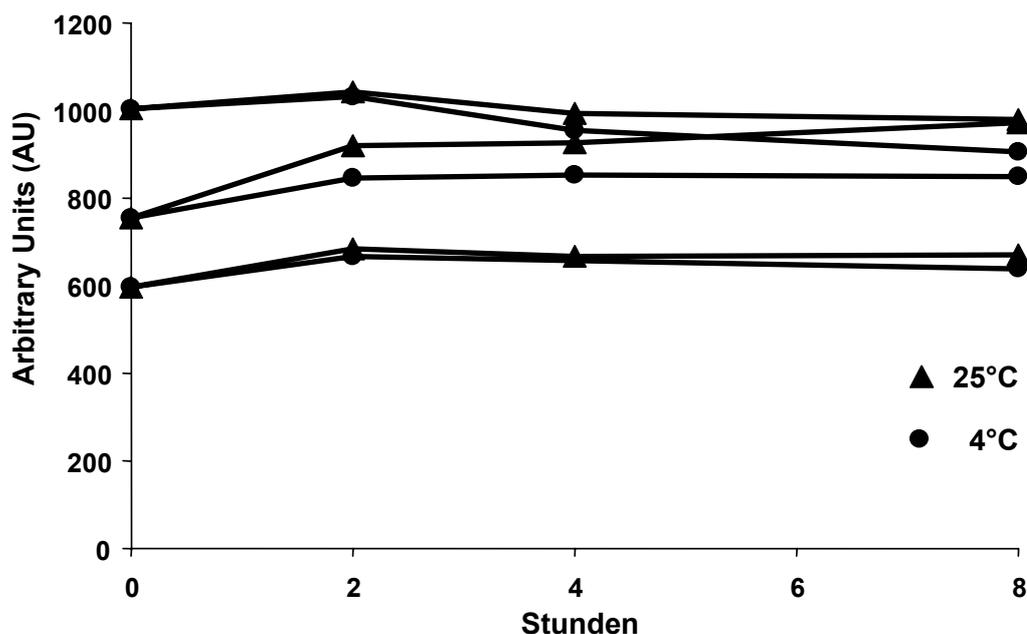
Um einem Verlust der Signalausbeute vorzubeugen, wurde den Serumproben EDTA als Stabilisator unverzüglich nach der Zentrifugation zugegeben.

Zwischenlagerung der Serumproben bis zum Einfrieren

Da es im Routinealltag sehr aufwendig ist, jede einzelne Serumprobe sofort einzufrieren, wurde untersucht, ob die Zeitspanne zwischen dem EDTA-Zusatz und Tieffrieren zu einem Anstieg oder Abfall der Messsignale führt. Nach der Zentrifugation und sofortiger Zugabe von 10 mM EDTA wurden drei Serumproben deshalb für 0, 2, 4 und 8 Stunden bei 37°C, 25°C und 4°C aufbewahrt, ehe sie bei –20°C tiefgefroren wurden.

Trotz zunehmender Lagerungsdauer bis zum Tieffrieren blieben die Messwerte bei allen Serumproben konstant. Auch die unterschiedlichen Temperaturen spielten dabei keine Rolle. Somit konnten die Blutproben nach Zentrifugation und EDTA-Zugaben über den Tag gesammelt und am Abend gemeinsam tiefgefroren werden, was eine erhebliche, logistische Vereinfachung darstellte.

Abbildung 67: Einfluß der Lagerungsbedingungen bis zum Einfrieren



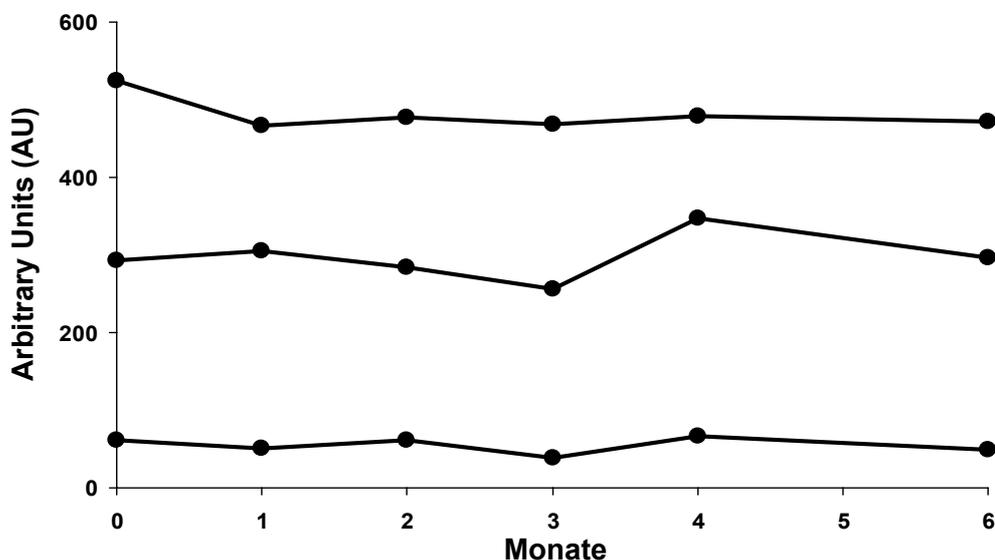
In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, dass nach EDTA-Zugabe die Proben auch bei mehrtägiger Lagerung im Kühlschrank vor dem Tieffrieren konstante Ergebnisse ergaben. Dies unterstreicht den zuverlässig stabilisierenden Effekt von EDTA und erleichtert Untersuchungen in externen Einrichtungen ohne eine Tieffriermöglichkeit: Proben können dort nach der Zentrifugation und Stabilisierung gesammelt und auch an einem der darauf folgenden Tage ins Zentrallabor zur Bestimmung oder zum Tieffrieren transportiert werden.

Langzeit-Stabilität der Serumproben

Die Stabilität der Nukleosomenkonzentrationen über einen längeren Zeitraum ist für vergleichende Messungen von großer Wichtigkeit. Ist sie gewährleistet, können Proben interessierender Patientengruppen aufbewahrt werden, bis eine genügend große Anzahl vorhanden ist, und diese zusammen bestimmt werden. Dadurch kann die Interassay-Impräzision elegant umgangen werden und eine höhere Vergleichbarkeit erreicht werden. Gleiches gilt für Verläufe einzelner Patienten über einen längeren Zeitraum. Werden diese alle in einem Testansatz gemessen, steigt die Aussagekraft der Kinetik, da die Schwankungen zwischen verschiedenen Testen entfallen.

Für die Prüfung der Langzeitstabilität wurden drei Serumproben bei -20°C eingefroren, nach einem, 2, 3, 4 und 6 Monaten aufgetaut und vermessen. Sowohl bei niedrigen, mittleren wie auch bei hohen Werten wurden über den gesamten halbjährlichen Zeitraum stabile Messsignale mit nur geringen Schwankungen beobachtet. Die Variationskoeffizienten betragen zwischen 4,2% und 9,2%.

Abbildung 68: Langzeitstabilität der Serumproben bei -20°C



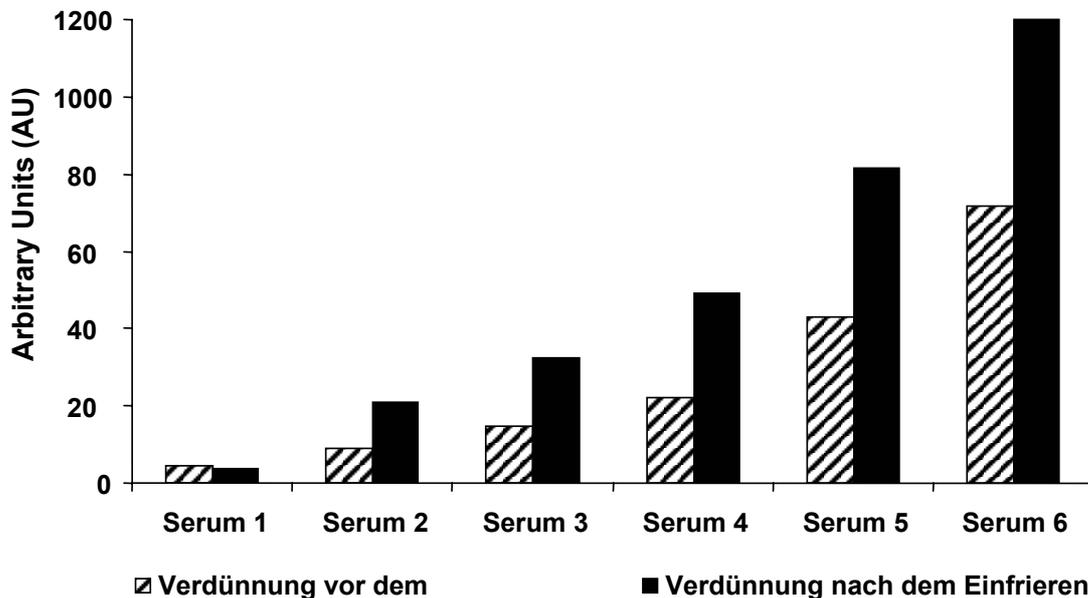
Nach diesen Ergebnissen können Serumproben mindestens sechs Monate bei -20°C oder noch tieferen Temperaturen eingefroren werden, ohne dass die Qualität der Messsignale eingebüßt wird.

Verdünnung der Serumproben vor und nach dem Einfrieren

Durch die Modifikationen des Nukleosomentests wurden sowohl Verdünnungen des Standardmaterials mit Inkubationspuffer für die Kalibrationskurve wie auch die generelle Verdünnung aller Serumproben notwendig. Vor allem für die verschiedenen Standards wäre es von praktischem Vorteil, wenn sie in großem Maßstab verdünnt, aliquotiert und eingefroren werden könnten, um sich die aufwendigen Verdünnungen vor jedem Testansatz zu ersparen.

Deshalb wurde ein Vergleich angestellt zwischen Standards und Serumproben, die jeweils vor dem Einfrieren verdünnt wurden, sowie solchen, die erst vor Durchführung des Tests verdünnt wurden. Unsere Versuche zeigten, dass die bereits vor dem Einfrieren vorgenommenen Verdünnungen eine Abnahme der Messsignale um circa 50% bewirkten. Hingegen wurden stabile Werte erhalten, wenn die Standards oder Serumproben eingefroren wurden und vor der Testdurchführung verdünnt wurden.

Abbildung 69: Einfluß der Probenverdünnung vor und nach dem Einfrieren



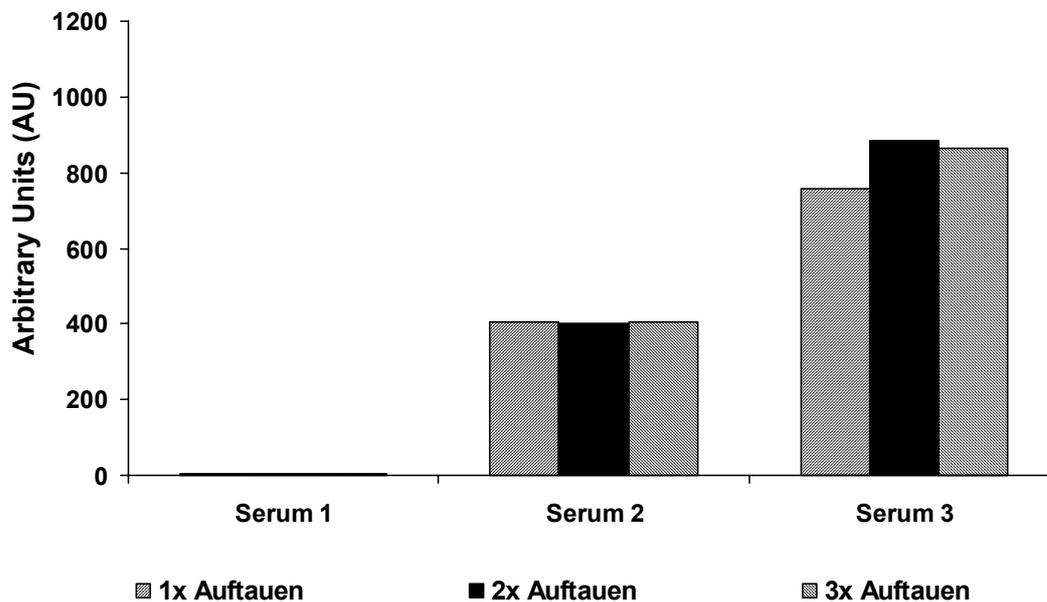
Deshalb wurden Verdünnungen der Standards und Serumproben nur unmittelbar vor dem Einsatz ins Testsystem vorgenommen.

Wiederauftauen von Serumproben

Auch wenn das Gros der Proben im normalen oder erweiterten Messbereich lag, gab es vereinzelt Proben mit weit höheren Werten. Diese wurden bei einem zweiten Testansatz vorverdünnt und ihre tatsächliche Konzentration dann extrapoliert. Für diese Fälle war es wichtig zu wissen, ob die bereits vermessenen Serumproben wieder eingefroren und nochmals aufgetaut werden können oder ob dadurch eine Verfälschung der Messwerte hervorgerufen würde.

Drei Serumproben wurden deshalb je dreimal bei -20°C eingefroren und wieder aufgetaut. Bei jedem Zyklus bestehend aus einmal Einfrieren und Auftauen wurde ein Teil der Probe entnommen, der Rest wurde in den nächsten Zyklus eingeschleust. Zuletzt wurden die Proben aus allen Zyklen in einem Testansatz vermessen. Trotz zunehmender Zyklenzahl wurden für die Serumproben allenfalls geringfügige Schwankungen beobachtet.

Abbildung 70: Einfluß des mehrmaligen Auftauens



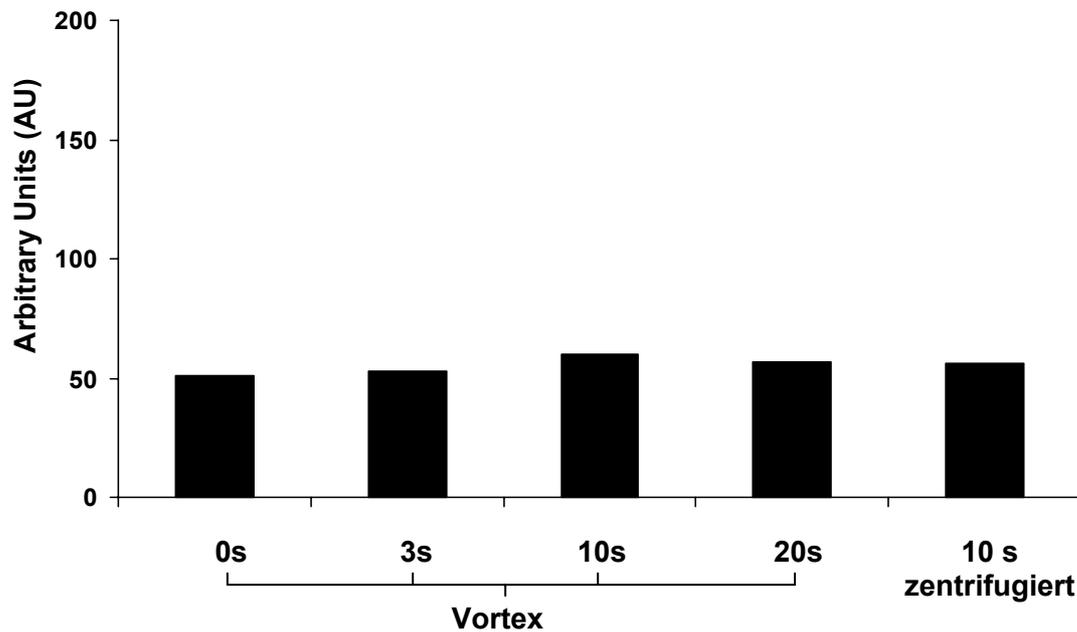
Spätere Untersuchungen zeigten jedoch, dass in Proben, die nach dem Vermessen mit einer Verzögerung von einigen Tagen wieder eingefroren wurden, eine Abnahme des Messsignals zu verzeichnen war. Deshalb wurden bereits vermessene Seren verworfen und nach der initialen EDTA-Zugabe mehrere Aliquots für eventuelle Nachbestimmungen gebildet und eingefroren.

Homogenisierung der Serumproben nach dem Auftauen

Durch die Tieffrierung werden Analyten möglicherweise verändert, in ihrer Struktur aufgebrochen, kristallisieren, bilden Komplexe oder adhäreren an der Gefäßwand. Neben einer genügend langen Auftauphase, die eine optimale Verflüssigung der Probe und eine Anpassung an die Raumtemperatur erlaubt, kommt der Homogenisierung der Proben vermutlich eine Bedeutung für die Herstellung der ursprünglichen Verhältnisse in der Probe und der Höhe der Messwerte zu.

Deshalb wurden Serumproben nach dem Auftauen für eine Minute bei 1600 g zentrifugiert, für ein, 3, 5, 10 Sekunden auf dem Vortex geschüttelt oder unbehandelt in das Testsystem eingesetzt. Anhand der erhaltenen Messwerte konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Homogenisierungsmodalitäten festgestellt werden, wie hier beispielhaft für eine Serumprobe gezeigt ist.

Abbildung 71: Einfluß des Homogenisierens nach dem Auftauen



Für die Testdurchführung wurde eine einheitliche Homogenisierung mittels Vortex für drei Sekunden festgelegt.

5.1.5 Störgrößen

Auch außerhalb der präanalytischen Probenbehandlung können störende Faktoren die Messergebnisse beeinflussen. Dazu zählen:

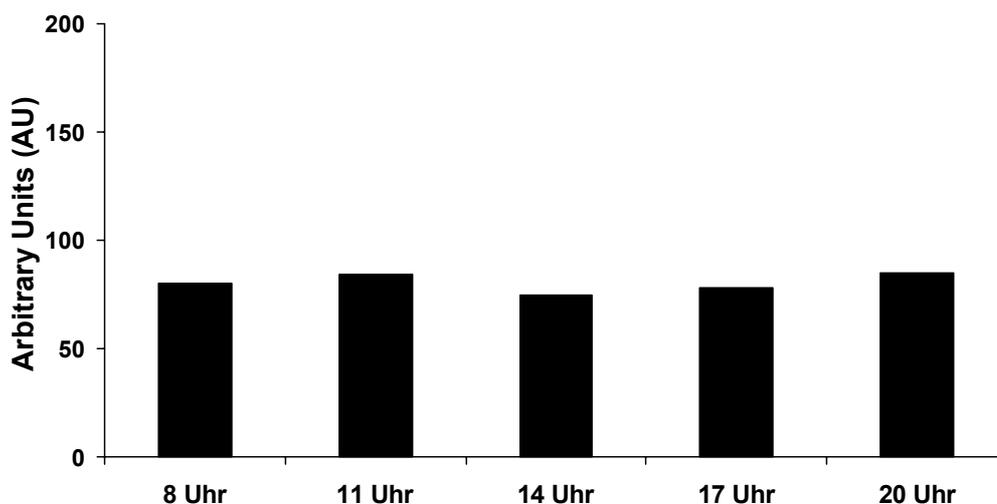
- Schwankungen im zirkadianen Verlauf,
- die Einnahme fettreicher Mahlzeiten,
- die *in vivo* und *in vitro* Hämolyse,
- Kontamination der Proben durch bakterielle DNA oder Detritus,
- Kontaminationen während der Testdurchführung.

Schwankungen im zirkadianen Verlauf

Eine tageszeitliche Rhythmik ist für mehrere biochemische Parameter, insbesondere für verschiedene Hormone, bekannt. Um die zirkadianen Schwankungen der Nucleosomenkonzentration im Blut zu untersuchen, wurden bei einem gesunden Probanden mehrere Blutentnahmen in dreistündlichem Abstand während eines Tages entnommen, beginnend um 8 Uhr morgens bis 6 Uhr abends. Es wurden leichte körperliche Arbeiten durchgeführt und kleinere Mahlzeiten um 9 Uhr, 13 Uhr und 17 Uhr eingenommen.

Im Tagesverlauf blieben die Nucleosomenwerte konstant; es traten keine über einen Variationskoeffizienten von 10% hinausgehenden Schwankungen auf.

Abbildung 72: Einfluß von Schwankungen im zirkadianen Verlauf



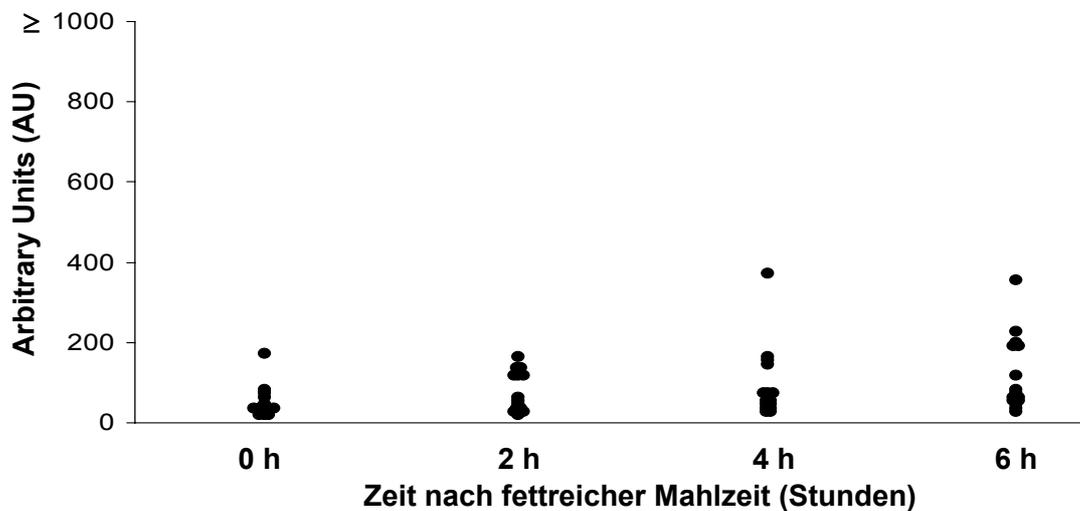
Obwohl durch tageszeitliche Unterschiede keine Messwert-Verzerrungen zu erwarten waren, wurden aus Praktikabilitätsgründen die Blutabnahmen meist morgens vorgenommen.

Einnahme von fettreicher Ernährung

Hyperlipidämien gelten als weitere mögliche Störfaktoren, die Testergebnisse verfälschen können. Zur Überprüfung des Einflusses von fettreicher Ernährung wurde von 15 Probanden, die morgens eine ausgesprochen triglycerid- und cholesterinhaltige Mahlzeit zu sich genommen hatten, vor der Mahlzeit sowie 2, 4 und 6 Stunden danach Blut abgenommen. In dem daraus gewonnenen Serum wurde die Nukleosomenkonzentration, außerdem die Menge der Triglyceride, des Cholesterins und der Lipoproteine bestimmt.

Bei den meisten der Probanden wurde ein geringer Anstieg der Nukleosomenkonzentrationen beobachtet, der seinen Höhepunkt 6 Stunden nach der fettreichen Mahlzeit hatte. Der Triglycerid-Spiegel wies nach 2 Stunden, der VLDL-Spiegel nach 4 Stunden ein Maximum auf. Das Gesamt-Cholesterin, sowie die LDL- und HDL-Fraktionen blieben hingegen konstant. Bei keinem der Lipidmarker zeigte sich eine Korrelation zu den Nukleosomenwerten.

Abbildung 73: Einfluß von der Einnahme fettreicher Ernährung



p = 0,027 sig. (Trend-Test)

Da die Werte nach fettreicher Mahlzeit – wenngleich nur geringfügig – anstiegen, wurden darauf geachtet, dass die Blutabnahmen nicht nach derartiger Fettaufnahme vorgenommen wurden.

In vivo und in vitro Hämolyse

Der Einfluss der intravasalen und *in vitro* Hämolyse wurde bereits im Zusammenhang mit der Blutabnahme und dem Transport der Proben ins Labor erwähnt. Systematisch wurde er durch „Spike-Experimente“ untersucht:

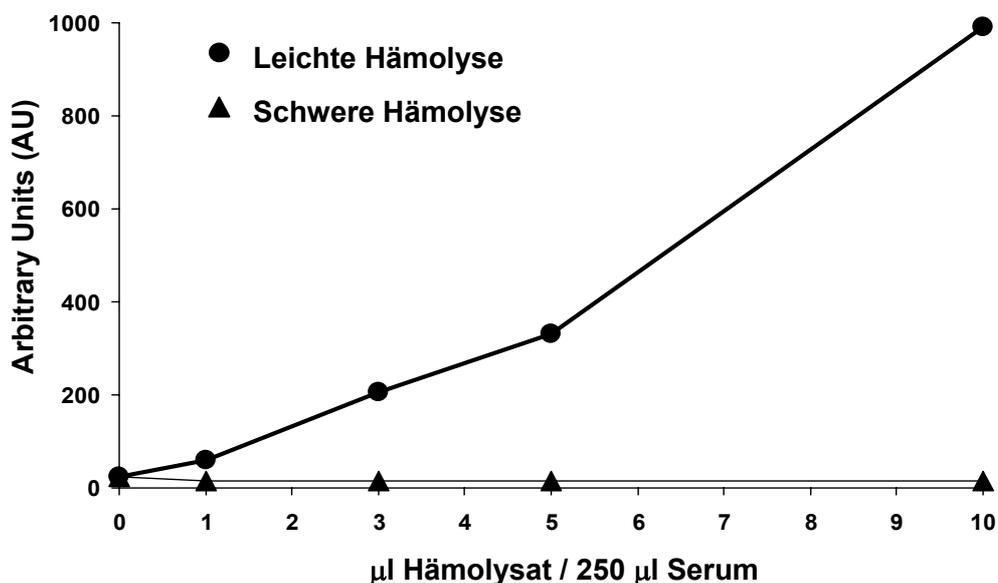
Vollblutproben zweier gesunder Probanden, bei denen zuvor eine nur sehr geringe Nukleosomenkonzentration im Serum gemessen wurde, wurden artifiziell hämolysiert:

- Je eine Vollblutprobe wurde zweimal bei -20°C tiefgefroren und wieder aufgetaut, wodurch die Blutzellen lysierten und ein kirschrotes Hämolysat ergaben.
- Eine weitere Vollblutprobe wurde vier Stunden bei 37°C inkubiert und mehrmals geschüttelt, um die Transportbedingungen extern abgenommener Blutproben zu imitieren. Nach Zentrifugation wurde daraus ein schwach rötlich imponierendes Serum gewonnen.

Diese artifiziell hämolysierten Seren wurden in aufsteigender Konzentration (1 μl , 2 μl , 3 μl , 5 μl , 10 μl) zu 250 μl des normalen, nukleosomenarmen Serums der Probanden titriert und die Höhe des dadurch im Test hervorgerufenen Messsignals bestimmt.

Bei Zusatz der stark hämolysierten Seren zu den Negativ-Seren stieg das gemessene Signal nicht oder nur leicht an. Hingegen war mit zunehmender Konzentration der zugegebenen leicht hämolysierten Seren ein deutlicher und linearer Anstieg des Signals zu verzeichnen.

Abbildung 74: Einfluß von Hämolyse



Neben der Blutabnahme in einer Einrichtung mit direktem Zugang zum Labor wurden deshalb – auch nur gering – hämolysierte Proben gekennzeichnet und nur unter Vorbehalt bestimmt.

Kontamination der Proben durch bakterielle DNA oder Detritus

Inkubation bakterieller Zellen in neutraler Ringer-Lösung

Prokaryotische DNA von Bakterien ist nicht mit Proteinen assoziiert und liegt daher auch nicht in nukleosomaler Form vor. Um zu überprüfen, ob sie tatsächlich nicht durch den CDDE-Test erfasst wird, wurden Bakterien in unterschiedlichen Konzentrationen in neutraler Ringerlösung inkubiert, durch Antibiotika lysiert und die freigesetzte DNA im Überstand gemessen.

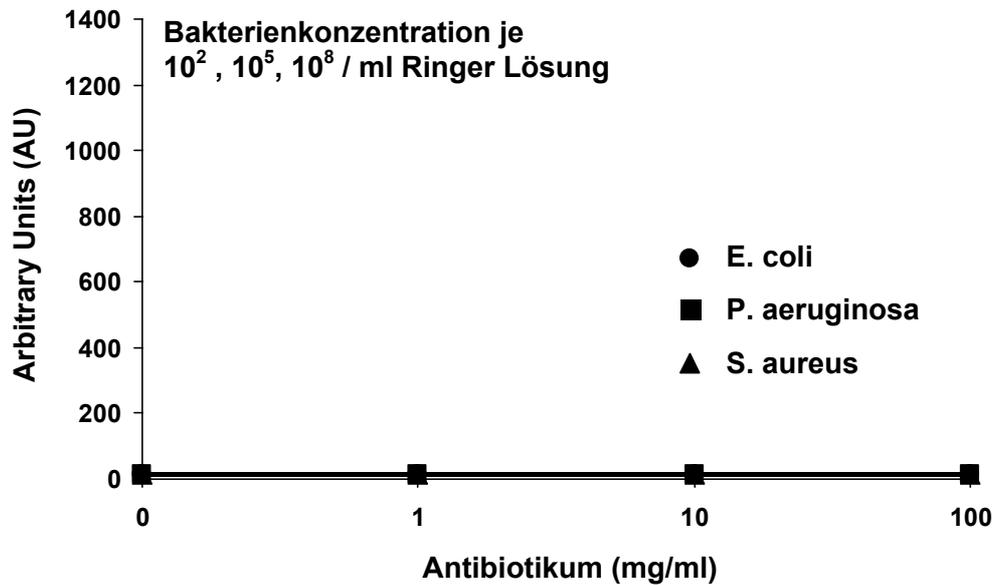
Es wurden im mikrobiologischen Institut aus Probandenmaterial gewonnene Stämme von *Escherichia coli* (E.c.), *Staphylococcus aureus* (S.a.) und *Pseudomonas aeruginosa* (P.a.) verwendet. Diese wurden in Konzentrationen von 10^2 Zellen/ml, 10^5 Zellen/ml und 10^8 Zellen/ml in Ringer-Lösung über vier Stunden inkubiert. Jedem dieser Testansätze wurden initial antibiotische Medikamenten der ersten Wahl für die jeweiligen Bakterienstämme in aufsteigender Konzentration zugegeben: Cefotaxim (1, 10 und 100 mg/ml) für *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus*, Ceftazidim (1, 10 und 100 mg/ml) für *Pseudomonas aeruginosa*.

Während der Inkubationszeit wurden die Bakterien durch die hoch konzentrierten Antibiotika, die den therapeutischen Bereich bei weitem überstiegen, abgetötet und deren DNA freigelegt. Nach zehnmütiger Abzentrifugation der verbleibenden Zellen bei 1600 g wurde der Überstand in den Test eingesetzt und vermessen.

Bei keinem der Bakterienstämme, nicht einmal bei Verwendung der höchsten Konzentration und unter Zugabe der höchsten Menge an Antibiotika, wodurch enorme Mengen an freigesetzter DNA im Überstand erwartet werden konnten, wurde ein messbares Signal im CDDE-Test erhalten.

Die Verwendung von humanem, nukleosomenarmem Serum als Inkubationsmedium erbrachte für alle Konzentrationen an Bakterien und Antibiotika dazu identische Ergebnisse.

Abbildung 75: Einfluß von Bakterien - DNA



Inkubation bakterieller Zellen in Vollblut eines gesunden Spenders

In einem zweiten Experiment wurden dieselben Bakterienstämme (Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa) in den gleichen Konzentrationen (10² Zellen/ml, 10⁵ Zellen/ml, 10⁸ Zellen/ml) mit den gleichen Antibiotikakonzentrationen (Cefotaxim (1, 10 und 100 mg/ml) für Escherichia coli und Staphylococcus aureus, Ceftazidim (1, 10 und 100 mg/ml) für Pseudomonas aeruginosa) über vier Stunden *in vitro* im Vollblut eines gesunden Blutspenders inkubiert.

Während dieser Inkubationszeit reagierten Blutzellen mit den Bakterien, wodurch eine massive Zelltodinduktion humaner und bakterieller Zellen zu erwarten war. Ferner schädigten die Antibiotika nicht nur Bakterien sondern auch menschliche Blutzellen und führten zur Freisetzung von DNA beziehungsweise von Nukleosomen. Nach Zentrifugation der Proben wurden die Nukleosomen im Serum im CDDE-Test bestimmt.

Bei allen Bakterienstämmen wurden bereits bei den niedrigsten eingesetzten Konzentrationen und selbst ohne Zugabe von Antibiotika sehr hohe Messwerte erzielt. Mit zunehmender Antibiotikamenge blieben die Werte konstant hoch.

Abbildung 76: Einfluß bakterieller Kontamination des Blutes
(10^2 Bakterien / ml Vollblut)

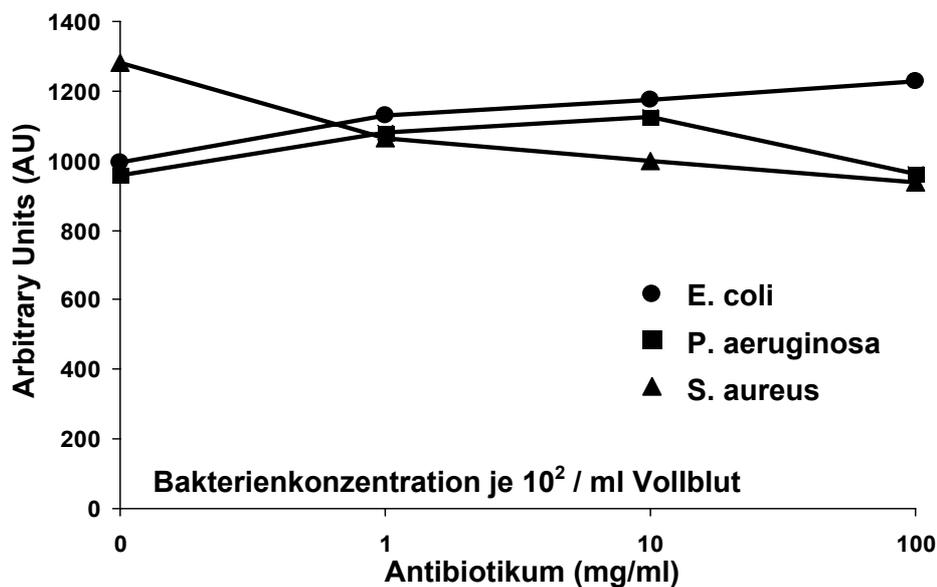
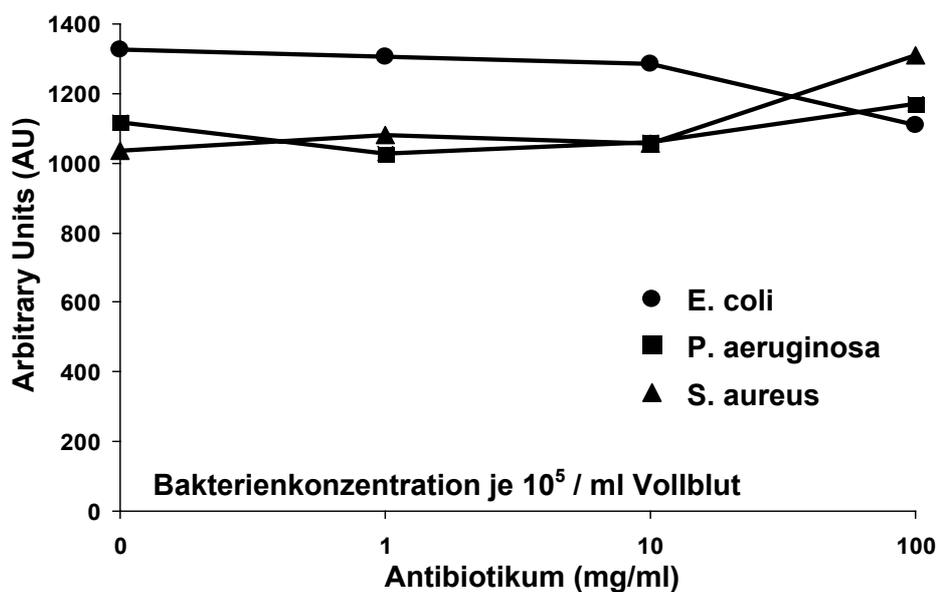


Abbildung 77: Einfluß bakterieller Kontamination des Blutes
(10^5 Bakterien / ml Vollblut)



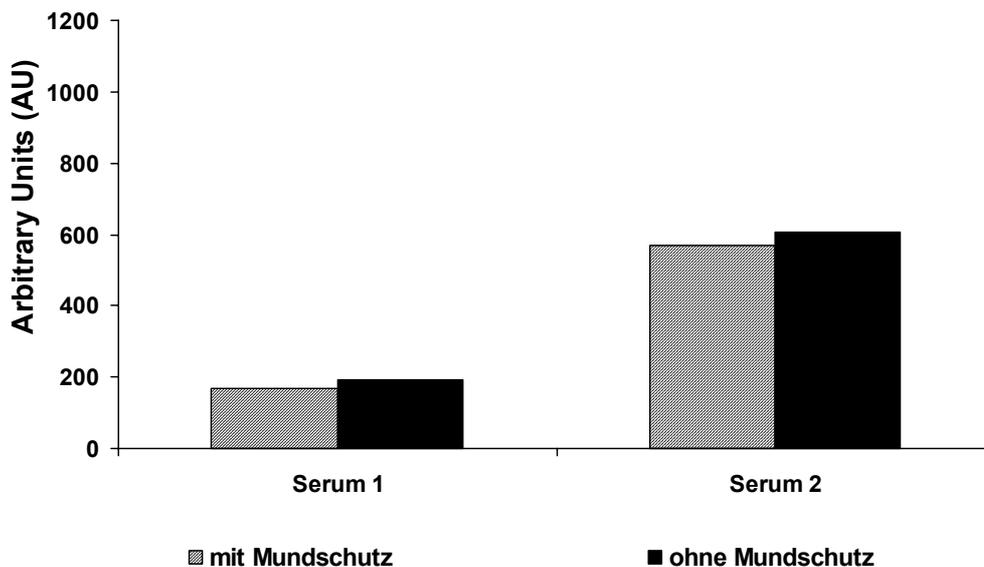
Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass bakterielle DNA durch den Nukleosomentest nicht erfasst wird, während Bakterien – sofern sie in menschlichem Blut inkubiert werden – zu einer starken Freisetzung von humanen Nukleosomen führen, die sich in stark positiven Messergebnissen niederschlagen.

Kontaminationen während der Testdurchführung

DNA-Bestimmungen – zumal auf PCR-Basis – müssen unter besonderen Vorsichtsmaßnahmen durchgeführt werden, um Kontaminationen durch fremde DNA während der Testdurchführung zu vermeiden. Die Anfälligkeit der Nukleosomenmessung für externe Kontaminationen wurde durch ein Zusatzexperiment untersucht, bei dem für die Hälfte des Tests vom Ausführenden konsequent Mundschutz getragen wurde, bei der anderen Hälfte nicht. Einige Proben wurden auf beiden Hälften eingesetzt. Diese Testproben auf der nicht geschützten Seite wurden zusätzlich durch Husten einer Person mit grippalem Infekt kontaminiert.

Die Ergebnisse der Testproben der vorsichtig behandelten Seite und der ungeschützten Seite, die zusätzlich kontaminiert wurden, unterschieden sich nur unwesentlich. So konnte auf das Tragen eines Mundschutzes oder sonstige Vorsichtsmaßnahmen verzichtet werden.

Abbildung 78: Einfluß der Kontamination des Tests



5.1.6 Zusammenfassung der methodischen Ergebnisse

Durch die beschriebenen methodischen Untersuchungen zum CDDE-Test wurde die Grundlage für weitere klinische Austestungen geschaffen. Im Einzelnen wurden folgende Resultate erzielt:

1. Durch die Festlegung der Farbentwicklungszeit auf 30 Minuten sowie die Einführung einer Standardkurve mit relativer Skalierung konnte das Testsystem und die Testdurchführung standardisiert und eine quantitative Bestimmung der Nukleosomen ermöglicht werden. Verdünnungslinearität des Standardmaterials sowie der Serumproben sind vorhanden. Der höchste Standardwert ist eine 1:24 Verdünnung des Referenzmaterials mit Inkubationspuffer und erreicht nach 30 min. ABTS-Inkubationszeit den oberen Messbereich des Photometers bei einer optischen Dichte von 2500 mU. Diesem wird der relative Wert 1000 AU (Arbitrary Units) zugeordnet. Serumproben werden generell vor der Testdurchführung 1:4 mit Inkubationspuffer verdünnt.
2. Die Qualität des Tests wird durch eine für manuelle Verfahren zu fordernde Intraassay-Varianz <10% und Interassay-Varianz <15% beschrieben. Die analytische Spezifität ist gegeben; die analytische Sensitivität liegt bei 16 AU.
3. Im Serum werden gegenüber Plasma höhere Nukleosomenkonzentrationen gemessen. Als Untersuchungsmatrix wird im folgenden Serum verwendet. Nach Stabilisierung mit 10 mM EDTA und Lagerung bei -20°C oder -80°C werden konstante Werte über mehrere Wochen erreicht.
4. Die präanalytische Probenbehandlung ist essentiell für die Verlässlichkeit der Testergebnisse. Es wird folgendes Procedere vorgeschlagen:
 - Die Blutabnahme wird möglichst in einer Einrichtung mit direktem Zugang zu einem Labor mittels eines Einmalabnahmebestecks schonend vorgenommen, ohne zusätzliche Hämolyse hervorzurufen.
 - Die Blutproben werden möglichst zügig innerhalb von 30 bis 60 Minuten ins Labor transportiert, ohne sie Belastungen durch Wärmeexposition oder Schütteln auszusetzen.

- Die Zentrifugation wird innerhalb von zwei Stunden nach Blutentnahme bei 3000 g über 10 Minuten durchgeführt.
 - Unmittelbar danach wird den dekantierten Seren 10 mM EDTA zugegeben. Dann werden diese im Kühlschrank bei 4°C zwischengelagert.
 - Noch am gleichen Tag werden die Serumproben aliquotiert und bei -20°C oder -80°C eingefroren.
 - Nach dem Auftauen werden die Proben für drei Sekunden durch Vortexen homogenisiert.
 - Verdünnungen des Standardmaterials und der Serumproben werden erst unmittelbar vor Testbeginn vorgenommen.
 - Nach Vermessen der Serumproben werden diese verworfen.
5. Als mögliche Störgrößen wurden Hämolyse und bakterielle Kontamination der Blutproben identifiziert. Zirkadiane Schwankungen und fettreiche Ernährung beeinflussen allenfalls geringfügig die Messwerte. Besondere Vorsichtsmaßnahmen während der Testdurchführung, wie das Tragen eines Mundschutzes, sind nicht notwendig.

5.2 Klinische Evaluierung anhand von Querschnittsuntersuchungen

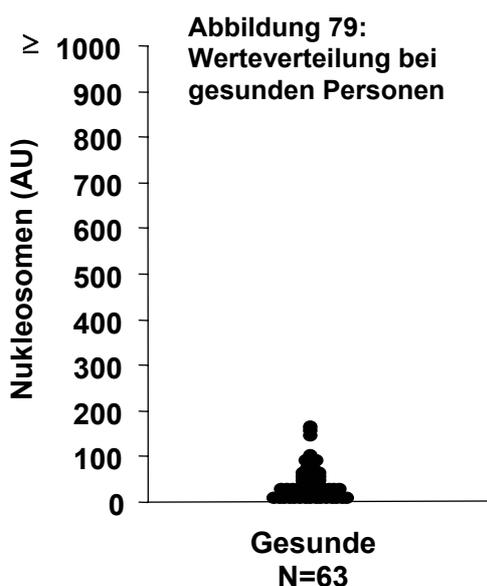
5.2.1 Werteverteilung der prätherapeutischen Nukleosomenkonzentrationen

Die spontane Nukleosomenkonzentration im Serum spiegelt die Freisetzung der Nukleosomen durch Zelltodprozesse oder Sekretionsvorgänge wider, die nicht durch medikamentöse oder andere therapeutische Interventionen manipuliert wurden. Bei Personen mit bekanntermaßen gesteigertem Zellumsatz und somit auch höherem Zelltodvorkommen – wie Patienten mit malignen Tumoren – müssten demnach deutlich höhere, spontane Nukleosomenwerte im Serum zu erwarten sein, sofern die Zelltodprodukte Anschluss ans Blutgefäßsystem gewinnen.

Um zu überprüfen, ob anhand dieser spontanen Nukleosomenwerte Tumorpatienten identifiziert werden können, das heißt ob der Quantifizierung der Nukleosomen eine diagnostische Bedeutung zukommt, wurde Serum von Personen mit verschiedenen Tumorentitäten untersucht. Als Kontrollgruppen wurden gesunde Personen und Personen mit benignen Erkrankungen ausgewählt. Darunter befand sich auch eine Untergruppe von Personen, die an akuten Infekten erkrankt waren.

Gesunde Personen

Die Gruppe der gesunden Probanden zeigte ein homogenes Verteilungsmuster der Nukleosomenwerte. Diese waren für alle untersuchten Personen auf einem sehr niedrigen Niveau mit einer Bandbreite von < 16 AU bis 156 AU. Der Mittelwert lag bei 36 AU, der Median bei 24 AU. Die für Spezifitätsberechnungen relevante 95% Perzentile wurde bei 98 AU berechnet.



Innerhalb des Kollektivs konnten keine Unterschiede der Wertlagen hinsichtlich der Altersverteilung, des Geschlechts, der Lebensgewohnheiten bezüglich des Alkohol- oder

Nikotinkonsums sowie der subjektiven Stressbewertung auf einer Skala von 1 (= minimal) bis 10 (= maximal) der Personen gefunden werden.

Tabelle 17: Werteverteilung in Abhängigkeit von Geschlecht und Alter bei gesunden Personen

Gesunde Personen	Gesamt	Geschlecht		Alter (Quintile)				
		W	M	20-24	25-29	30-33	34-45	46-60
Anzahl	63	34	29	13	12	13	12	13
Median (AU)	24	35	19	27	41	18	24	23
Mittelwert (AU)	36	39	32	50	45	32	26	40
Bandbreite	<16-156	<16-156	<16-150	<16-156	<16-145	<16-77	<16-53	<16-99
p-Wert		p = 0,110		p = 0,494				

Abbildung 80: Abhängigkeit der Wertlagen vom Nikotinkonsum

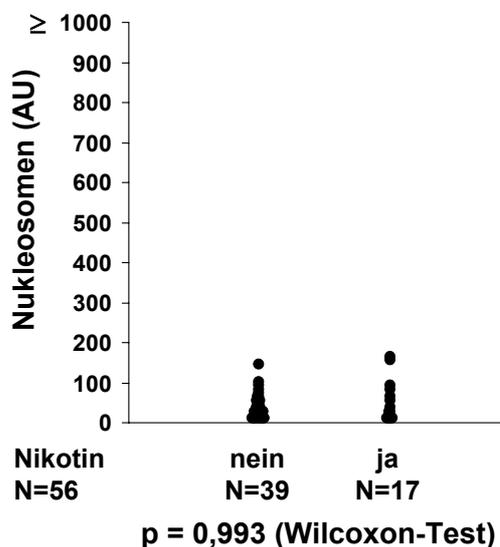


Abbildung 81: Abhängigkeit der Wertlagen vom Alkoholkonsum

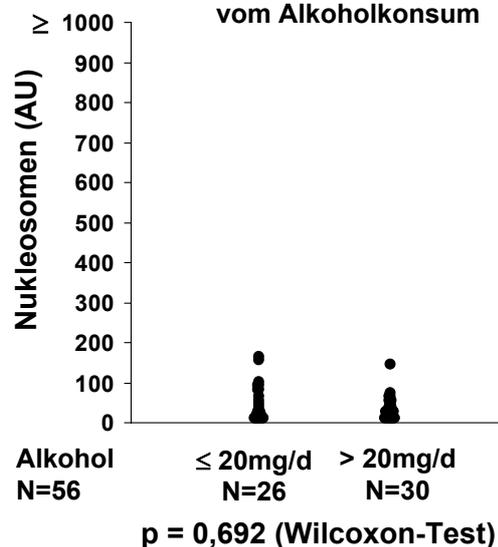
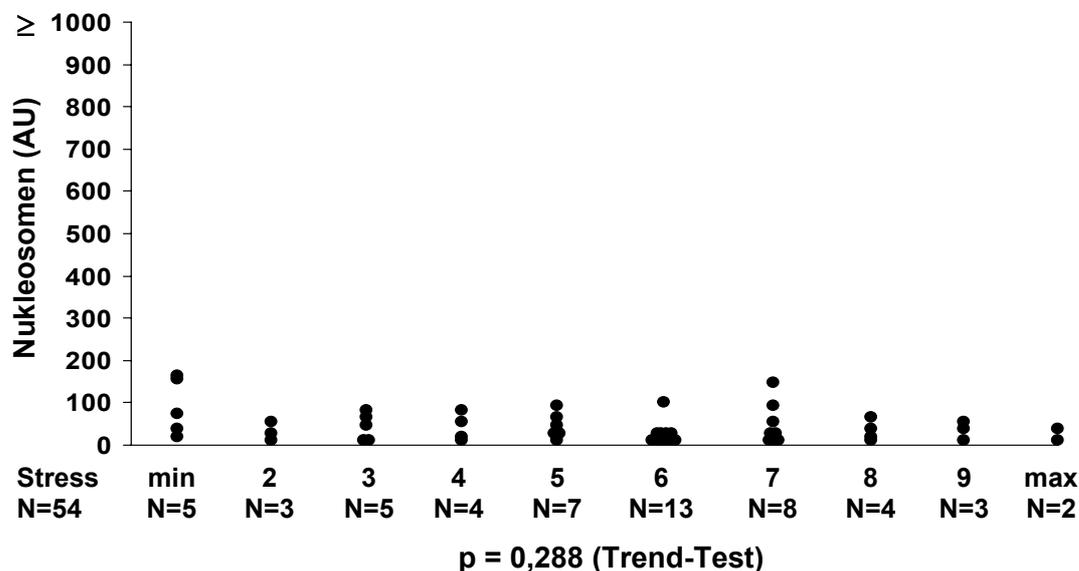


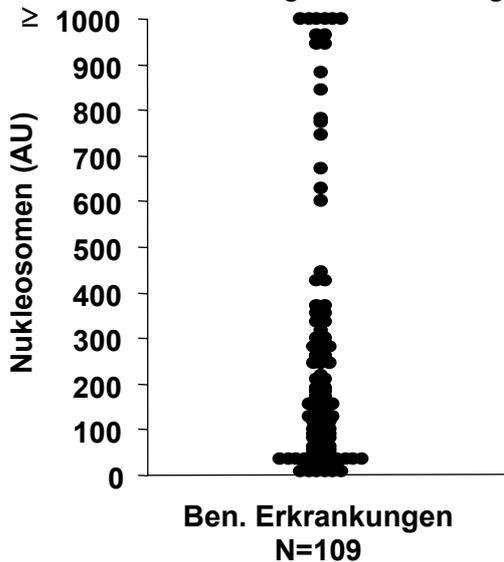
Abbildung 82: Abhängigkeit der Wertlagen von der subjektiven Stressbewertung



Patienten mit benignen Erkrankungen

Bei Patienten mit benignen Erkrankungen hingegen war ein breites Spektrum an Wertlagen anzutreffen, das sich von < 16 AU bis zu 1248 AU erstreckte. Der Mittelwert war mit 264 AU

Abbildung 83: Werteverteilung bei Patienten mit benignen Erkrankungen



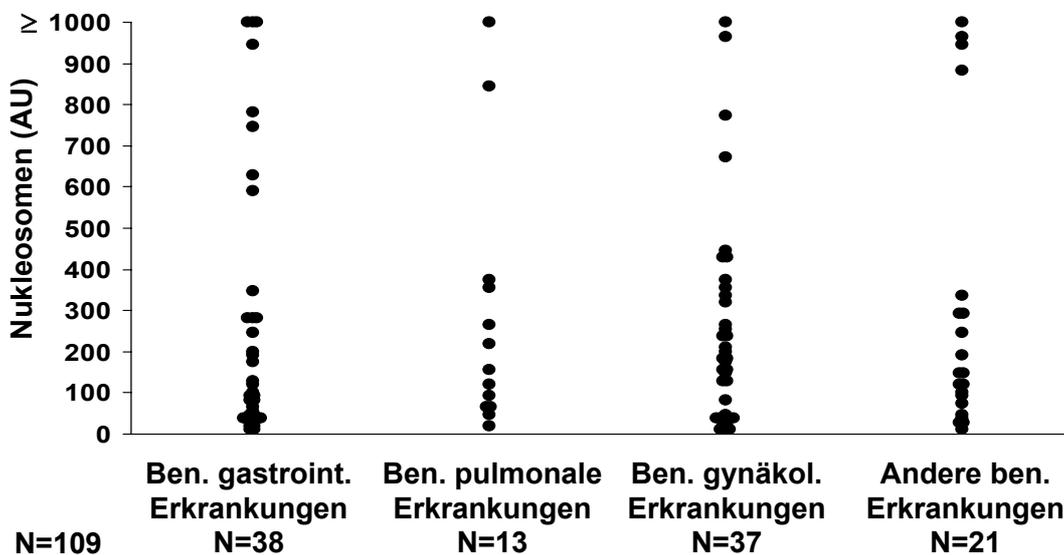
deutlich höher, ebenso der Median mit 146 AU. Die 95%-Perzentile lag hier bei 988 AU.

Bei organspezifischer Aufgliederung des Kollektivs waren geringe Unterschiede erkennbar, die in der folgenden Abbildung illustriert sind.

Dabei bildeten Patienten mit benignen gastrointestinalen Erkrankungen mit etwas niedrigeren medianen Werten, Patienten mit benignen gynäkologischen Erkrankungen mit eher höheren medianen Werten den Rahmen.

Jedoch variierten die Werte interindividuell sehr stark.

Abbildung 84: Werteverteilung bei verschiedenen benignen Erkrankungen



Die höchsten Werte erzielten Patienten mit Pankreatitiden, einer Divertikulitis, einem Lungenabszess, einer Ovarialzyste, einem Uterus myomatosus, Osteitiden und einem Herzinfarkt.

Hinsichtlich des Geschlechts und des Alters der Patienten konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Tabelle 18: Werteverteilung bei Patienten mit benignen Erkrankungen in Abhängigkeit von Geschlecht und Alter

Patienten mit benignen EK	gesamt	Geschlecht		Alter (Quintile)				
		W	M	13-33	34-45	46-57	58-67	68-90
N	109	67	42	22	22	21	22	22
Median (AU)	146	178	103	193	201	95	50	131
Mittelwert (AU)	264	264	264	221	328	264	224	287
Bandbreite	<16-1249	<16-1138	<16-1249	<16-669	<16-1026	31-1050	<16-1249	<16-1138
p-Wert		p = 0,249		p = 0,178				

Patienten mit entzündlichen Erkrankungen

Innerhalb der Gruppe der Patienten mit benignen Erkrankungen wurde die Subgruppe der akut entzündlichen Erkrankungen gesondert betrachtet. Dabei wurde nach dem Schweregrad der Infektion unterschieden, der wiederum mittels des C-reaktiven Proteins beurteilt wurde.

Bei diesem Vergleich wiesen Patienten mit den niedrigsten CRP-Werten im Durchschnitt die geringsten Nukleosomenkonzentrationen im Serum auf. Für die Gruppe mit $\text{CRP} \leq 1 \text{ mg/dl}$ wurde der Mittelwert mit 135 AU der Median mit 66 AU bestimmt. Mit zunehmenden CRP-Werten stiegen auch die detektierten Nukleosomenmengen an und erreichten ihren höchsten Stand bei der Gruppe mit $\text{CRP} > 20 \text{ mg/dl}$. Dort lag der Mittelwert bei 569 AU und der Median bei 540 AU.

Abbildung 85: Werteverteilung bei Patienten mit entzündlichen Erkrankungen

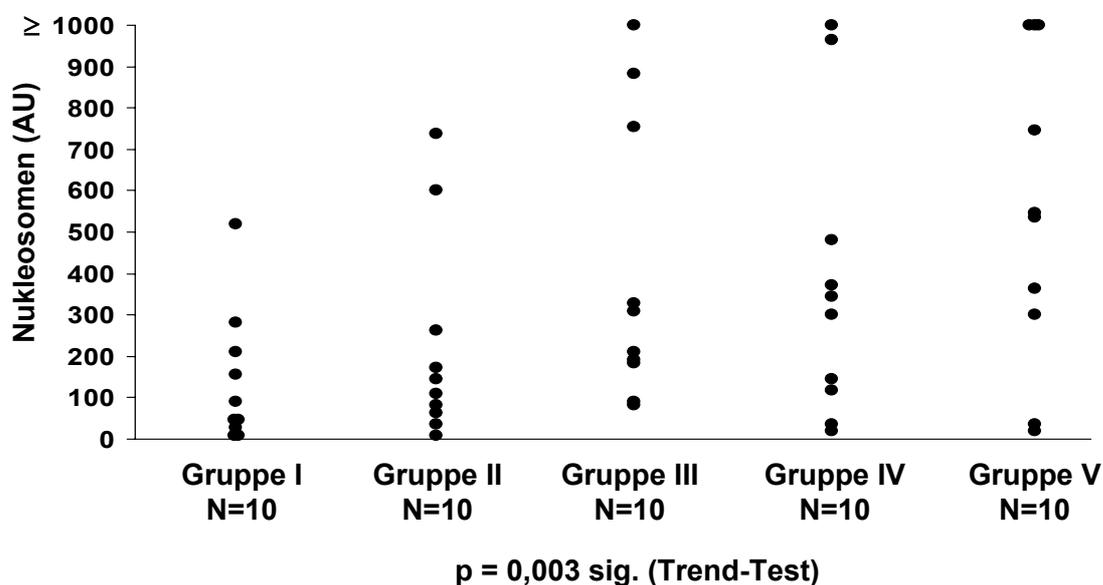


Tabelle 19: Wertlagen in Abhängigkeit von der Konzentration des C-reaktiven Proteins

	Anzahl	Nukleosomenkonzentration im Serum (AU)				
		Mittelwert	Median	75 %	95 %	Bandbreite
Gruppe I (CRP \leq 1mg/dl)	10	135	66	188	407	<16 – 511
Gruppe II (1mg/dl < CRP \leq 5mg/dl)	10	219	123	239	669	<16 – 732
Gruppe III (5mg/dl < CRP \leq 10mg/dl)	10	413	251	645	1022	80 – 1138
Gruppe IV (10mg/dl < CRP \leq 20mg/dl)	10	377	315	451	1002	<16 – 1036
Gruppe V (CRP > 20mg/dl)	10	569	540	974	1062	<16 – 1071

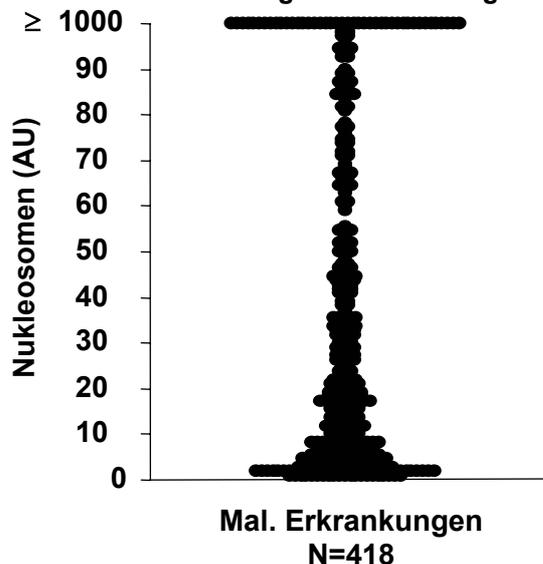
Ungeachtet dieser eindeutigen Korrelation ist allerdings darauf hinzuweisen, dass bei einzelnen Patienten starke Abweichungen auftraten. So fanden sich auch bei Patienten mit niedrigen CRP-Werten hohe Nukleosomenwerte. Ebenso waren bei Patienten mit sehr hohen CRP-Werten vereinzelt niedrige Nukleosomenkonzentrationen festgestellt worden.

Auch bei gleichzeitiger (multivariater) Berücksichtigung von Alter und CRP war die Altersverteilung ohne Einfluss auf die Nukleosomenwerte, während der Einfluss des CRP signifikant blieb.

Patienten mit malignen Tumoren

Bei der Gruppe der Patienten mit malignen Tumoren wurden verschiedenste Tumorentitäten

Abbildung 86: Werteverteilung bei Patienten mit malignen Erkrankungen

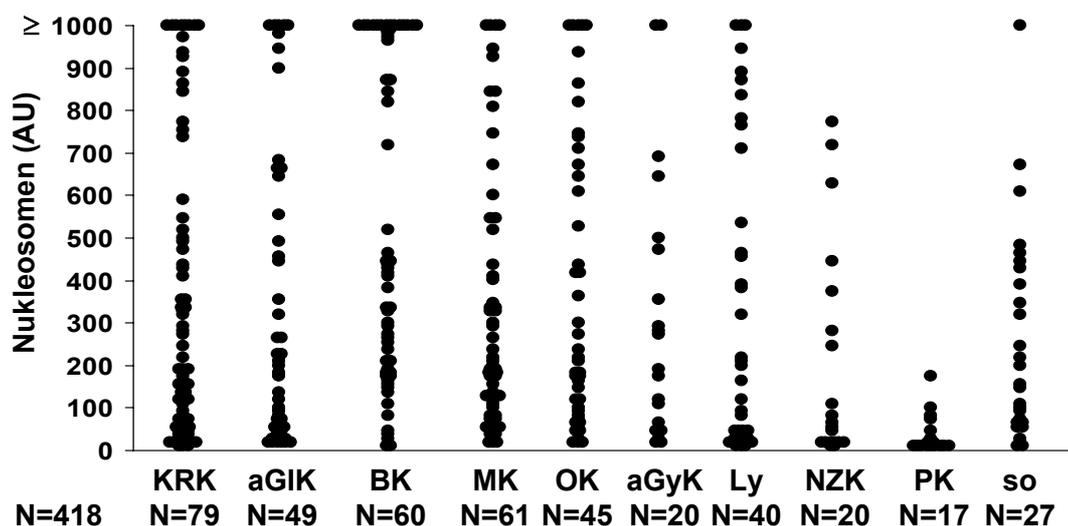


in allen Stadien erfasst. Ähnlich wie bei den Patienten mit benignen Erkrankungen umfasste die Werteverteilung eine große Bandbreite und reichte von < 16 AU bis 1812 AU. Der Mittelwert befand sich bei 350 AU, der Median bei 190 AU.

Die Analyse der einzelnen Tumorarten legte große intertumorale Unterschiede offen: Die höchsten Nukleosomenwerte wurden im Serum von Patienten mit Bronchialkarzinom mit einem Mittelwert von 569 AU und einem

Median von 416 AU beobachtet. Patienten mit Prostata-Karzinom hingegen hatten durchwegs niedrige Serumnukleosomenkonzentrationen (Mittelwert 31 AU; Median <16 AU). Dazwischen rangierten die Patienten mit den verschiedenen anderen Tumorerkrankungen.

Abbildung 87: Werteverteilung bei verschiedenen malignen Erkrankungen



(KRK=Kolonreales Karzinom, aGIK=andere gastrointestinale Karzinome, BK=Bronchialkarzinom, MK=Mammakarzinom, OK=Ovarialkarzinom, aGyK=andere gynäkologische Karzinome, Ly=Lymphome, NZK=Nierenzellkarzinom, PK=Prostatakarzinom, so=sonstige Karzinome)

Die folgenden Tabellen fassen die Ergebnisse der spontanen Nukleosomenkonzentration im Serum aller untersuchten Patientengruppen zusammen:

Tabelle 20: Werteverteilung bei gesunden Personen und Patienten mit benignen Erkrankungen

	Anzahl	Nukleosomenkonzentration im Serum (AU)				
		Mittelwert	Median	75 %	95 %	Bandbreite
Gesunde Personen	63	36	24	50	98	<16 – 156
Pat. mit benignen Erkrankungen	109	264	146	330	988	<16 – 1249
Benigne pulmonale Erkrankungen	13	273	149	349	906	<16 – 1006
Benigne gastrointestinale Erkrankungen	38	265	93	279	1022	<16 – 1248
Benigne gynäkologische Erkrankungen	37	244	177	336	806	<16 – 1026
Andere benignen Erkrankungen	21	293	139	291	960	<16 – 1138

Tabelle 21: Werteverteilung bei Patienten mit malignen Erkrankungen

	Anzahl	Nukleosomenkonzentration im Serum (AU)				
		Mittelwert	Median	75 %	95 %	Bandbreite
Pat. mit malignen Erkrankungen	418	350	190	528	1084	<16 – 1812
Bronchialkarzinom	60	569	416	984	1195	<16 – 1812
Kolorektales Karzinom	79	343	187	505	1074	<16 – 1191
<i>Kolon</i>	30	320	157	460	1105	<16 – 1191
<i>Rektum</i>	28	384	229	784	1066	<16 – 1109
<i>Sigma</i>	21	323	188	491	1020	<16 – 1073
Andere gastrointestinale Karzinome	49	334	175	550	1051	<16 – 1252
<i>Ösophagus</i>	8	568	562	1008	1170	<16 – 1252
<i>Magen</i>	17	323	175	443	1082	18 – 1116
<i>Leber- / Gallenblase</i>	13	295	196	656	782	<16 – 973
<i>Pankreas</i>	11	227	92	286	722	19 – 894
Mammakarzinom	61	330	185	432	1032	<16 – 1260
Ovarialkarzinom	45	391	216	670	1086	<16 – 1347
Andere gynäkologische Karzinome	20	347	232	477	1264	<16 – 1424
<i>Korpus</i>	4	482	222	560	1251	61 – 1424
<i>Zervix / Vulva</i>	16	314	235	477	828	<16 – 1256
Lymphom	40	324	136	572	1012	<16 – 1137
<i>NHL / Plasmozytom</i>	32	288	84	407	970	<16 – 1137
<i>Morbus Hodgkin</i>	8	470	490	735	994	<16 – 1080
Nierenzellkarzinom	20	194	60	299	716	<16 – 767
Prostatakarzinom	17	31	< 16	44	110	<16 – 167
Sonstige Karzinome	27	249	151	404	651	<16 – 1032

Hinsichtlich des Medians konnten die Tumorarten in folgender Reihenfolge abgestuft werden:

Bronchialkarzinom (BK) – andere gynäkologische Karzinome (aGyK) –
Ovarialkarzinom (OK) – kolorektales Karzinom (KRK) – Mammakarzinom (MK)
– andere gastrointestinale Karzinome (aGIK) – sonstige Karzinome (so) –
Lymphome (Ly) – Nierenzellkarzinom (NZK) – Prostatakarzinom (PK).

Da die Verteilungen, Mittelwerte und Mediane beim Kolon-Karzinom und den anderen gastrointestinalen Karzinomen sowie beim Ovarial-Karzinom und den anderen gynäkologischen Karzinomen in etwa entsprachen, wurden sie für die weiteren Berechnungen in die Gruppen der gastrointestinalen bzw. die der gynäkologischen Karzinome zusammengefasst.

5.2.2 Diagnostische Wertigkeit der Nukleosomen im Serum

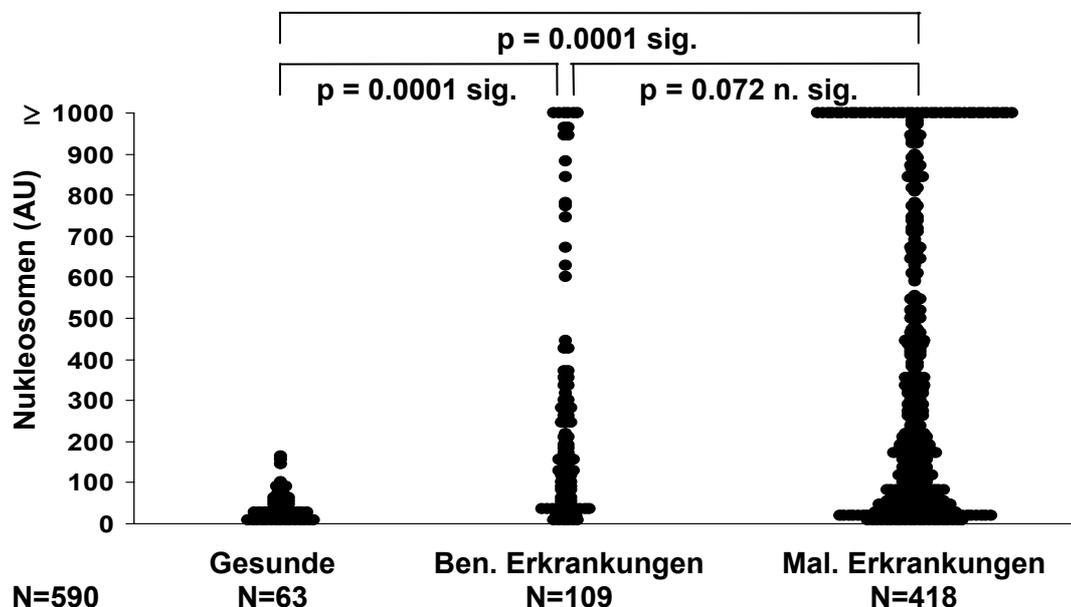
Die diagnostische Wertigkeit eines biochemischen Parameters bemisst sich am Vergleich mit relevanten Kontrollgruppen. Dieser kann durch Signifikanzanalysen des Unterschiedes zwischen den Gruppen als ganzes objektiviert werden. Feiner nuanciert wird die Diskriminationsfähigkeit eines Parameters über das vollständige Sensitivitäts-Spezifitäts-Spektrum durch ROC-Kurven dargestellt.

Zunächst wurde die Hypothese, dass die Nukleosomenkonzentration im Serum als genereller Malignitätsmarker nützlich sein könnte, durch den Vergleich der Patienten mit malignen Tumoren mit gesunden Personen sowie mit Patienten mit benignen Erkrankungen überprüft. Dann wurde diese Vergleichsuntersuchung innerhalb einzelner Organsysteme angestellt.

Gesunde, benigne und maligne Erkrankungen allgemein

Von gesunden Personen (Median: 24 AU) hoben sich Patienten mit benignen (Median: 146 AU) ebenso wie Patienten mit malignen Erkrankungen (Median: 190 AU) in ihren Nukleosomenwerten deutlich ab. In beiden Fällen wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ erreicht.

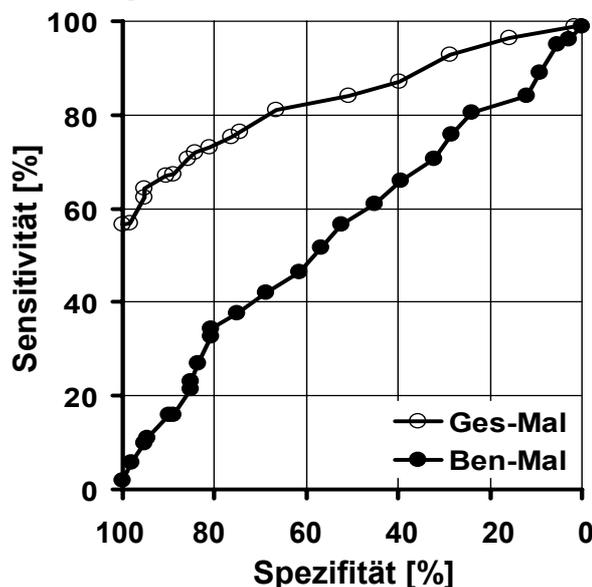
Abbildung 88: Diagnostische Differenzierung der verschiedenen Patientengruppen



Obwohl die Gruppe der Patienten mit malignen Tumoren höhere Werte als die eigentlich differentialdiagnostisch relevante Gruppe der Patienten mit benignen Erkrankungen aufwies, war dieser Unterschied mit $p = 0,072$ nicht statistisch signifikant.

Die ROC-Kurven in der folgenden Abbildung spiegeln die Unterscheidungsfähigkeit zwischen den Tumorpatienten und gesunden Personen (Kurve 1: „Ges-Mal“) und zwischen Tumorpatienten und Patienten mit benignen Erkrankungen wider (Kurve 2: „Ben-Mal“). Während Kurve 1 einen fast idealen Verlauf zeigt, konstatiert Kurve 2 in Form einer nahezu Winkelhalbierenden die fehlende Diskriminierung zwischen Tumorpatienten und der differential-diagnostisch wichtigen Gruppe der Patienten mit benignen Erkrankungen.

Abbildung 89: ROC-Kurve: alle Patienten



Bei einer 95% Spezifität gegenüber Gesunden ergibt sich ein Cutoff-Wert von 98 AU und eine Sensitivität für die Detektion von Tumorpatienten von 64,6%. Bei einer 95% Spezifität gegenüber Patienten mit benignen Erkrankungen errechnet sich ein Cutoff-Wert von 988 AU und eine Sensitivität von lediglich 10,0%.

Tabelle 22: Differentialdiagnostische Charakteristika bei der Gesamtheit der Patienten

Alle Erkrankungen (EK)	Cutoff (CO)	Tu-Pat <CO	Tu-Pat insges	Spez	Sens	Prävalenz	neg präd Wert	pos präd Wert
95% Spez gegen Gesunde	98 AU	148	418	95%	64,6%	30%	86,2%	84,7%
95% Spez gegen Pat mit ben EK	988 AU	376	418	95%	10,0%	30%	71,1%	46,3%

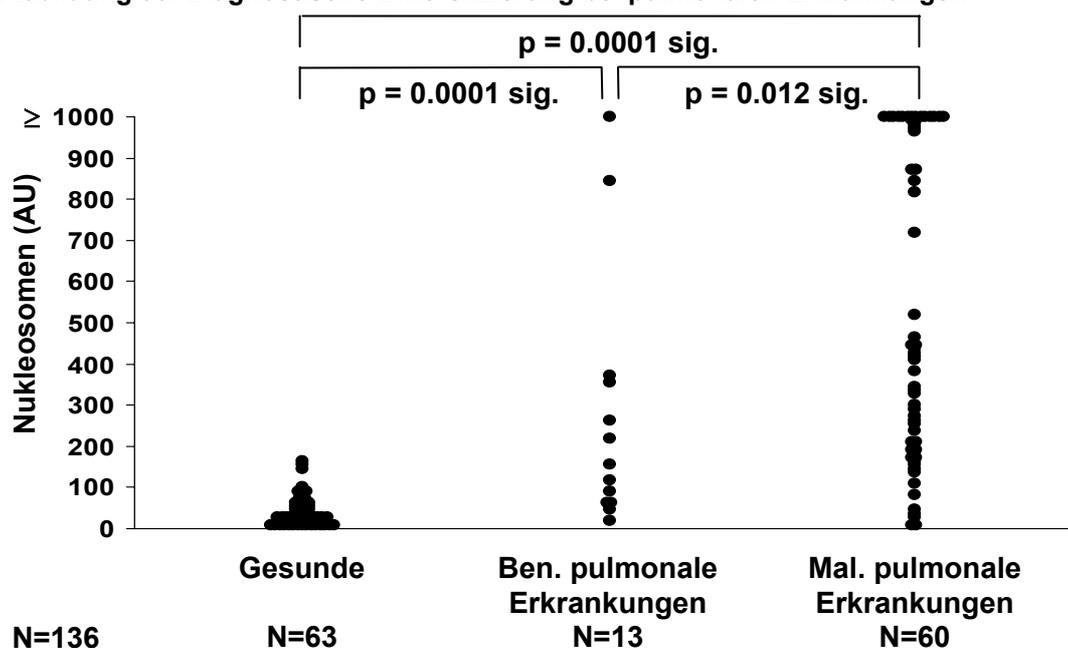
(EK=Erkrankungen, CO=Cutoff, Tu-Pat<CO=Anzahl der Tumorpatienten mit Werten unterhalb des Grenzwerts, Tu-Pat. insges.=Anzahl aller Tumorpatienten, Spez=Spezifität, Sens=Sensitivität, neg präd Wert=negativer prädiktiver Wert, pos präd Wert=positiver prädiktiver Wert)

Die prädiktiven Werte sind aufgrund der unterschiedlichen Prävalenzen der einzelnen Tumorerkrankungen nur unter Vorbehalt zu ermitteln. Bei einer geschätzten durchschnittlichen Prävalenz von Tumorerkrankungen bezüglich aller im Klinikum behandelten Erkrankungen von 30% werden im Vergleich zu Gesunden ein negativer prädiktiver Wert von 86,2% und ein positiver prädiktiver Wert von 84,7% erhalten. Im Vergleich zu Patienten mit benignen Erkrankungen beträgt der negative prädiktive Wert nur 71,1%, der positive prädiktive Wert 46,3%.

Gesunde, benigne und maligne pulmonale Erkrankungen

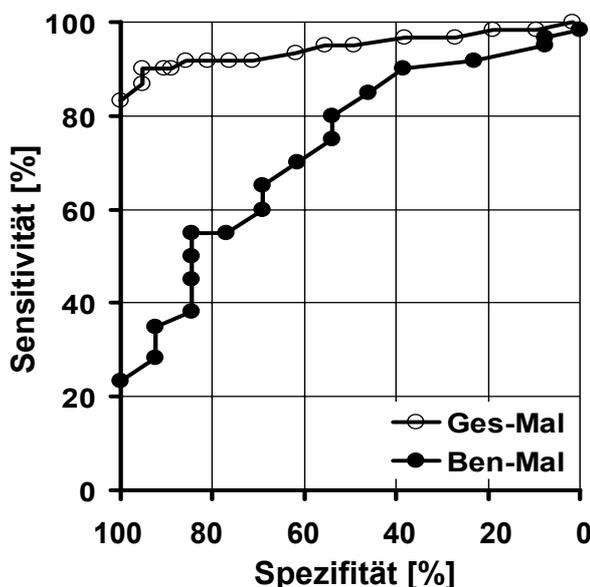
Auch bei organspezifischer Betrachtung zeigt sich die gute Diskriminationsfähigkeit der Nukleosomen im Vergleich zwischen Tumorpatienten und gesunden Personen, während die Unterscheidung zwischen Tumorpatienten und Patienten mit benignen Erkrankungen nicht oder nur eingeschränkt gelingt.

Abbildung 90: Diagnostische Differenzierung bei pulmonalen Erkrankungen



Immerhin waren bei Patienten mit Bronchialkarzinomen sowohl im Vergleich mit gesunden Personen wie auch mit Patienten mit benignen pulmonalen Erkrankungen signifikant höhere Nucleosomenwerte zu beobachten. Die ROC-Kurven sind beim Organsystem „Lunge“ als Ausdruck einer etwas besseren Diskriminationsfähigkeit mehr zur linken oberen Ecke verschoben.

Abbildung 91: ROC-Kurve: pulmonale Erkrankungen



Bei einer Spezifität von 95% gegenüber Gesunden und einem Cutoff von 98 AU erreicht die Sensitivität 91,7%. Bei einer angenommenen Prävalenz von 30% liegt der negative prädiktive Wert bei 96,4%, der positive prädiktive Wert bei 88,7%.

Wird die Spezifität bei 95% gegenüber den Patienten mit benignen pulmonalen Erkrankungen fixiert, sinkt die Sensitivität auf 31,7% bei einem Cutoff von 906 AU. Der negative prädiktive Wert beträgt dann 76,4%, der positive prädiktive Wert 73,1%.

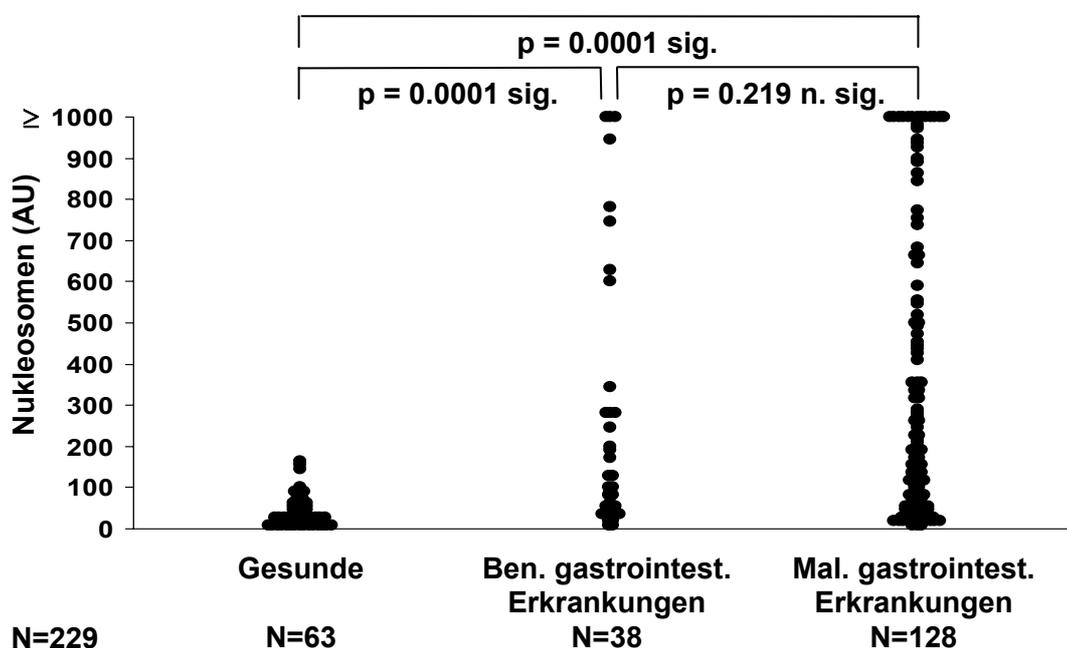
Tabelle 23: Differentialdiagnostische Charakteristika bei pulmonalen Erkrankungen

pulmonale EK	Cutoff (CO)	Tu-Pat <CO	Tu-Pat insges	Spez	Sens	Prävalenz	neg präd Wert	pos präd Wert
95% Spez gegen Gesunde	98 AU	5	60	95%	91,7%	30%	96,4%	88,7%
95% Spez gegen Pat mit ben EK	906 AU	41	60	95%	31,7%	30%	76,4%	73,1%

Gesunde, benigne und maligne gastrointestinale Erkrankungen

Bei Erkrankungen des gastrointestinalen Traktes liegen die Wertlagen der Patienten mit benignen und malignen Erkrankungen enger zusammen. Zwar weisen Tumorpatienten noch deutlich höhere Nukleosomenwerte auf, doch ist der Unterschied zu den Patienten mit benignen gastrointestinalen Erkrankungen nicht signifikant.

Abbildung 92: Diagnostische Differenzierung bei gastrointestinalen Erkrankungen



Auch nähert sich die ROC-Kurve für diese Kollektive der Winkelhalbierenden an als Zeichen für die fehlende Diskriminationsfähigkeit. Bei einer Spezifität von 95% gegenüber Gesunden und einem Cutoff von 98 AU ergibt sich für die Detektion von Tumorpatienten eine

Sensitivität von 61,7%. Wird eine Prävalenz von 30% zugrunde gelegt, beträgt der negative prädiktive Wert 85,3%, der positive prädiktive Wert 84,1%. Bei einer Spezifität von 95% gegenüber den Patienten mit benignen gastrointestinalen Erkrankungen und einem Cutoff von 1022 AU errechnet sich eine Sensitivität von 7,8%. Der negative prädiktive Wert liegt bei 70,6%, der positive prädiktive Wert bei 40,1%.

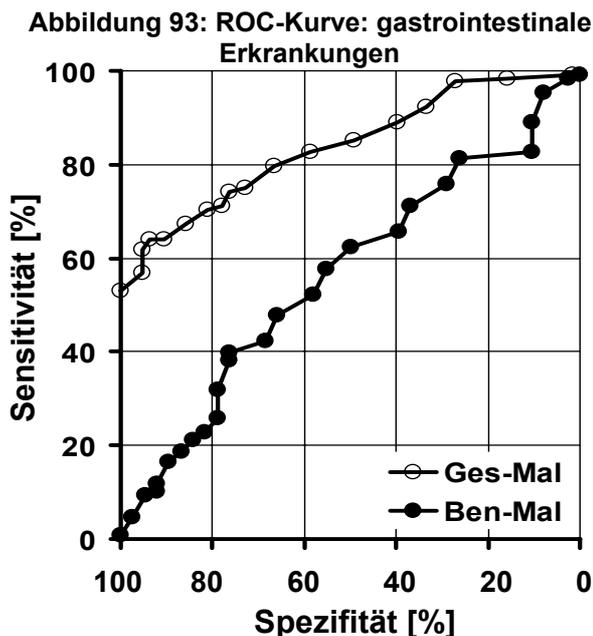


Tabelle 24: Differentialdiagnostische Charakteristika bei gastrointestinalen Erkrankungen

Gastrointestinale EK	Cutoff (CO)	Tu-Pat <CO	Tu-Pat insges	Spez	Sens	Prävalenz	neg präd Wert	pos präd Wert
95% Spez gegen Gesunde	98 AU	49	128	95%	61,7%	30%	85,3%	84,1%
95% Spez gegen Pat mit ben EK	1022 AU	118	128	95%	7,8%	30%	70,6%	40,1%

Gesunde, benigne und maligne gynäkologische Erkrankungen

Sowohl hinsichtlich der Wertverteilungen, Signifikanzberechnungen und der ROC-Kurven zeigt sich ein ähnliches Bild für Erkrankungen der gynäkologischen Organsysteme. Hierzu wurden Erkrankungen der Ovarien, des Uterus, der Cervix und Vulva zusammengefasst.

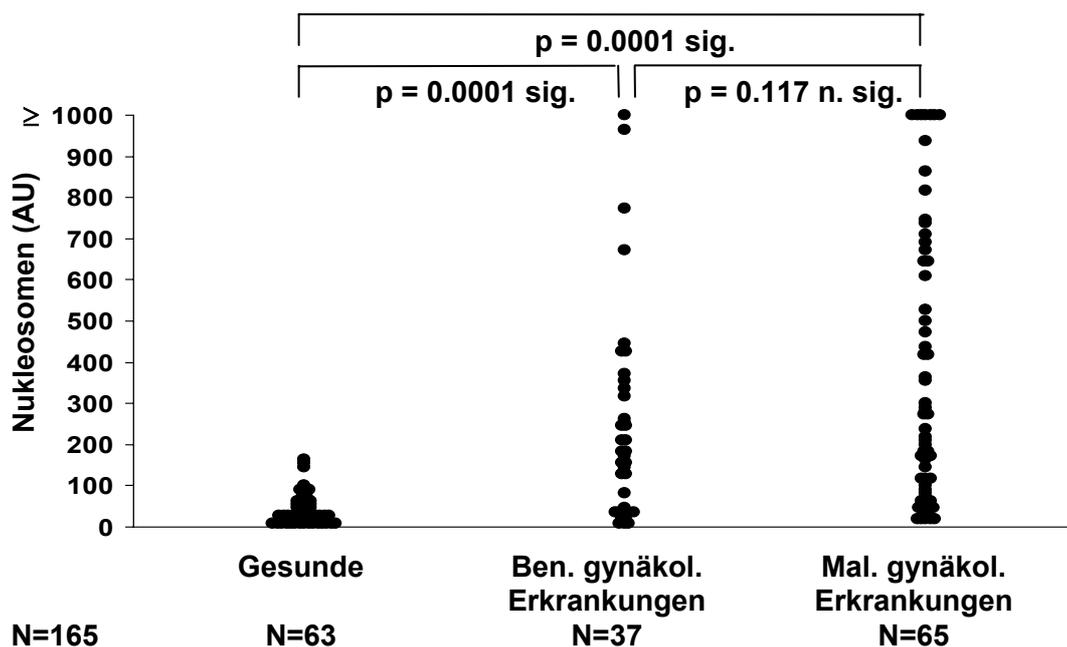


Abbildung 94: Diagnostische Differenzierung bei gynäkologischen Erkrankungen

Bei einer Spezifität von 95% gegenüber Gesunden und einem Cutoff von 98 AU wurde eine Sensitivität von 70,8% erzielt. Ausgehend von einer 30%igen Prävalenz der Tumorerkrankungen ergibt sich ein negativer prädiktiver Wert von 88,3% und ein positiver prädiktiver Wert von 85,8%. Bei 95%iger Spezifität gegenüber den Patienten mit benignen gynäkologischen Erkrankungen, sinkt die Sensitivität bei einem Cutoff von 806 AU auf nur 15,4%. Der negative prädiktive Wert liegt dann bei 72,4%, der positive prädiktive Wert bei 56,9%.

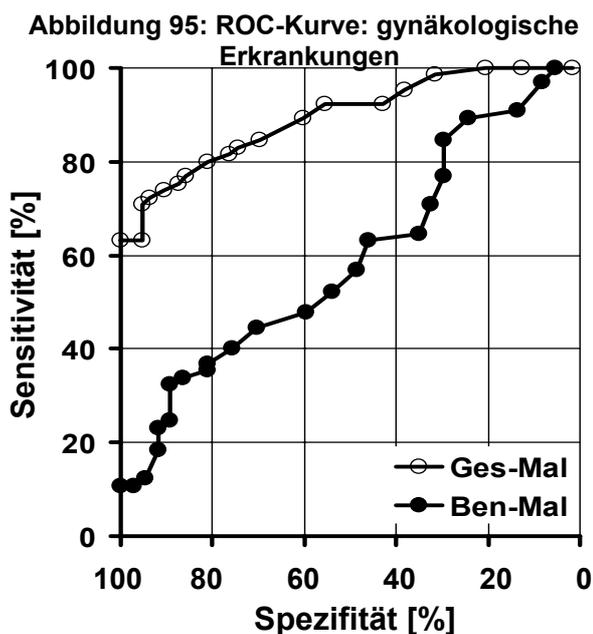
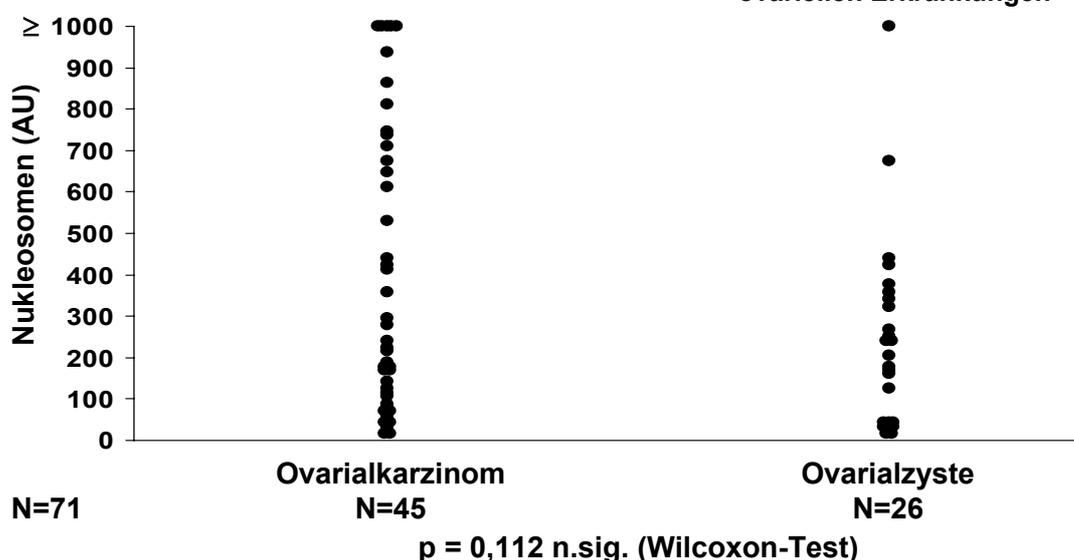


Tabelle 25: Differentialdiagnostische Charakteristika bei gynäkologischen Erkrankungen

Gynäkologische EK	Cutoff (CO)	Tu-Pat <CO	Tu-Pat insges	Spez	Sens	Prävalenz	neg präd Wert	pos präd Wert
95% Spez gegen Gesunde	98 AU	19	65	95%	70,8%	30%	88,3%	85,8%
95% Spez gegen Pat mit ben EK	806 AU	55	65	95%	15,4%	30%	72,4%	56,9%

Bei tumorösen Erkrankungen der Ovarien wäre es wünschenswert, bereits präoperativ zwischen benignen und malignen Prozessen anhand von biochemischen Parametern unterscheiden zu können. Allerdings überlappen sich die Wertlagen der Nukleosomen im Serum bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom und Ovarialzysten deutlich, so dass sich daraus keine diagnostische Aussage ableiten lässt.

Abbildung 96: Diagnostische Differenzierung bei ovariellen Erkrankungen



5.2.3 Abhängigkeit der Nukleosomenwerte von der Tumorlokalisation, Stagingkriterien und weiteren Charakteristika

In der Gruppe der Patienten mit malignen Erkrankungen sind verschiedene Tumortypen vertreten, die sich in ihrer Aktivität, Invasivität, Proliferationsrate, Metastasierungsneigung und im Perfusionsgrad unterscheiden. Darüber hinaus sind die Tumorstadien und der Differenzierungsgrad der Tumorzellen innerhalb der Tumorentitäten sehr variabel.

Um zu überprüfen, ob Subgruppen sich durch einheitliche, deutlich abgrenzbare Nukleosomenwertlagen auszeichnen, wurden die Tumortypen miteinander verglichen sowie die einzelnen Tumorarten nach folgenden Kriterien differenziert:

- Tumorlokalisation
- Tumorstadium
- Tumorgröße (T-Stadium)
- Lymphknotenbefall (N-Stadium)
- Metastasierungsgrad (M-Stadium)
- Differenzierungsgrad der Tumorzellen (G-Stadium)
- Krankheitsstatus (Neuerkrankung / Rezidiv)
- Histologie des Tumors
- Alter und Geschlecht der Patienten

Differenzierung nach Tumorentitäten allgemein

Untereinander zeigten die Tumorarten nur gering variable Werteverteilungs-Muster. Dennoch ergaben sich signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen einigen, die in der folgenden Abbildung durch eine Klammer identifiziert sind.

Insbesondere fielen dabei das Prostata-Karzinoms mit sehr niedrigen und des Bronchial-Karzinoms mit sehr hohen Werten auf, die sich von den meisten der anderen Tumorentitäten unterscheiden.

Abbildung 97: Differenzierung der verschiedenen Tumorentitäten

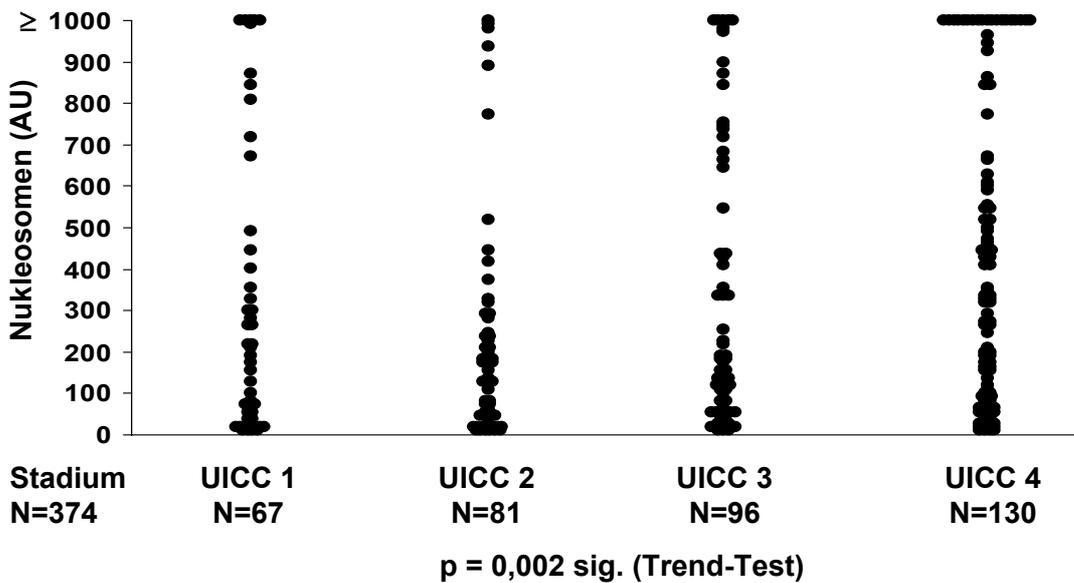
Differenzierung nach dem Tumorstadium

Tumorstadien werden für verschiedene Organsysteme in unterschiedlichen Klassifikationssystemen beschrieben und beinhalten je nach Tumorart unterschiedliche Kriterien hinsichtlich Tumorgröße, Invasivität, Lymphknoten- und Organbefall sowie Metastasierung. Für die Signifikanzberechnungen wurde das für die jeweilige Tumorart relevante Klassifikationssystem verwendet. Zur gemeinsamen Bewertung aller Tumore wurden die Stadieneinteilungen UICC, FIGO, DUKES und ANN ARBOR herangezogen.

Die Differenzierung nach dem Tumorstadium erlaubt Einblicke, ob sich frühe Stadien von späteren durch die Nukleosomenfreisetzung unterscheiden. Da bei fortgeschrittenen Tumoren meist ein höherer Zellumsatz stattfindet, sind bei diesen höhere Nukleosomenkonzentrationen im Serum zu erwarten.

Diese Hypothese traf für die Gesamtheit aller Tumoren sowie für die Untergruppe der gastrointestinalen Tumoren zu. Dabei waren frühe Stadien mit niedrigen Nukleosomenwerten, fortgeschrittene Stadien mit höheren Werten assoziiert. Alle anderen Gruppen wiesen jedoch keine derartigen Unterschiede auf. Bei Bronchialkarzinomen und Mamma-Karzinomen fanden sich sogar häufig in frühen Stadien deutlich erhöhte Wertlagen. Für die signifikanten Unterschiede in der Gruppe aller Tumore ist der hohe Anteil an gastrointestinalen Tumoren verantwortlich. Wurden diese bei den Berechnungen nicht berücksichtigt, stieg das Signifikanzniveau auf $p > 0,05$ an.

Abbildung 98: Werteverteilung in Abhängigkeit vom Tumorstadium



Eine Übersicht der Signifikanzberechnungen ist in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

Tabelle 26: Differenzierung nach dem Tumorstadium

UICC-Stadium	UICC 1		UICC 2		UICC 3		UICC 4		p Trend-Test
	N	Med	N	Med	N	Med	N	Med	
alle Karzinome (KA)	67	171	81	126	96	161	130	299	0,002
Bronchial-KA	7	864	8	258	13	337	26	431	0,298
Gastrointestinale KA	17	73	15	54	46	122	49	407	<0,001
Mamma-KA	21	210	17	168	7	177	12	259	0,754
Gynäkologische KA	16	181	10	119	16	220	14	315	0,172
Lymphome			10	66	9	27	6	180	0,763
Nierenzell-KA			11	109	2	365	6	60	0,588
Prostata-KA	4	<16	9	<16	3	77	1	<16	0,781
sonstige KA	2	118	1	314			16	123	0,527
alle KA ohne GI-KA	50	201	66	132	50	193	81	210	0,133

Differenzierung nach der Tumorgröße (T-Stadium)

Auf die Berechnung des Tumorstadiums nimmt die Tumorgröße starken Einfluss. Dabei bestätigten sich die vorher beschriebenen Ergebnisse der Tumorstadien: Nur die Gruppe der gastrointestinalen Tumore zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen allen T-Stadien, wobei eine geringe Tumorgröße mit niedrigen Nucleosomenwerten, ausgedehnte Tumoren mit hohen Werten einhergingen. Bei allen anderen Tumorentitäten waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Bei Bronchialkarzinomen und Mamma-Karzinomen waren kleine Tumore sogar mit hohen Nucleosomenwerten assoziiert.

Abbildung 99: Werteverteilung in Abhängigkeit von der Tumorgröße

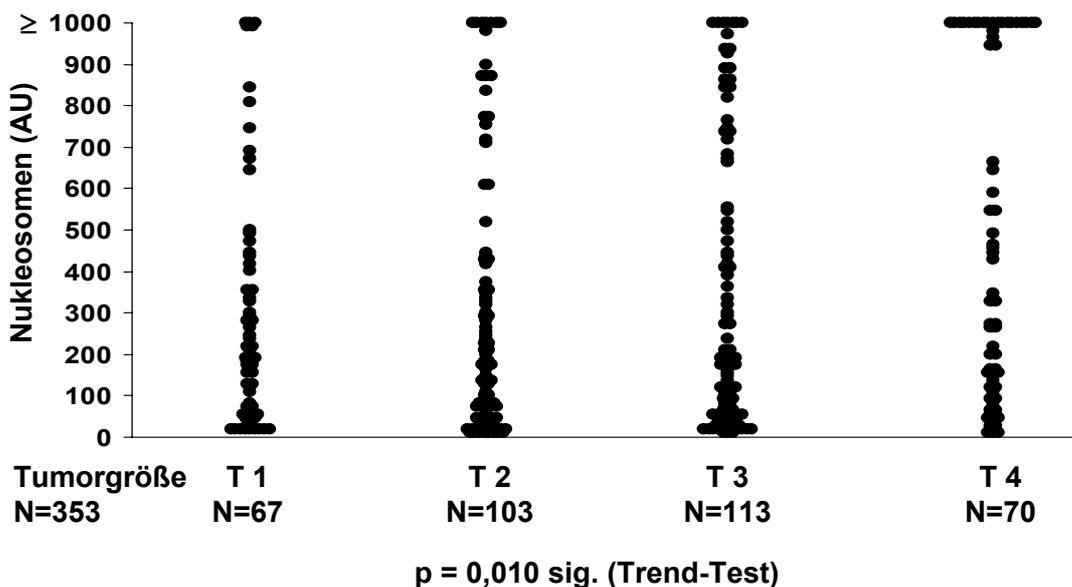


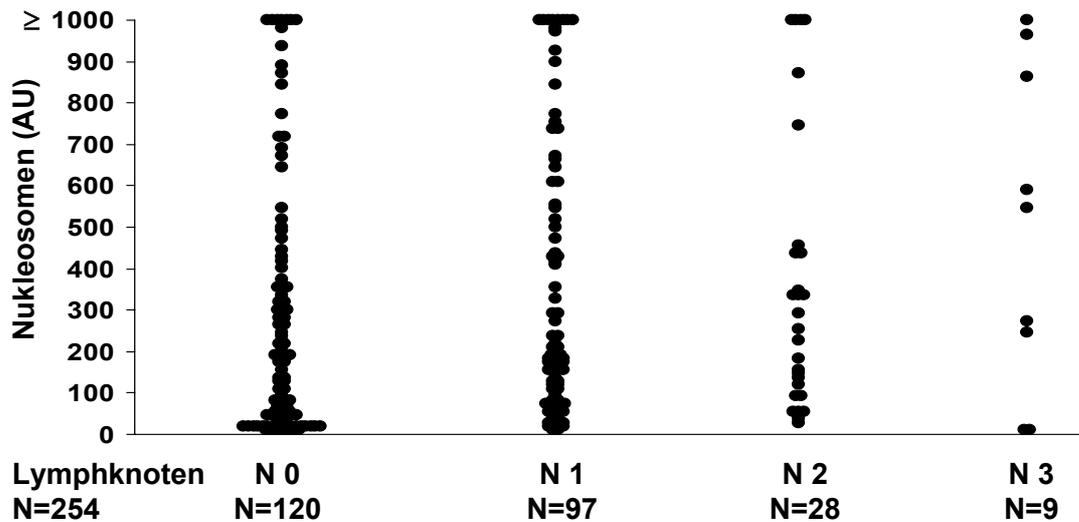
Tabelle 27: Differenzierung nach der Tumorgröße

T-Stadium	T 1		T 2		T 3		T 4		p Trend-Test
	N	Med	N	Med	N	Med	N	Med	
alle Karzinome (KA)	67	185	103	167	113	168	70	332	0,010
Bronchial-KA	5	410	18	376	9	202	21	439	0,699
Gastrointestinale KA	12	70	26	155	60	140	26	536	0,009
Mamma-KA	30	184	16	151	2	85	6	444	0,656
Gynäkologische KA	17	191	11	75	24	251	2	764	0,076
Lymphome			7	42	10	37	7	160	0,914
Nierenzell-KA			12	94	5	46	1	55	0,760
Prostata-KA			9	<16	3	77	1	<16	0,534
sonstige KA	3	217	4	329			6	121	0,134
alle KA ohne GI-KA	55	191	77	167	53	174	44	269	0,134

Differenzierung nach dem Lymphknotenbefall (N-Stadium)

Der Befall der Lymphknoten ist in vielen Fällen ein Vorstadium für einen Metastasierungsprozess und kennzeichnet den Übergang vom lokalen Tumorwachstum zur systemischen Tumorerkrankung. Mit zunehmendem Grad des Lymphknotenbefalls ergab sich allerdings weder für die Gesamtheit aller Tumoren noch für einzelne Untergruppen ein signifikanter Unterschied im Trend-Test.

Abbildung 100: Werteverteilung in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall



$p = 0,062$ n.sig. (Trend-Test)

Tabelle 28: Differenzierung nach dem Lymphknotenstadium

N-Stadium	N 0		N 1		N 2		N 3		p Trend-Test
	N	Med	N	Med	N	Med	N	Med	
alle Karzinome (KA)	120	167	97	178	28	267	9	541	0,062
Bronchial-KA	10	791	10	258	8	333	4	614	0,544
Gastrointestinale KA	29	73	53	187	16	177	3	588	0,329
Mamma-KA	28	184	21	128	3	346	1	541	0,148
Gynäkologische KA	21	278	10	308					0,729
Nierenzell-KA	15	46							
Prostata-KA	10	30	2	<16					0,420
sonstige KA	7	217	1	604	1	151	1	240	0,752
alle KA ohne GI-KA	91	174	44	176	12	333	6	404	0,069

Differenzierung nach dem Metastasierungsgrad (M-Stadium)

Das Vorhandensein von Metastasen signalisiert die Generalisierung einer Tumorerkrankung und ist häufig mit dem Verlust der Operabilität verbunden. Da der Prozess der Fernmetastasierung den Anschluss des Tumors an das Blut- oder Lymphgefäßsystem voraussetzt, kann in diesen Fällen ein höheres Nukleosomenvorkommen im Serum vermutet werden.

Tatsächlich war ein signifikanter Unterschied zwischen nicht metastasierten Tumoren (M0) mit niedrigen Nuklesomenwerten und bereits metastasierten Tumoren (M1) mit erhöhten Werten bei der Gruppe der gastrointestinalen Tumoren vorhanden. Bei den anderen Tumorentitäten wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt.

Abbildung 101: Werteverteilung in Abhängigkeit vom Metastasierungsgrad

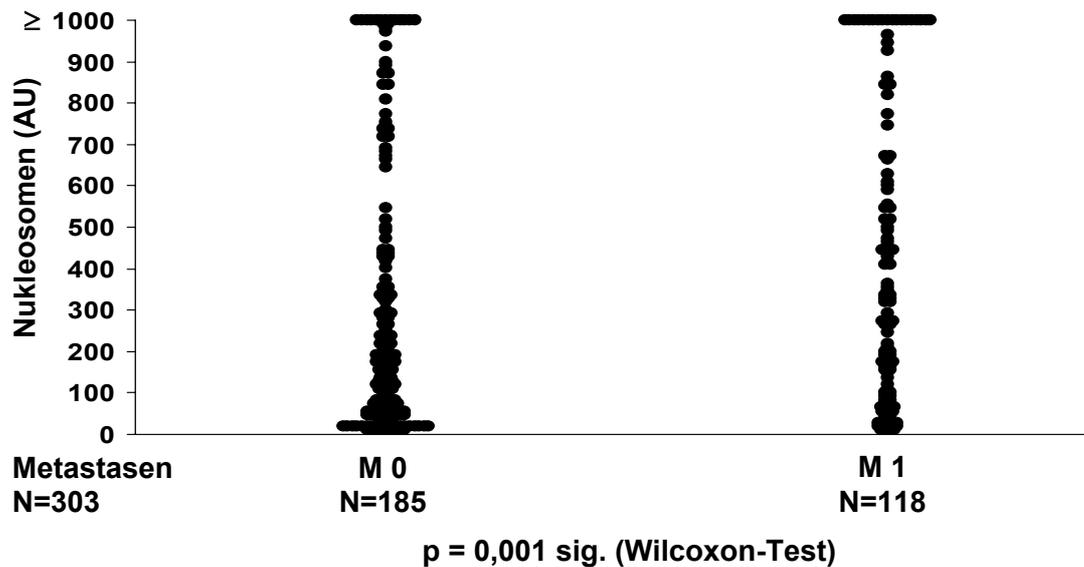


Tabelle 29: Differenzierung nach dem Metastasierungsstadium

M-Stadium	M 0		M 1		p Wilcoxon-Test
	N	Med	N	Med	
alle Karzinome (KA)	185	167	118	320	0,001
Bronchial-KA	24	374	26	431	0,805
Gastrointestinale KA	69	105	48	380	<0,001
Mamma-KA	45	176	13	259	0,925
Gynäkologische KA	21	191	13	272	0,531
Nierenzell-KA	11	109	5	64	0,541
Prostata-KA	8	<16	1	<16	0,532
sonstige KA	7	217	12	123	0,547
alle KA ohne GI-KA	116	187	70	250	0,405

Um die Auswirkung großer Karzinome ohne Fernabsiedlungen auf die Nucleosomenkonzentration im Serum im Vergleich zu kleinen, aber früh metastasierenden Karzinomen zu untersuchen, wurde in einem weiteren Schritt eine multivariate Analyse von Tumorgröße und Metastasierungsgrad bei Patienten mit gastrointestinalen Karzinomen vorgenommen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Fernmetastasen größeren Einfluss auf die Nucleosomenwerte im Serum hat ($p=0,0008$) als das Tumolvolumen ($p=0,696$).

Differenzierung nach dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen (G-Stadium)

Der Verlust der Zelldifferenzierung ist ein wesentliches Charakteristikum von Tumoren, welches oft Rückschlüsse auf ihre Aggressivität und Wachstumsgeschwindigkeit erlaubt. Da bei aggressiven, schnell progredienten Tumoren häufig ein gesteigerter Zellumsatz zu beobachten ist, könnte bei diesen eine deutliche Erhöhung der Nukleosomenmenge im Blut vermutet werden. Allerdings zeigten sich keine Unterschiede der Nukleosomenwerte für alle untersuchten Tumorarten, auch nicht für gastrointestinale Tumore.

Abbildung 102: Werteverteilung in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der Tumorzellen

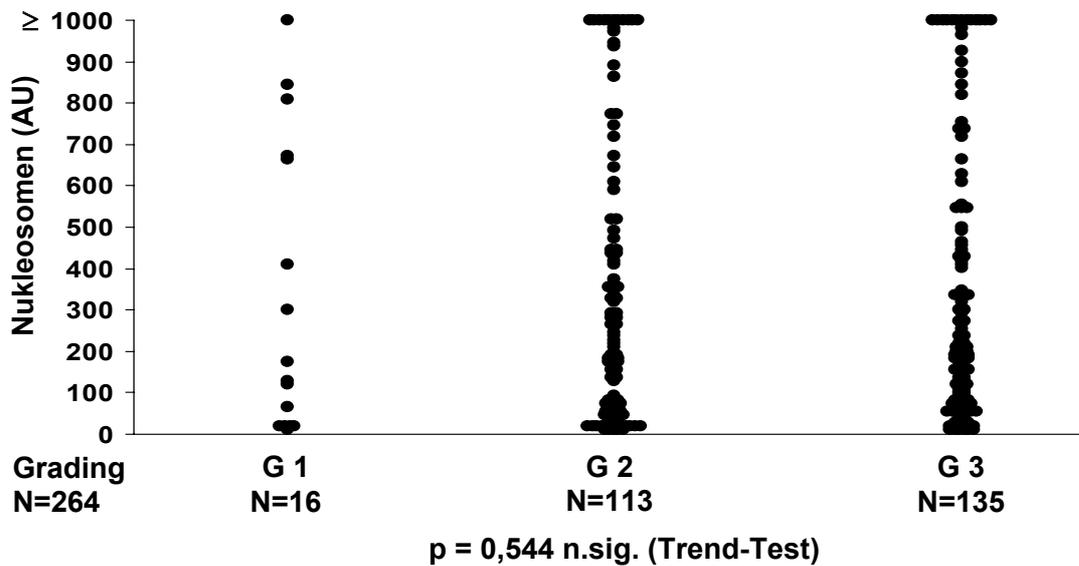


Tabelle 30: Differenzierung nach dem G-Stadium

G-Stadium	G 1		G 2		G 3		p Trend-Test
	N	Med	N	Med	N	Med	
Alle Karzinome (KA)	16	147	113	202	135	189	0,544
Bronchial-KA			10	347	22	415	0,427
Gastrointestinale KA	3	115	51	276	54	174	0,640
Mamma-KA	6	404	21	177	24	178	0,099
Gynäkologische KA	2	529	11	174	18	193	0,904
Nierenzell-KA	1	64	13	78	3	17	0,939
Prostata-KA	2	92	5	<16	4	<16	0,342
Sonstige KA	2	345	2	514	10	173	0,940
Alle KA ohne GI-KA	13	167	62	174	81	197	0,657

Differenzierung nach dem Krankheitsstatus

Hinsichtlich des Krankheitsstatus⁴ wurden in der vorliegenden Untersuchung nur Patienten mit aktiven Krankheitsstadien berücksichtigt, also Personen, bei denen eine Neuerkrankung oder ein Rezidiv eines schon früher aufgetretenen Tumors festgestellt wurde. Oft zeichnen sich rezidivierende Tumorerkrankungen durch eine höhere Aggressivität aus, die dadurch bedingt sein kann, dass das Immunsystem durch die schon verabreichten, belastenden Therapien schon vorgeschädigt ist. Tatsächlich wurde jedoch kein signifikanter Unterschied der Nukleosomenwerte für alle untersuchten Tumorentitäten einschließlich deren Gesamtheit beobachtet.

Abbildung 103: Werteverteilung in Abhängigkeit vom Krankheitsstatus

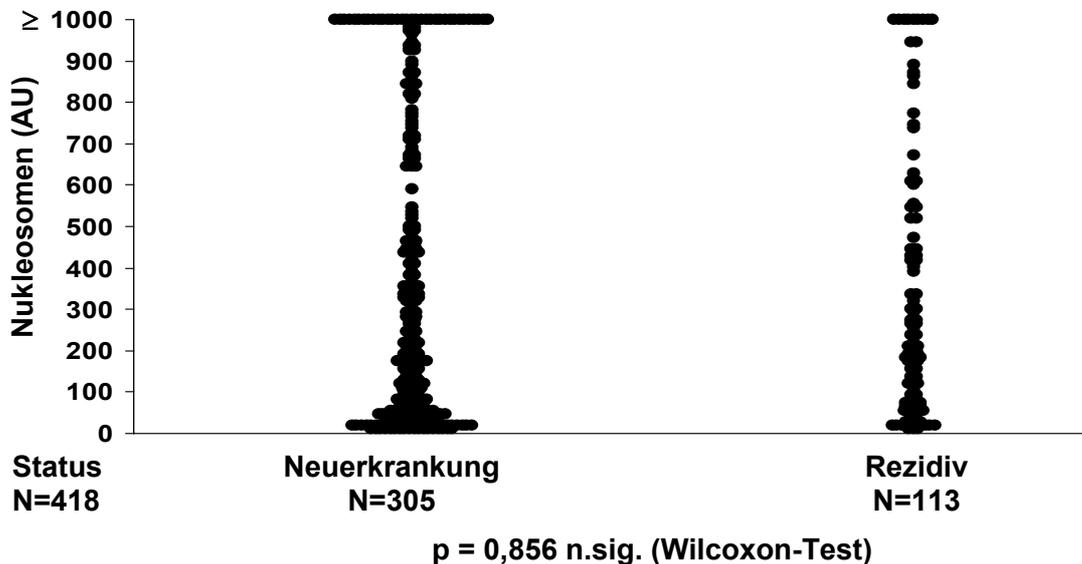


Tabelle 31: Differenzierung nach dem Krankheitsstatus

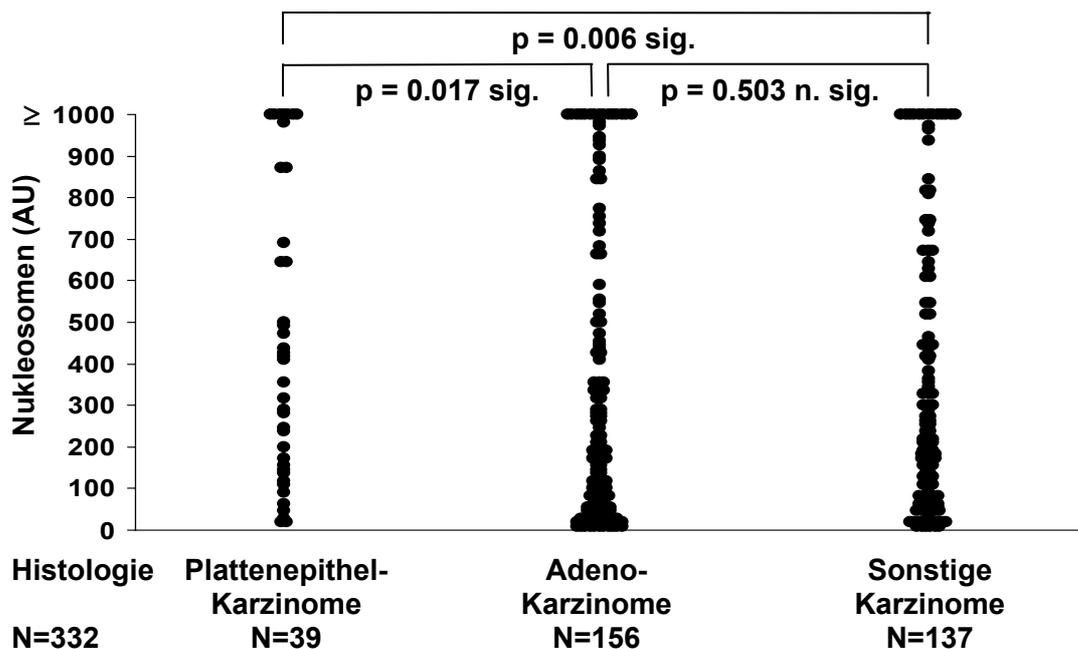
Status	Neuerkrankung		Rezidiv		p Wilcoxon-Test
	N	Med	N	Med	
alle Karzinome (KA)	305	189	113	197	0,856
Bronchial-KA	44	448	16	316	0,800
Gastrointestinale KA	103	187	25	151	0,868
Mamma-KA	32	194	29	185	0,925
Gynäkologische KA	41	286	24	193	0,153
Lymphome	32	208	8	25	0,083
Nierenzell-KA	18	51	2	532	0,039
Prostata-KA	17	<16			
sonstige KA	18	173	9	73	0,803
Alle KA ohne GI-KA	202	198	88	198	0,802

Differenzierung nach der Histologie

Die histologische Klassifizierung eines Tumors entscheidet häufig über die Wahl der Therapieform und hat oft hohe prognostische Aussagekraft. Bei einigen histologischen Subtypen, wie dem kleinzelligen Bronchialkarzinom, wird oft eine hohe Proliferationsrate und Aggressivität beobachtet; andere – etwa das klarzellige Nierenzell-Karzinom – wachsen meist langsamer, sind jedoch therapieresistenter. Die Freisetzung von Nukleosomen könnte in diesem Kontext Rückschlüsse über die Zelltodrate und den zellulären Umsatz ermöglichen.

Wir unterschieden zwischen Plattenepithelkarzinomen, Adenokarzinomen und anderen Karzinomen als den am häufigsten auftretenden histologischen Subtypen bei den untersuchten Patienten. Dabei fielen Plattenepithelkarzinome mit signifikant höheren Werten auf.

Abbildung 104: Werteverteilung in Abhängigkeit von der Histologie



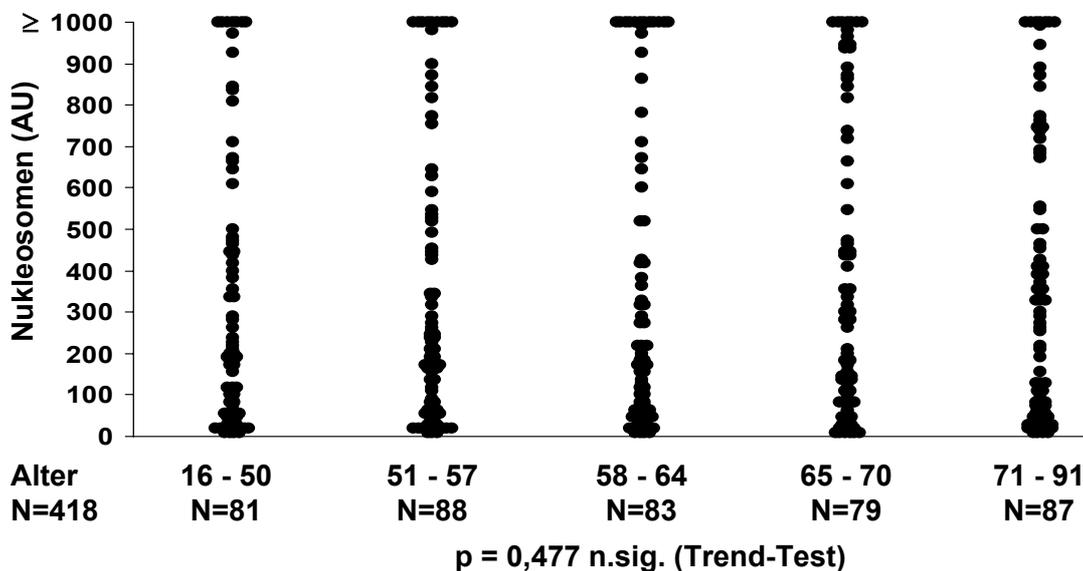
In einem weiteren Schritt wurden die Untersuchungen auf diejenigen Tumortypen fokussiert, bei denen alle drei histologischen Untergruppen in relevanter Anzahl vertreten waren: Bronchial-, gastrointestinale, gynäkologische und sonstige Karzinome. Hierbei hoben sich wiederum Plattenepithelkarzinome im besonderen von den anderen Karzinomen ab. Wurde zusätzlich allerdings auch die Tumorlokalisierung berücksichtigt, verschwand dieser Unterschied wieder. Somit konnte anhand der Nucleosomenwerte keiner der untersuchten, histologischen Subtypen identifiziert werden.

Differenzierung nach Alter und Geschlecht der Patienten

Mit zunehmendem Lebensalter steigt das Risiko für die Entstehung verschiedenster Tumorerkrankungen. Somit ist das Alter ein wichtiger Morbiditätsfaktor und bei einigen Tumortypen sogar von prognostischer Bedeutung. Die Rolle des Zelltodes im Alter ist allerdings noch nicht geklärt: Der generell sinkenden Fähigkeit zur Zellregeneration und dem zurückgehenden Zellumsatz steht ein relativ gesteigerter Zellabbau gegenüber. Zunehmende Morbidität ist mit einem schwächer werdenden Immunsystem konfrontiert.

Obwohl die Differenzierung nach dem Alter bei der Gruppe der gesunden Personen und der Patienten mit benignen Erkrankungen keine Unterschiede hinsichtlich der Nukleosomenwerte ergab, wurde eine nochmalige Untersuchung bei Patienten mit malignen Erkrankungen angestellt; denn aufgrund des höheren Lebensalters vieler Tumorpatienten verschoben sich die Quintilen im Vergleich zu den vorher untersuchten Gruppen. Allerdings konnten auch hier keine signifikant unterschiedlichen Wertlagen der Nukleosomen identifiziert werden. Dieser fehlende Einfluss des Alters auf die Nukleosomenwerte bestätigte sich auch bei differenzierter Betrachtung einzelner Tumorerkrankungen.

Abbildung 105: Werteverteilung in Abhängigkeit vom Alter der Patienten



Als weiterer bedeutsamer Prognosefaktor gilt bei einigen Tumorarten das Geschlecht der Patienten. Hinsichtlich der Nukleosomenwerte fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen Patientinnen und Patienten mit malignen Erkrankungen.

Tabelle 32: Werteverteilung in Abhängigkeit von Geschlecht und Alter

Patienten mit malignen EK	Gesamt	Geschlecht		Alter (Quintile)				
		W	M	16-50	51-57	58-64	65-70	71-91
Anzahl	418	217	201	81	88	83	79	87
Median (AU)	190	197	171	183	193	178	206	249
Mittelwert (AU)	350	340	361	320	332	370	378	351
Bandbreite	<16-1812	<16-1431	<16-1812	<16-1260	<16-1177	<16-1812	<16-1361	<16-1424
p-Wert		p = 0,562		p = 0,477				

5.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Querschnittsuntersuchungen

Bei den Untersuchungen zur spontanen Nukleosomenkonzentration im Serum von gesunden Personen und Patienten mit verschiedenen Erkrankungen im aktiven Stadium wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Während gesunde Personen nur geringe Nukleosomenwerte aufwiesen, war bei Patienten mit benignen Erkrankungen ein breites Spektrum an Wertlagen zu beobachten. Bei Patienten mit akut entzündlichen Erkrankungen korrelierte die Nukleosomenmenge mit der Konzentration des C-reaktiven Proteins, einem Marker für den Schweregrad der Erkrankung.

Eine ähnliche Bandbreite an Nukleosomenwerten fand sich auch bei Patienten mit malignen Tumoren. Dabei fielen Bronchialkarzinome durch sehr hohe Werte, Prostatakarzinome durch sehr niedrige Werte im Bereich von gesunden Personen auf.

2. Gegenüber Gesunden ließen sich sowohl die Gruppen der Patienten mit benignen Erkrankungen wie auch der Patienten mit malignen Tumoren signifikant abgrenzen. Dies galt für die Gesamtheit der Erkrankungen wie auch für die organspezifische Unterteilung in pulmonale, gastrointestinale und gynäkologische Erkrankungen.

Allerdings konnten die Patienten mit malignen Tumoren nicht signifikant von der für sie eigentlich relevanten Kontrollgruppe der Patienten mit benignen Erkrankungen unterschieden werden. Eine Ausnahme bildete die Subgruppe der pulmonalen Erkrankungen, bei denen allerdings einschränkend auf die geringere Zahl an Patienten mit benignen Erkrankungen hinzuweisen ist.

3. Innerhalb der Patienten mit malignen Tumoren wurden signifikante Unterschiede hinsichtlich des Tumorstadiums, der Tumorgröße (T-Stadium) und des Metastasierungsgrades (M-Stadium) nur bei der Untergruppe der gastrointestinalen Tumoren im Sinne von ansteigenden Nukleosomenwerten bei zunehmender Progredienz der Tumorerkrankung beobachtet.

Bei anderen Tumorentitäten war eine derartige Korrelation mit dem Tumorstadium nicht festzustellen. Bei Bronchial- und Mammakarzinomen waren die Nukleosomenkonzentrationen im Gegenteil häufig schon in frühen Stadien deutlich erhöht.

Hinsichtlich des Lymphknotenstatus‘ (N-Stadium), des Differenzierungsgrades der Tumorzellen (G-Stadium), des histologischen Subtyps, des Krankheitsstatus‘, des Alters und Geschlechts der Patienten konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Nukleosomenwerte identifiziert werden.

4. Obwohl beim Vergleich zwischen verschiedenen Personengruppen sowie innerhalb der Tumorpatienten zwischen verschiedenen Krankheitsstadien rechnerisch teilweise signifikante Unterschiede beobachtet wurden, fallen in den Darstellungen der Werteverteilungen große Überlappungen der Einzelwerte auf. Somit ist im Einzelfall eine diagnostische oder differentialdiagnostische Einordnung aufgrund der Nukleosomenwerte als unzuverlässig einzustufen. Ebenso ist keine zuverlässige Einteilung bei Staging-Untersuchungen von Tumorpatienten möglich.

5.3 Klinische Evaluierung anhand von Longitudinaluntersuchungen

5.3.1 Kinetik der Nukleosomenkonzentration im Serum

Nachdem die einzeitige, prätherapeutische Bestimmung der Nukleosomenkonzentration im Serum als Querschnittsuntersuchung durch verschiedene Personengruppen keine präzisen Rückschlüsse auf den Malignitätsgrad einer Erkrankung sowie auf die Klassifikation einer Tumorerkrankung zuließ, blieb die Option zu überprüfen, ob in Longitudinaluntersuchungen Veränderungen der Nukleosomenwerte bei individuellen Personen verwertbare Informationen über den spontanen Krankheitsverlauf oder den Verlauf unter Therapie liefern.

Für dieses Vorhaben wurden bei folgenden Personengruppen wiederholt Nukleosomenbestimmungen in unterschiedlichen zeitlichen Abständen und über variierende Zeiträume durchgeführt:

Tabelle 33: Personengruppen mit Verlaufsbestimmungen der Nukleosomen

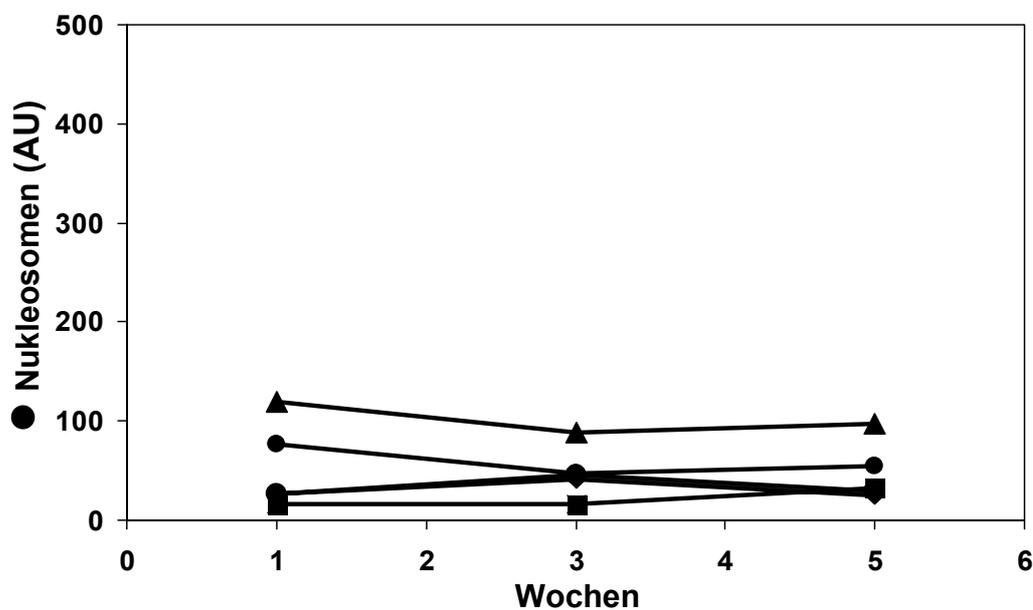
Probanden	N
Gesunde Personen	5
Patienten mit akuten Infekten während antibiotischer Therapie	11
Patienten mit malignen Tumoren vor und nach operativer Therapie	18
Patienten mit malignen Tumoren während Chemotherapie	62
Patienten mit malignen Tumoren während Radiotherapie	16
insgesamt	112

5.3.2 Kinetik der Nukleosomen im Serum bei gesunden Personen

Die Stabilität der Nukleosomenkonzentration im Serum bei gesunden Personen ist die Voraussetzung, um aufgrund eventueller Veränderungen bei Personen mit benignen oder malignen Erkrankungen Aussagen über den Krankheits- oder Therapieverlauf treffen zu können.

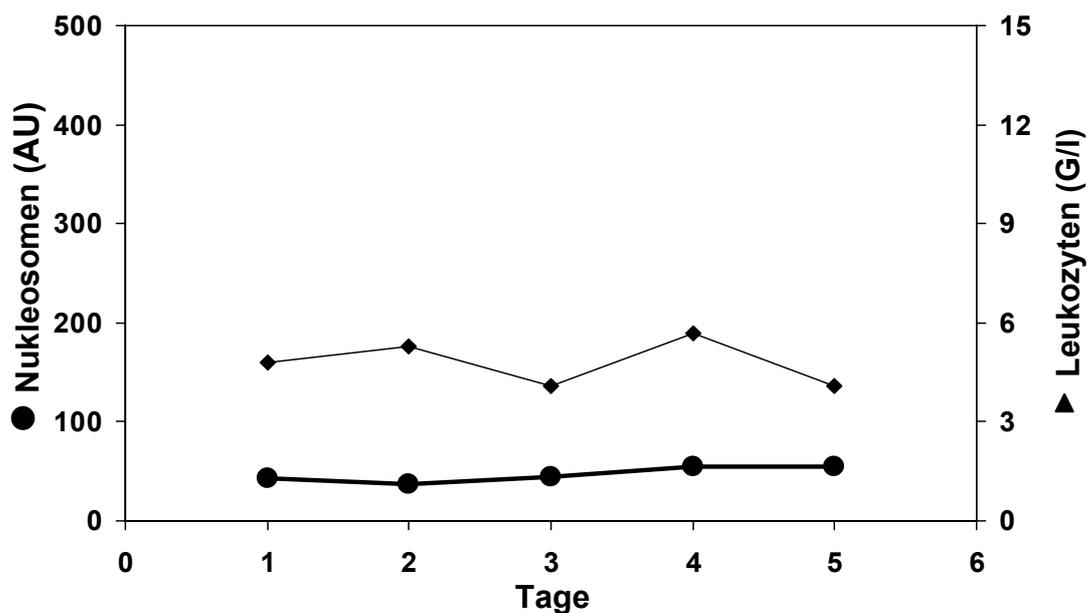
Bei fünf gesunden Probanden wurde in mehrwöchentlichem Abstand die Nukleosomenkonzentration im Serum bestimmt. Dabei wurden jeweils relativ konstante Nukleosomenmengen erhalten.

Abbildung 106: Nukleosomenverläufe bei gesunden Personen über mehrere Wochen



Auch bei Blutabnahmen im täglichen Rhythmus wurden bei einem Probanden nur geringe Schwankungen beobachtet. Hierbei wurden die Nukleosomenwerte auch mit der Leukozytenkonzentration korreliert.

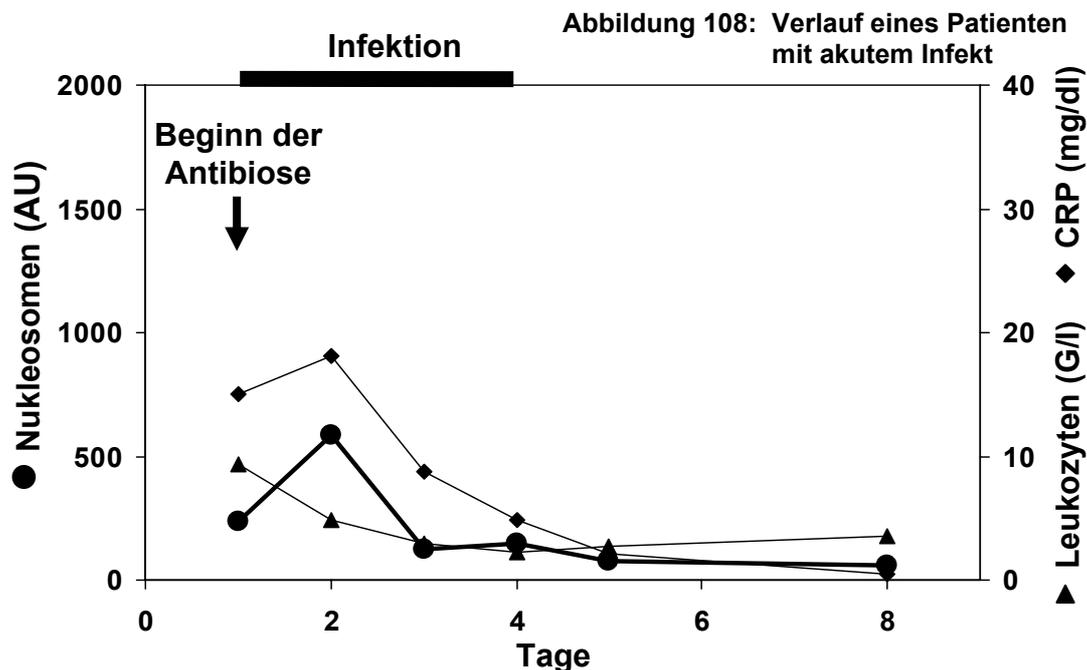
Abbildung 107: Tägliche Nukleosomenbestimmungen bei einem Probanden



5.3.3 Kinetik der Nukleosomen im Serum bei Patienten mit akuten Infekten während antibiotischer Therapie

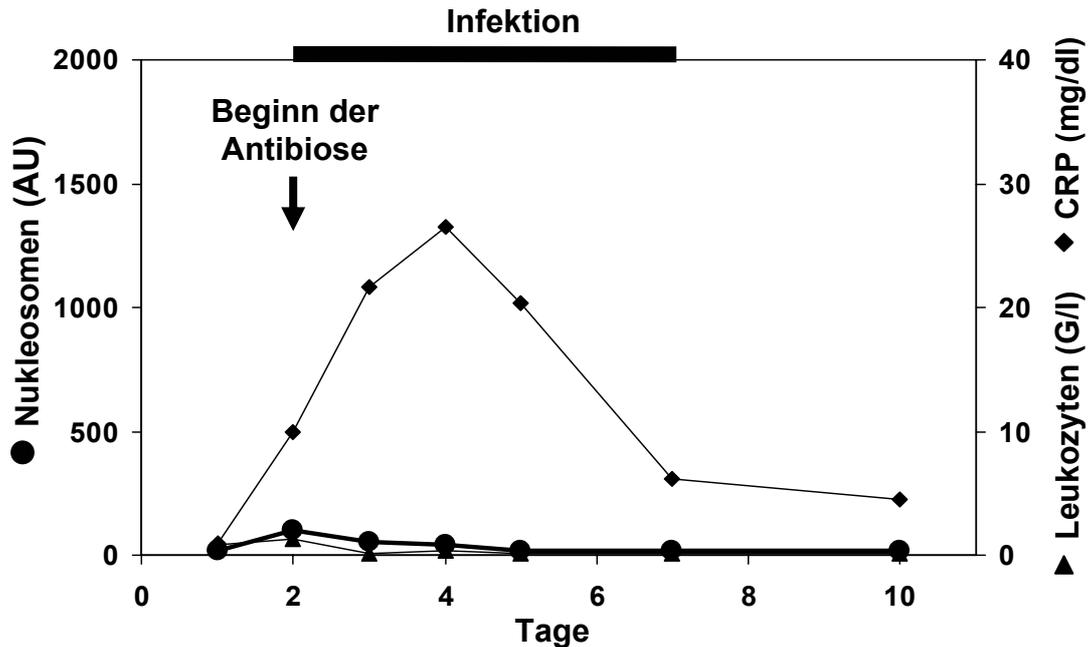
Bei entzündlichen Erkrankungen ist die Akutphase durch die Schädigung menschlicher Körperzellen durch Bakterien, Parasiten, Viren oder andere Stimuli, durch die Aktivierung des Immunsystems und die Bekämpfung dieser infektiösen Agenzien gekennzeichnet. Dabei kommt es zu einer gesteigerten Produktion von Immunzellen, ebenso zu einer erhöhten Zelltodrate, die sich vermutlich in einer enormen Freisetzung von Nukleosomen in die Blutbahn manifestiert.

Bei Verlaufsuntersuchungen in Seren von Patienten mit bakteriell entzündlichen Erkrankungen wurden in der akuten Phase in vielen Fällen tatsächlich große Mengen an Nukleosomen detektiert. Während antibiotischer Behandlung nahmen diese graduell wieder ab und näherten sich mit zunehmender klinischer Besserung des Allgemeinzustands des Patienten dem Bereich von gesunden Personen an. Häufig korrelierten die Nukleosomenwerte mit den CRP-Werten und wiesen einen weitgehend parallelen Verlauf zu diesen auf.



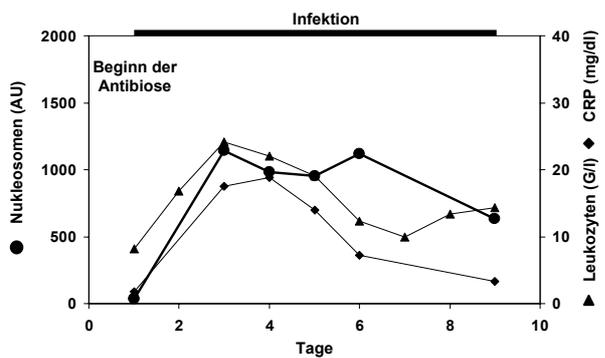
In wenigen Fällen stiegen die Nukleosomenwerte erst verzögert zu den CRP-Werten an oder zeigten vereinzelt gar antizyklische Verläufe. Bei einem Patienten mit einem Infekt nach Knochenmarkstransplantation und gleichzeitiger Panzytopenie wurde im Gegensatz zum CRP überhaupt kein Anstieg der Nukleosomen beobachtet, wie folgende Abbildung zeigt. Dies könnte möglicherweise auf die geminderte Aktivierungsfähigkeit des Immunsystems zurückzuführen sein.

Abbildung 109: Verlauf eines Patienten mit akutem Infekt und Panzytopenie

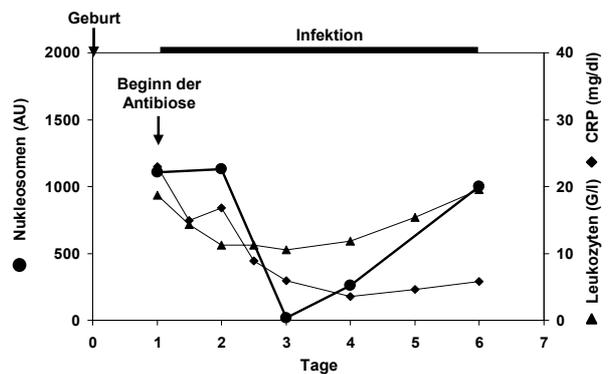


Im Vergleich zu den Leukozytenwerten bewegten sich die Nucleosomen ebenfalls oft gleichsinnig; lediglich in einigen ausgewählten Fällen waren Diskrepanzen auszumachen. Im Folgenden sind die Verläufe der Nucleosomenkonzentration im Serum mit der entsprechenden CRP- und Leukozyten-Kinetik dokumentiert:

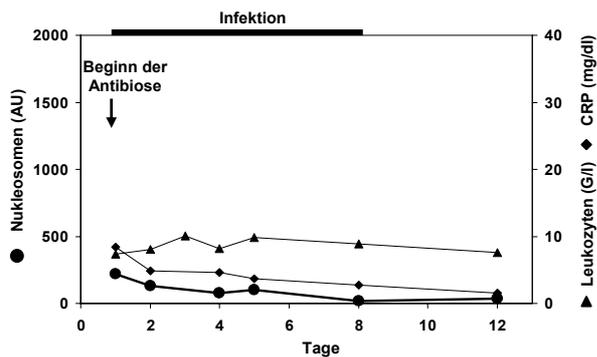
Pat. 1, M.B. 52 J. Dilatative Kardiomyopathie
Infekt nach Herztransplantation 08/96



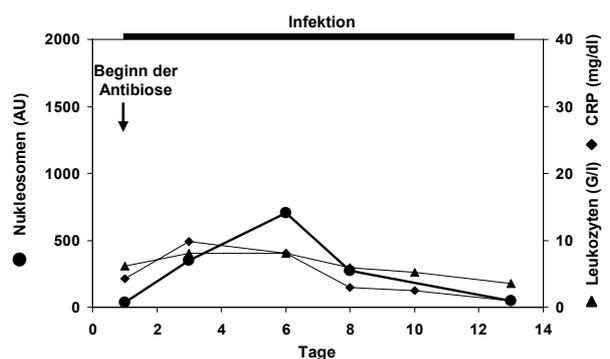
Pat. 2, T.K. 32 J. Post-Partal Schock
Infektiöse Komplikation 08/96



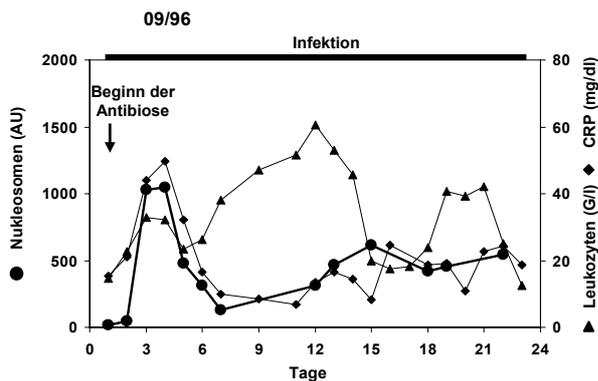
Pat. 3, P.P. 65 J. Endokarditis 08/96



Pat. 4, M.S. 47 J. Pankreatitis 09/96

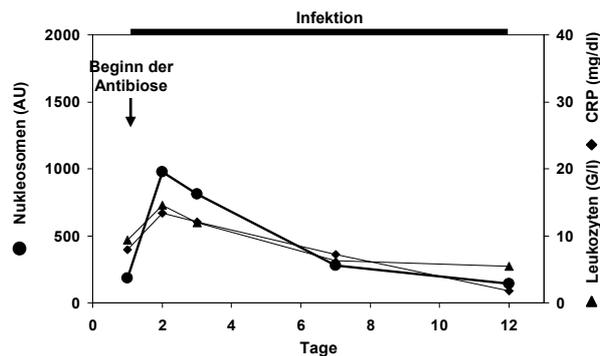


Pat. 5, C.W. 54 J. Nekrotisierende Pankreatitis



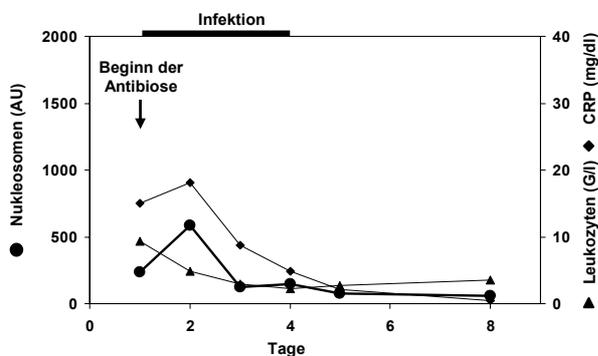
Pat. 6, A.W. 90 J. Cholelithiasis

09/96



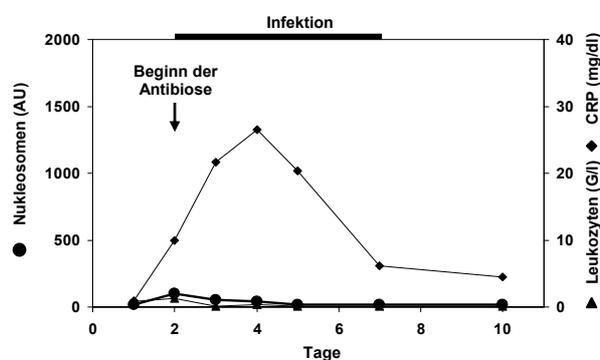
Pat. 7, S.F. 28 J. Cholangitis

10/96



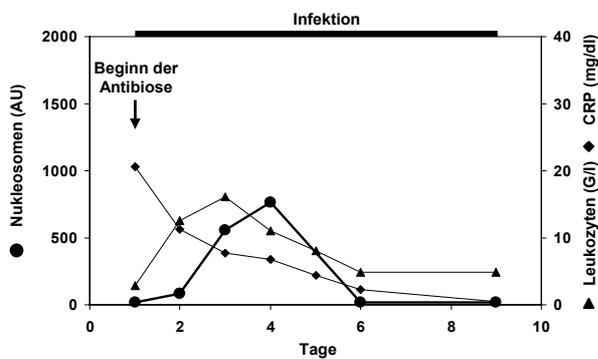
Pat. 8, E.G. 39 J. CML Infektiöse Komplikation nach Knochenmarkstransplantation

10/96



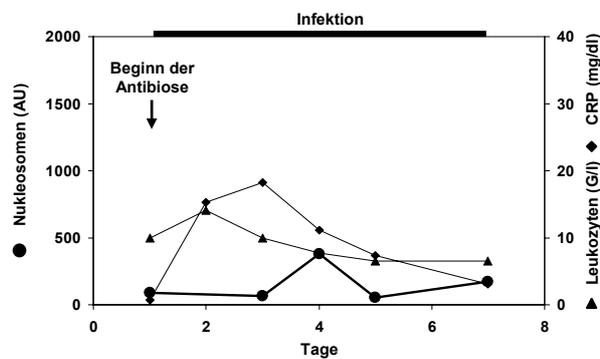
Pat. 9, A.S. 41 J. Divertikulitis

10/96



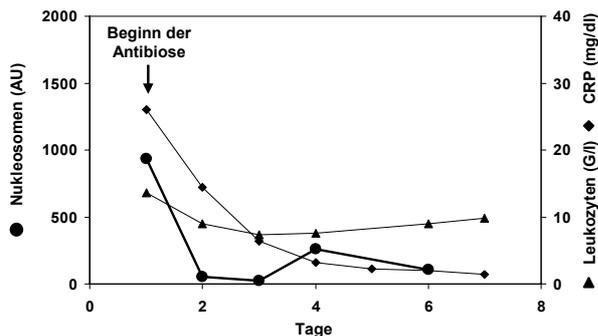
Pat. 10, K.T. 46 J. Akute Pankreatitis

10/96



Pat. 11, C.T. 40 J. Abszeß

11/96



Abbildungen 110-120: Verläufe bei Patienten mit akuten Infekten während antibiotischer Therapie

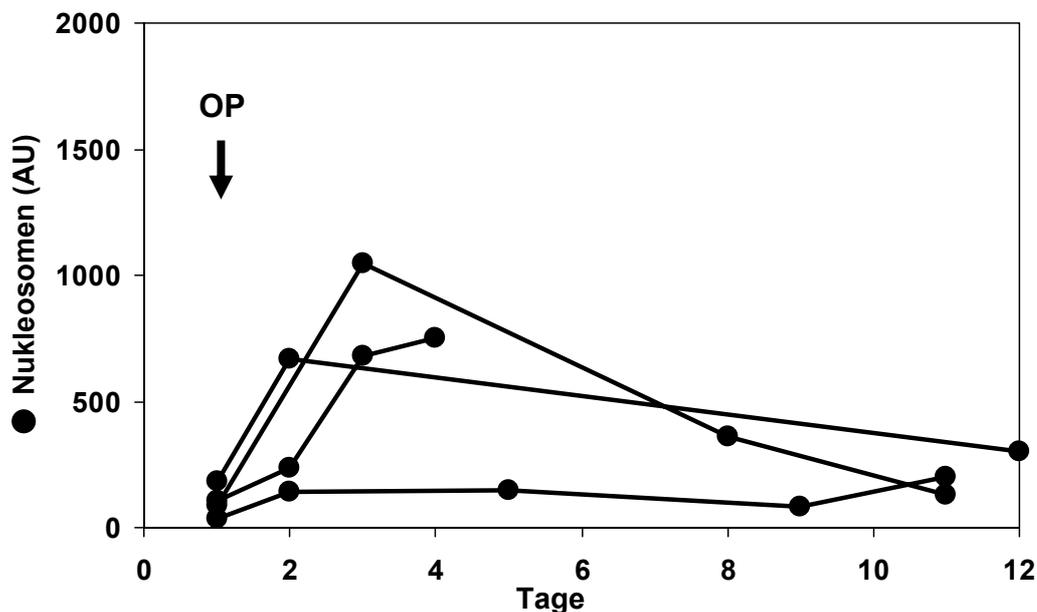
5.3.4 Kinetik der Nukleosomen im Serum bei Patienten mit malignen Tumoren vor und nach operativer Therapie

Viele lokalisiert wachsenden soliden Tumore können operativ entfernt und die Tumorerkrankung somit kurativ behandelt werden, sofern sich noch keine Metastasen abgesiedelt haben. Damit werden bei diesen Patienten die Herde des gesteigerten Zellumsatzes und der Nukleosomenfreisetzung beseitigt, wodurch sich deren Konzentration im Serum in den Bereich von gesunden Personen absenken sollte.

Allerdings werden durch die operativen Interventionen auch Schäden an gesundem Gewebe verursacht, die eine temporäre Erhöhung der Nukleosomenausschüttung in das Blut zur Folge haben könnten. Außerdem kommt es im Rahmen von chirurgischen Eingriffen nicht selten zu infektiösen Komplikationen, welche Einfluss auf die Zelltodrate und Nukleosomenfreisetzung nehmen.

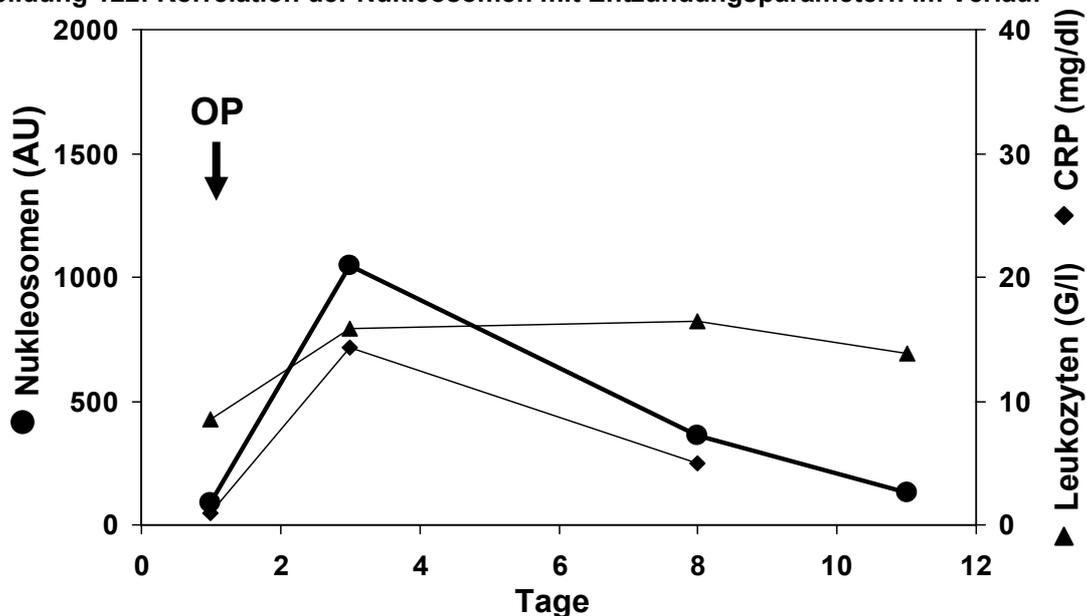
Wir untersuchten die Kinetik der Nukleosomen im Serum von Patienten mit verschiedenen soliden Tumoren vor und einige Tage nach der Operation und verglichen die entsprechenden Verläufe mit den CRP- und Leukozytenwerten sowie dem jeweiligen klinischen Zustand. Bei der Mehrzahl der beobachteten Personen stieg die Nukleosomenkonzentration ein bis drei Tage nach der Intervention deutlich an und sank in den darauf folgenden Tagen wieder ab, häufig jedoch ohne den präoperativen Ausgangswert innerhalb von Wochenfrist zu erreichen.

Abbildung 121: Charakteristische Verläufe von Patienten nach Operation



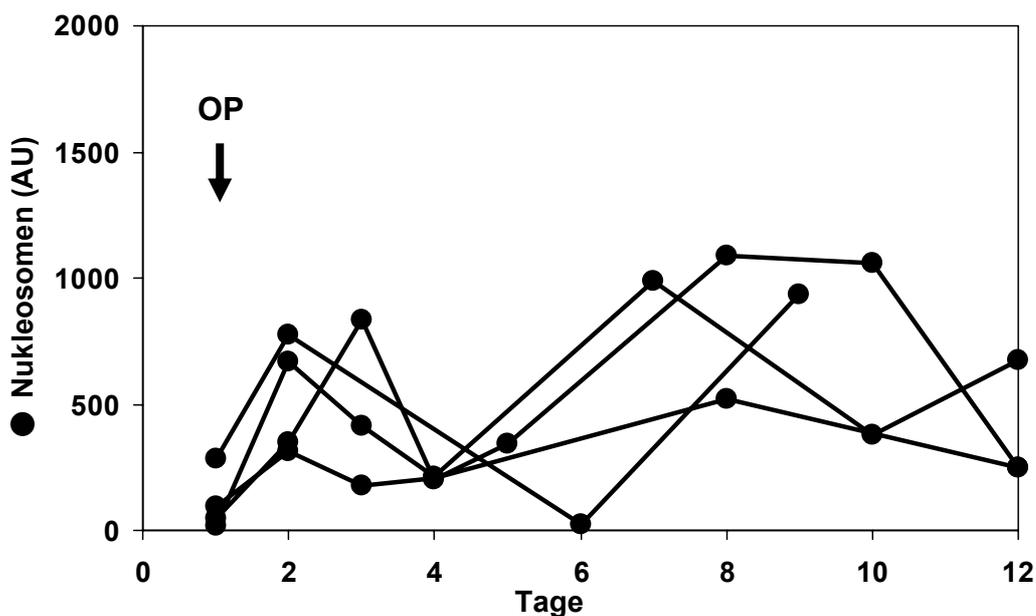
Wiederum wurde dabei ein oftmals synchroner Verlauf mit den Entzündungsparametern beobachtet, wie der nachfolgend abgebildete postoperative Verlauf der Nukleosomen sowie des CRP und der Leukozyten eines Patienten mit einem Rektum-Karzinom im Stadium Dukes D zeigt.

Abbildung 122: Korrelation der Nukleosomen mit Entzündungsparametern im Verlauf



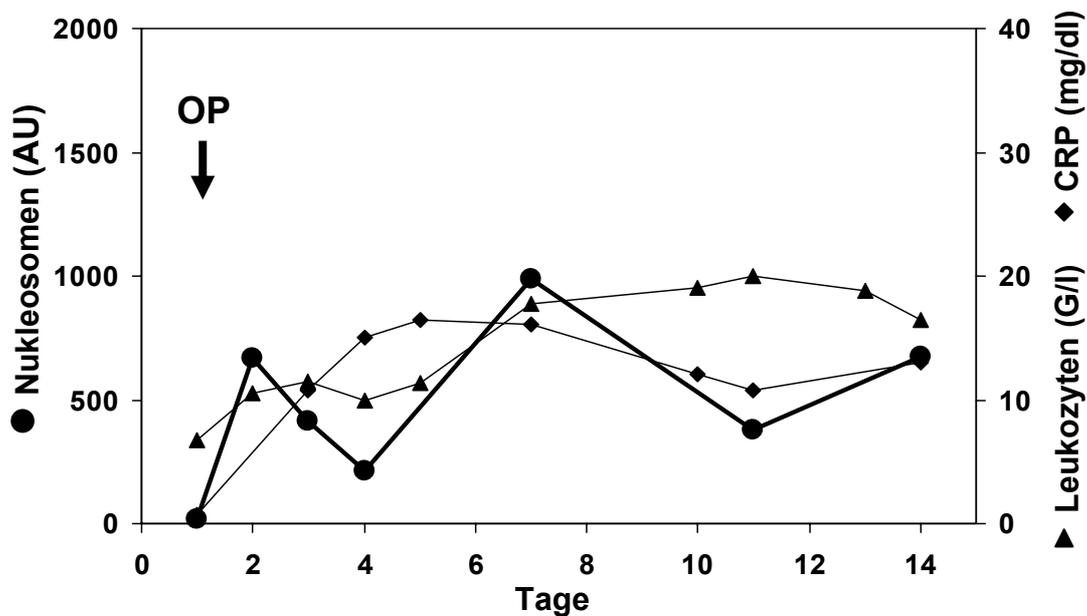
Bei mehreren Patienten kam es etwa eine Woche nach der Operation zu einem erneuten Anstieg der Nukleosomenwerte, einhergehend mit einer postoperativen infektiösen Komplikation.

Abbildung 123: Verläufe von Patienten nach Operation mit postoperativen Komplikationen



Pathologische Erhöhungen der Leukozyten- und/oder CRP-Werte standen damit in zeitlichem Zusammenhang, wie auch im folgenden Verlauf eines Patienten mit einem Magen-Karzinom zu erkennen ist. Nach entsprechender Behandlung kehrten Nukleosomen und Entzündungsparameter wieder langsam in einen niedrigeren Konzentrationsbereich zurück.

Abbildung 124: Korrelation der Nukleosomen mit Entzündungsparametern im Verlauf



Der initiale Nukleosomenanstieg war allerdings bei einigen Patienten überraschend gering oder fehlte ganz. Bei solchen mit prätherapeutisch hohen Wertlagen blieben die Werte teilweise konstant auf hohem Niveau oder sanken primär rasch ab.

Abbildung 125: Alternative Verläufe mit gleichbleibend hohen Wertlagen nach Operation

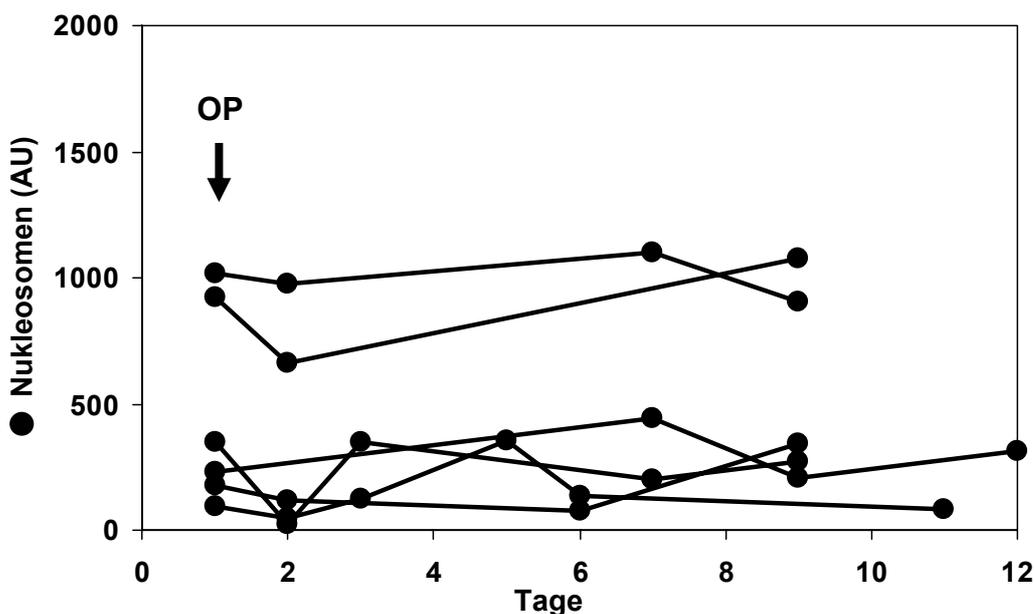
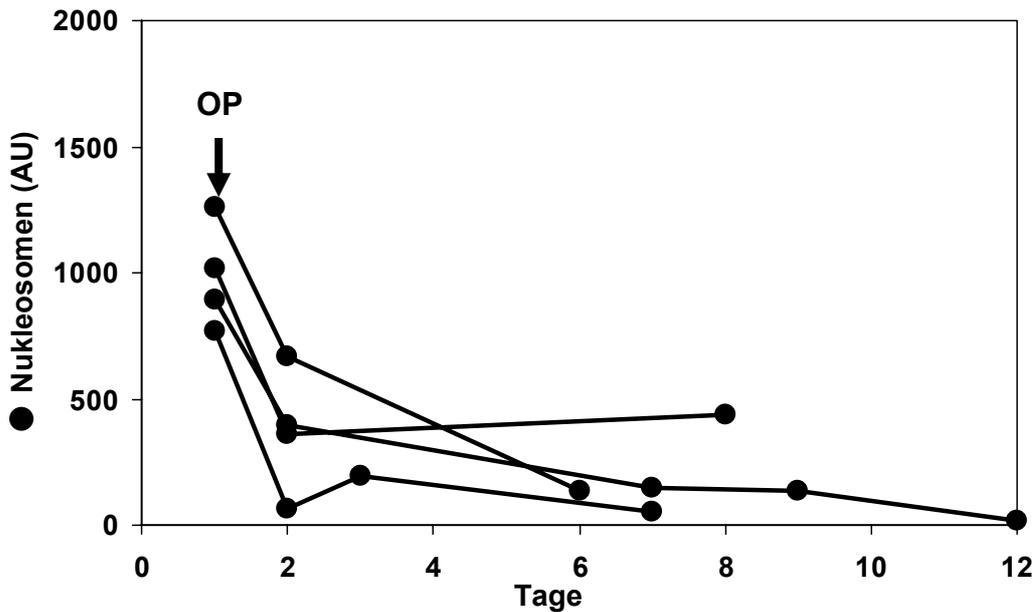


Abbildung 126: Alternative Verläufe mit primären Abfällen nach Operation



Darunter befanden sich nicht nur Personen, bei denen nur geringe invasive Eingriffe vorgenommen wurden, wie bei Mamma-Karzinom in frühen Stadien oder lokalisiertem Prostata-Karzinom, sondern auch Personen, die sich ausgedehnten Operationen unterziehen mussten, wie bei Tumoren der Lunge, des Kolons, des Pankreas oder der Niere.

5.3.5 Kinetik der Nucleosomen im Serum bei Patienten mit malignen Tumoren während Chemotherapie

Eine weitere Behandlungsoption für Patienten mit malignen Tumoren ist die Chemotherapie. Dabei werden zumeist Kombinationen von speziellen, antibiotischen Substanzen verabreicht, welche besonders schnell proliferierende Zellen wie Tumorzellen schädigen und vernichten.

Indikationen für diese Behandlungsform sind Tumorerkrankungen, die lokal weit fortgeschritten und somit dem operativen Zugriff nicht mehr zugänglich sind oder die bereits Absiedlungen in entfernten Lymphknoten und Organen gebildet haben und somit als systemische Erkrankung anzusehen sind. Außerdem werden bei einigen Tumorarten postoperativ adjuvante Chemotherapien zur Konsolidierung des Therapieerfolgs sowie in zunehmendem Maße präoperativ neoadjuvante Schemata zur Verkleinerung des Tumors (Downstaging) und Herstellung der Operabilität eingesetzt. Darüber hinaus werden auch primär als systemisch zu bewertende Erkrankungen wie Leukämien oder Lymphome chemotherapeutisch behandelt.

Die Chemotherapieschemata sind je nach den verwendeten Substanzen meist ein- bis mehrtägig angelegt und zielen auf eine Reduktion der Tumorzellzahl um mehrere Zehnerpotenzen ab. Da die Medikamente dabei häufig systemisch verabreicht werden, wird danach zur Regeneration des gesunden Gewebes eine Pause von zwei bis drei Wochen eingeschoben. Danach beginnt ein neuer Therapiezyklus. Generell erstrecken sich Chemotherapien über mindestens vier bis sechs Zyklen, um eine zuverlässige und anhaltende Senkung der Tumorzellzahl zu gewährleisten. Bei metastasierten Karzinomen wird mitunter schon eine teilweise Reduktion der Tumorzellen als Erfolg gewertet und die Chemotherapie bis zum Auftreten einer Progression der Erkrankung fortgesetzt.

Die Verwendung von neuen chemotherapeutischen Substanzen wie Gemcitabine, die arterielle lokoregionäre Verabreichung von Medikamenten zum Beispiel bei Lebermetastasen kolorektaler Karzinome sowie Hochdosis-Schemata, die bei aggressiv wachsenden Tumoren in fortgeschrittenem Stadium zur Anwendung kommen, ermöglichen eine Intensivierung der Therapien, die ohne längere Pausen in wöchentlichen Abständen gegeben werden.

Im Folgenden wurde die Nukleosomenkinetik im Serum von Patienten mit verschiedenen Tumorarten, die sich in ihren Ansprechraten und ihren Tumorstadien unterscheiden, während Chemotherapie beobachtet. Primär systemischen Lymphom-Erkrankungen wurden fortgeschrittene Bronchial- und Kolon-Karzinome gegenübergestellt sowie Kolonkarzinome während der postoperativen Konsolidierungstherapie untersucht. Daneben wurden noch einige weitere Tumorarten erfasst.

Zu erwartende Kinetik der Nukleosomenkonzentration während Chemotherapie

Die ideale Vorstellung der selektiven Elimination von Tumorzellen ist durch die eingeschränkte Spezifität der Chemotherapeutika limitiert. Da alle schnell proliferierenden Zellen dadurch geschädigt werden, sind neben den Tumorzellen auch Darmepithelzellen, Lymphozyten und Zellen der Hämatopoese betroffen, die das Auftreten von entsprechenden Nebenwirkungen erklären (Hendry 1997).

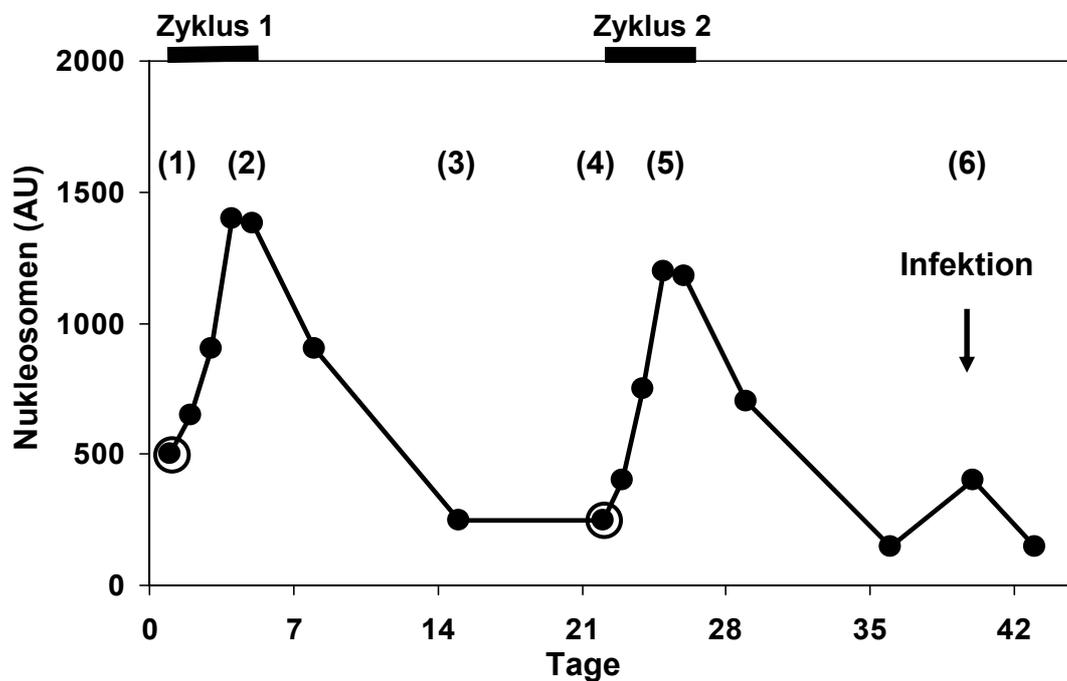
Nach Verabreichung der toxischen Medikamente ist somit mit einem gewaltigen Anstieg der Zelltodrate zu rechnen, der sich in einer Erhöhung der Nukleosomenkonzentration im Serum

widerspiegelt. In der anschließenden Regenerationsphase während der Therapiepause ist hingegen ein beständiger Rückgang der Nukleosomenwerte zu erwarten. Die folgenden Zyklen dürften ähnliche Veränderungen hervorrufen.

Sowohl im Vergleich der verschiedenen Tumorarten wie auch in der Beziehung zur Wirksamkeit der Therapie und dem Auftreten von klinischen Nebenwirkungen sind einige charakteristische Merkmale am Nukleosomenverlauf von Bedeutung:

1. Der Ausgangswert vor dem Therapiezyklus (1)
2. Der Anstieg während des Therapiezyklus (2)
3. Der Abfall in der Therapiepause (3)
4. Der Ausgangswert vor den folgenden Zyklen (4)
5. Der Anstieg und Abfall bei den folgenden Zyklen (5)
6. Die Veränderungen bei klinischen Nebenwirkungen (6)

Abbildung 127: Schematische Darstellung eines Verlaufs während Chemotherapie



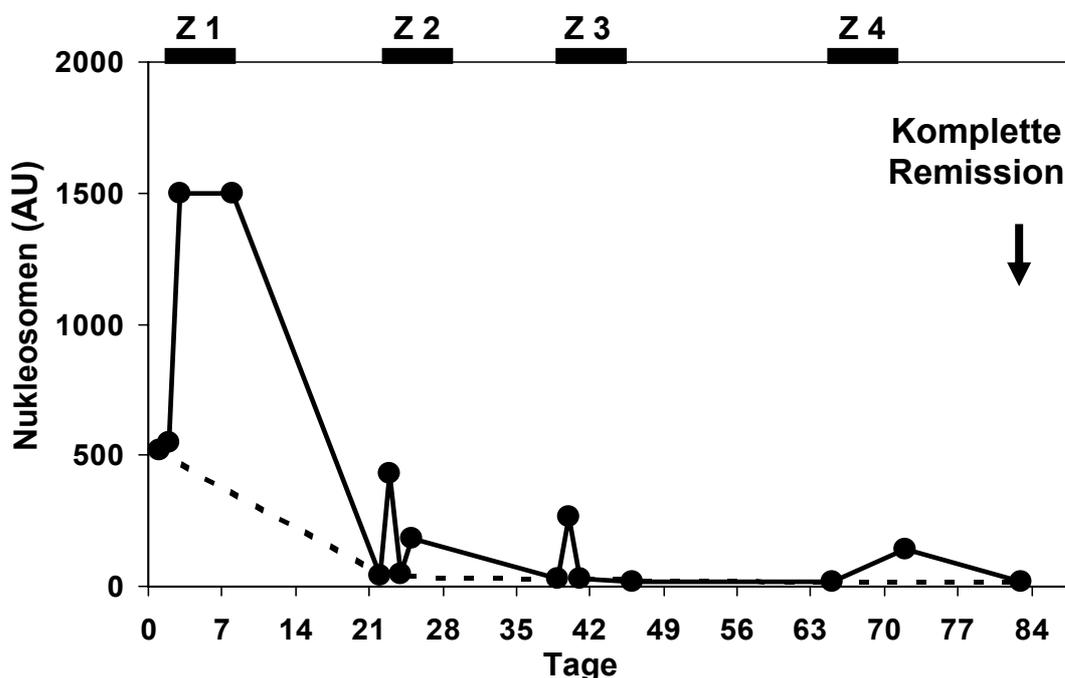
Tatsächliche Kinetik der Nukleosomenkonzentration während Chemotherapie

Ausgehend von unterschiedlichen prätherapeutischen Werten war bei den meisten Patienten, bei denen tägliche Blutproben während der Therapien erhältlich waren, ein initialer, steiler Anstieg der Nukleosomenwerte innerhalb von ein bis drei Tagen nach Beginn der Chemotherapie zu beobachten. Dies traf sowohl auf Patienten mit Lymphomen, Bronchial-, Kolon- wie auch anderen Karzinomen zu. Bei einigen Patienten mit prätherapeutisch erhöhten Werten blieb dieser Anstieg allerdings aus und die Werte fielen schon während des Zyklus‘ ab.

In der anschließenden therapiefreien Zeit gingen die Werte erwartungsgemäß auf ein niedrigeres, bei den einzelnen Patienten unterschiedliches Niveau zurück; bei einigen stiegen sie bis zum Beginn des zweiten Zyklus an. In den folgenden Zyklen wiederholte sich dieser kurzzeitige Anstieg in unterschiedlicher Ausprägung. In manchen Fällen traten Nebenwirkungen infektiöser Art auf, die eine temporäre Erhöhung der Nukleosomenwerte nach sich zogen.

Auch im Verlauf dieser Patientin mit einem Hodgkins‘ Lymphom im Stadium IIa, die eine primäre Chemotherapie nach dem BEACOPP-Protokoll erhielt, kam es typischerweise zu einem raschen Anstieg der Nukleosomenwerte innerhalb weniger Tage nach Therapiebeginn. In der therapiefreien Zeit sanken die Werte auf ein sehr niedriges Niveau ab. Während der folgenden Zyklen fielen kleinere Konzentrationsspitzen auf.

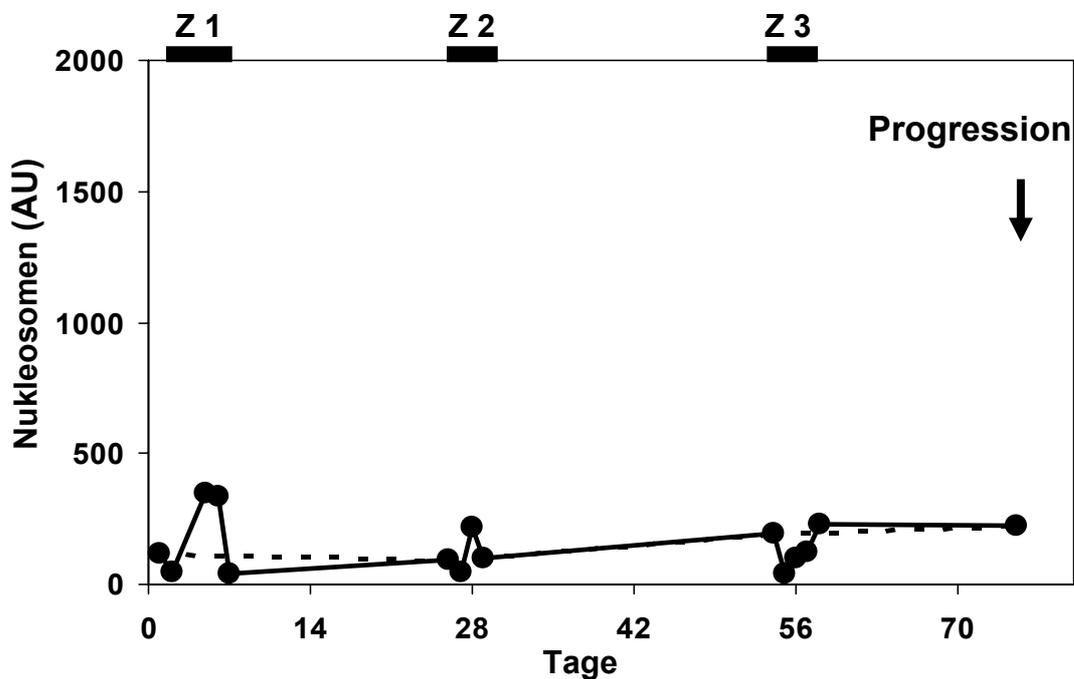
Abbildung 128: Verlauf einer Patientin mit einer Remission nach Chemotherapie



Im gesamten Verlauf nahmen die präzyklischen Basiswerte kontinuierlich ab (gestrichelte Linie) und blieben konstant in einem Wertebereich von gesunden Personen. Bereits beim zweiten und dritten Zyklus (Z2 und Z3) zeigte sich eine deutliche klinische Besserung. Bei den Staginguntersuchungen nach dem vierten Zyklus (Z4) konnte schließlich eine komplette Remission festgestellt werden.

Im Folgenden ist die Nukleosomenkinetik eines Patienten mit einem metastasierten Kolon-Karzinom abgebildet, der mit Fluoruracil, Folinsäure und Oxaliplatin behandelt wurde:

Abbildung 129: Verlauf eines Patienten mit einer Progression nach Chemotherapie



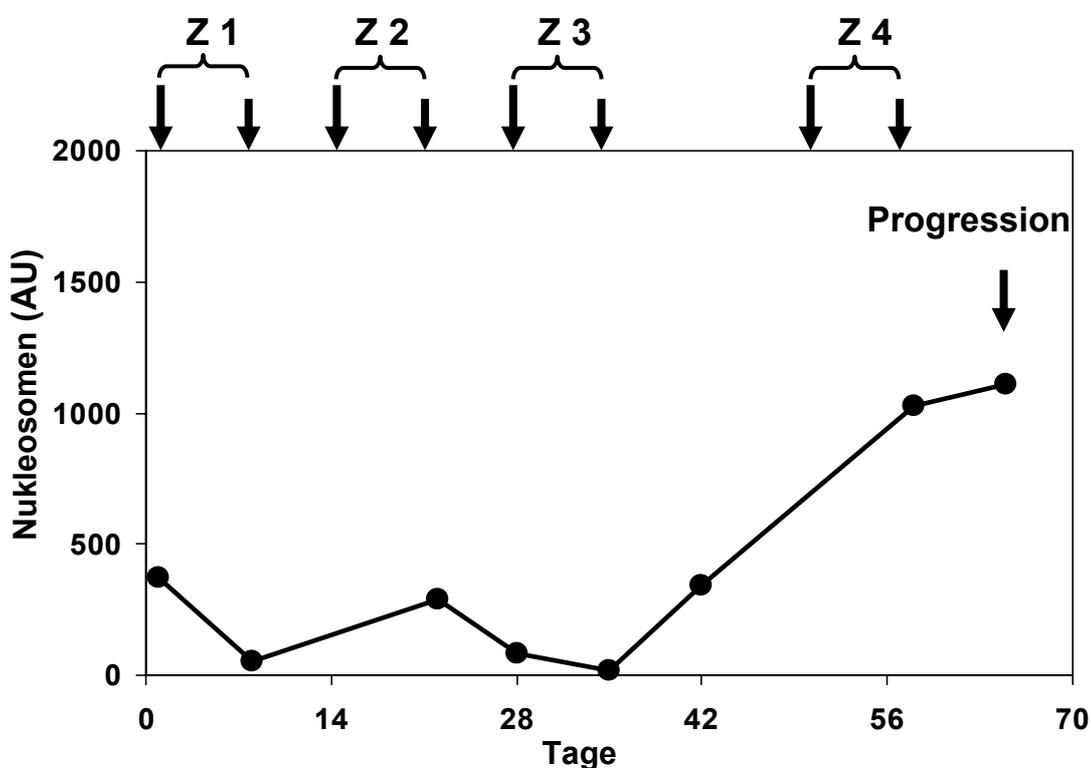
Wiederum ist der rasche Anstieg der Nukleosomenkonzentration während der Therapiezyklen (Z1, Z2 und Z3) zu erkennen. Jedoch fielen die Werte in den therapiefreien Intervallen nicht oder nur kurz ab, um bis zu Beginn des nächsten Zyklus wieder anzusteigen. Korrespondierend zu diesen zunehmenden präzyklischen Basiswerten (gestrichelte Linie) fand sich in den bildgebenden Staginguntersuchungen nach dem dritten Zyklus eine Progression der Erkrankung.

Bei einigen Patienten wurden die Medikamente regelmäßig einmal je Woche verabreicht. Bei ihnen wurden Blutabnahmen in wöchentlichen Abständen vorgenommen. In der Zeit zwischen zwei Messungen war der Therapie-Effekt auf die Nukleosomen-Freisetzung vermutlich schon abgeklungen, so dass der temporäre Anstieg unmittelbar nach der

Applikation übersprungen wurde. Die Veränderungen der Nukleosomenkonzentrationen geben in diesen Fällen deshalb die spontane Nukleosomen-Freisetzung wider, die in Zusammenhang mit dem Zellumsatz und der verbleibenden Tumoraktivität steht.

Der folgende Verlauf eines Patienten mit einem metastasierten Kolon-Karzinom während einer wöchentlichen Hochdosis-Behandlung mit Fluoruracil, Folinsäure und Oxaliplatin zeigt nach dem dritten Zyklus einen kontinuierlichen Anstieg der Nukleosomenmenge. Bald darauf wurde computertomographisch die Progression des Krankheitsprozesses erfasst.

Abbildung 130: Verlauf eines Patienten mit einer Progression nach Chemotherapie

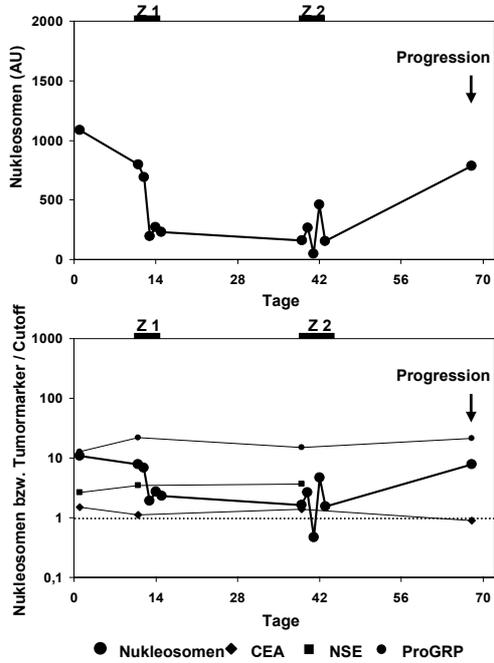


Die einzelnen Verläufe während Chemotherapie sind im Folgenden detailliert dargestellt; dabei sind in der ersten Abbildung jeweils die Absolutwerte der Nukleosomen, in der zweiten die genormten, durch den Grenzwert dividierten Nukleosomen- und Tumormarkerwerte im Vergleich gezeigt. Als Grenzwert (Cutoff) für die Nukleosomen wurde die 95%-Perzentile gesunder Personen (100 AU) herangezogen (ED=Erstdiagnose, Rez=Rezidivdiagnose, Z=Zyklus):

Abbildungen 131 – 254: Verläufe bei Patienten mit malignen Tumoren während Chemotherapie

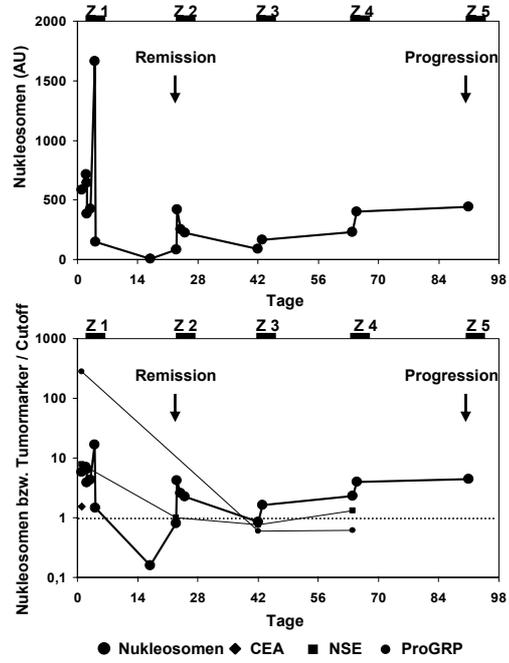
Pat. C1, H.R. 56 J. Bronchial-KA T4 Nx M1 (mult) SCLC (ext. dis)
ED 3/98 5 Zy Chemotherapie Rez 10/98

Chemotherapie (2 Zy): Topotecan 1,5 mg (Tage 1-5)
Klinischer Verlauf: Progression



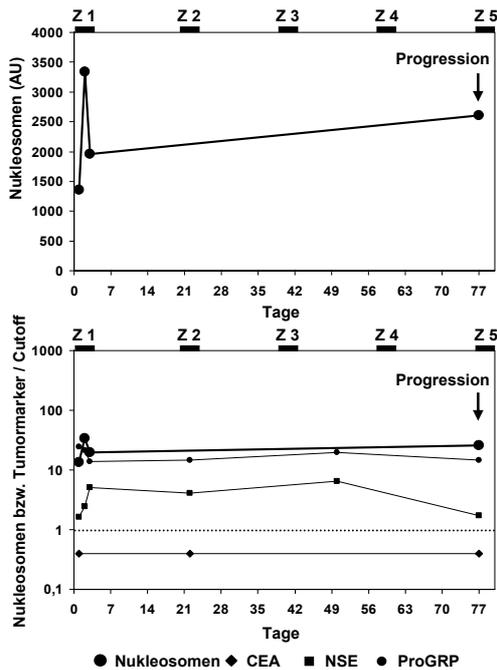
Pat. C2, W.H. 66 J. Bronchial-KA T4 Nx M1 (mult) SCLC (ext. dis)
ED 9/98 primäre Chemotherapie

Chemotherapie (5 Zy): Cyclophosphamid 1400 mg/qm (Tag 1)
(ACE-Protokoll) Adriamycin 60 mg/qm (Tag 1)
Etoposid 100 mg/qm (Tage 1-3)
Klinischer Verlauf: Progression



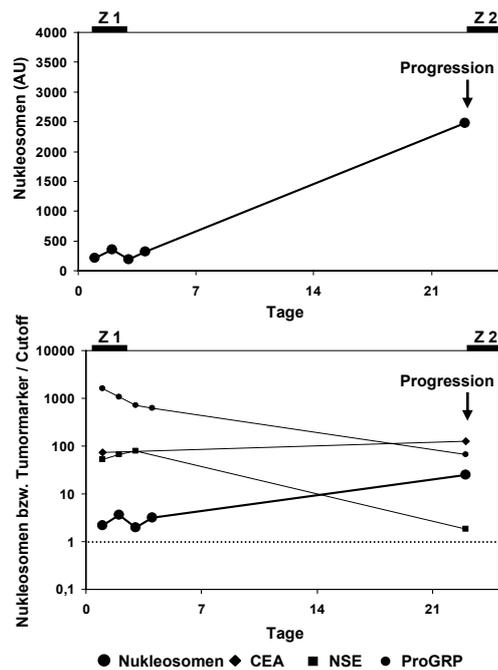
Pat. C3, J.F. 65 J. Bronchial-KA T4 Nx M1 (mult) SCLC (ext. dis)
ED 4/98 primäre Chemotherapie

Chemotherapie (5 Zy): Cyclophosphamid 1400 mg/qm (Tag 1)
(ACE-Protokoll) Adriamycin 60 mg/qm (Tag 1)
Etoposid 100 mg/qm (Tage 1-3)
Klinischer Verlauf: Progression



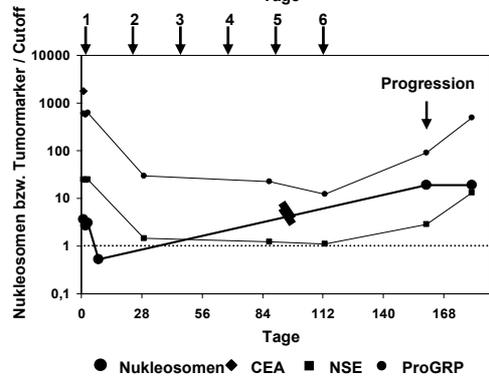
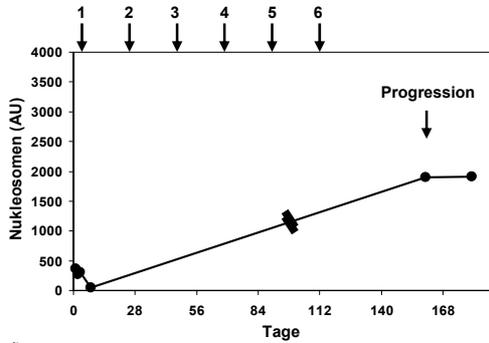
Pat. C4, J.S. 58 J. Bronchial-KA T4 Nx M1 (mult) SCLC (ext. dis)
ED 7/98 primäre Chemotherapie

Chemotherapie (2 Zy): Cyclophosphamid 1400 mg/qm (Tag 1)
(ACE-Protokoll) Adriamycin 60 mg/qm (Tag 1)
Etoposid 100 mg/qm (Tage 1-3)
Klinischer Verlauf: Progression



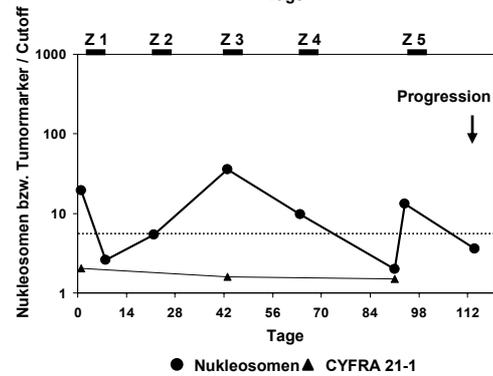
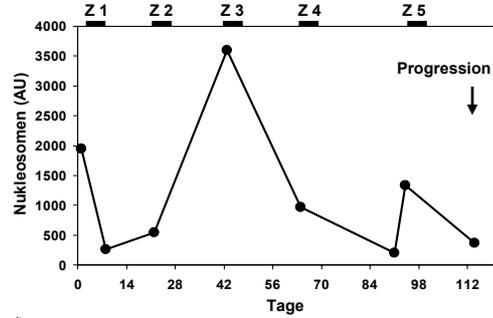
Pat. C5, S.S. 62 J. Bronchial-KA T4 Nx M1 (Leber) SCLC (ext. dis)
ED 4/98 primäre Chemotherapie
Chemotherapie (6 Zy): Cyclophosphamid 1400 mg/qm (Tag 1)
(ACE-Protokoll) Adriamycin 60 mg/qm (Tag 1)
Etoposid 100 mg/qm (Tage 1-3)

Klinischer Verlauf: Progression



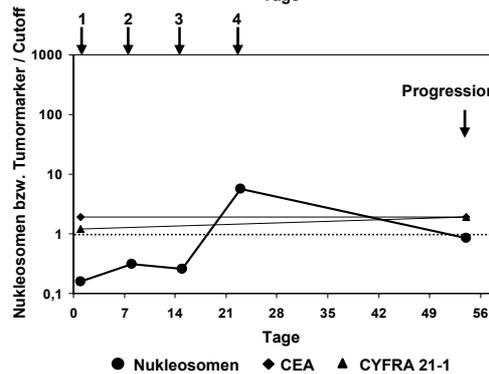
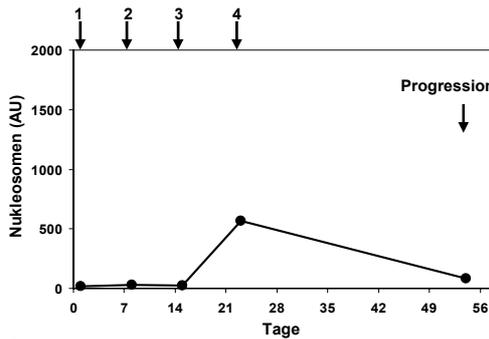
Pat. C6, A.B. 61 J. Bronchial-KA T4 N2 M1 (Leber) Adeno-CA
ED 4/98 primäre Chemotherapie
Chemotherapie (5 Zy): Carboplatin 30 mg/qm (Tag 1)
Taxol 135 mg/qm (Tag 1)

Klinischer Verlauf: Progression



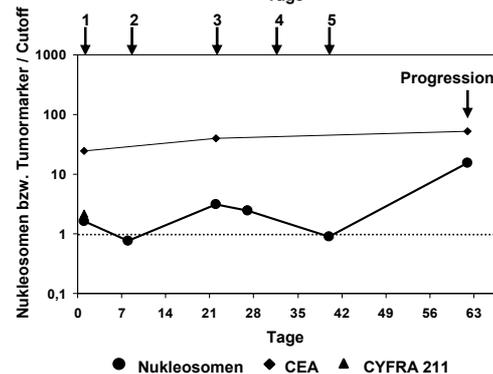
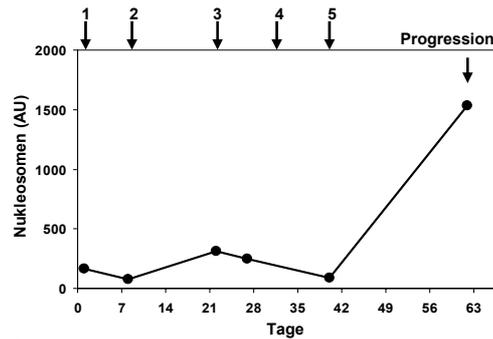
Pat. C7, I.R. 52 J. Bronchial-KA T4 N3 M1 (Lunge) NSCLC
ED 9/98 primäre Chemotherapie
Chemotherapie (4 Zy): Cisplatin 300 mg/qm (Tag 1)
Taxol 200 mg/qm (Tag 1)

Klinischer Verlauf: Progression

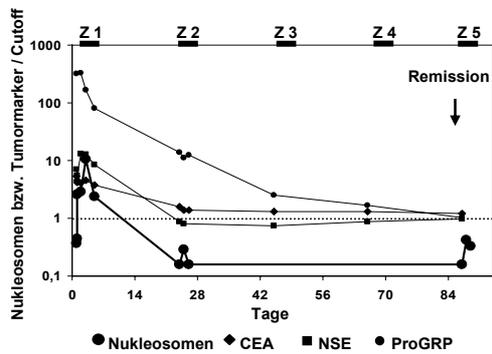
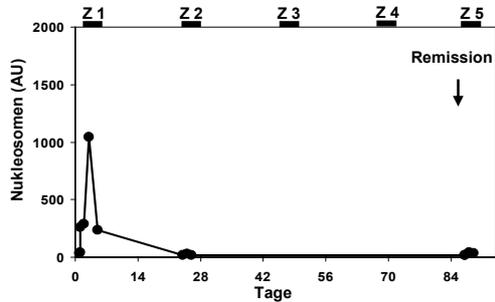


Pat. C8, C.T. 41 J. Bronchial-KA T4 N2 M1 (cerebral) NSCLC
ED 1/98 6 Zy Chemotherapie Rez 10/98

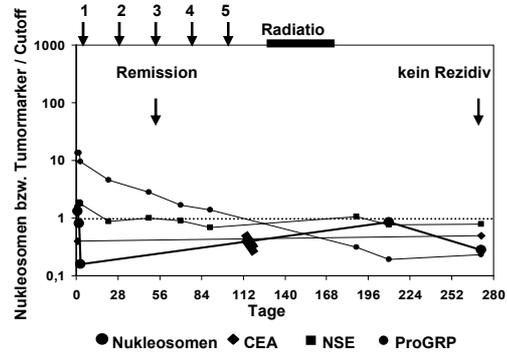
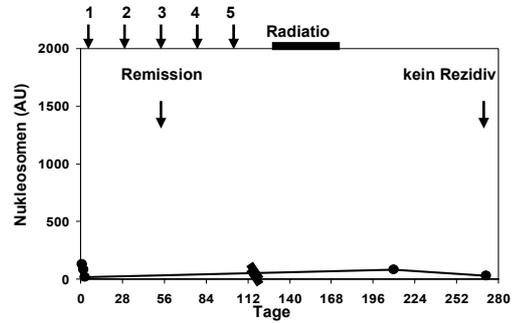
Klinischer Verlauf: Progression



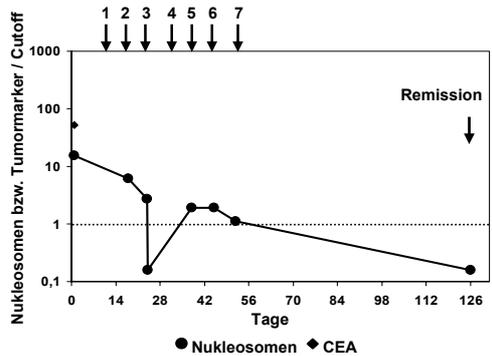
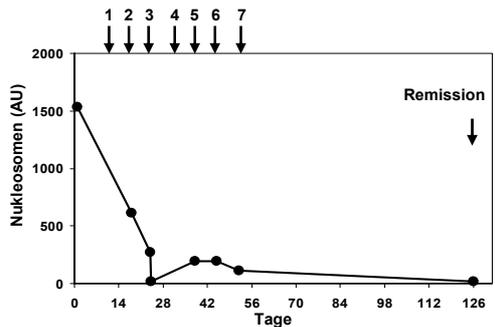
Pat. C9, H.R. 55 J. Bronchial-KA T4 Nx M1 (mult) SCLC (ext. dis)
 ED 2/98 primäre Chemotherapie
Chemotherapie (4 Zy): Cyclophosphamid 1400 mg/qm (Tag 1)
 (ACE-Protokoll) Adriamycin 60 mg/qm (Tag 1)
 Etoposid 100 mg/qm (Tage 1-3)
Klinischer Verlauf: fast komplette Remission



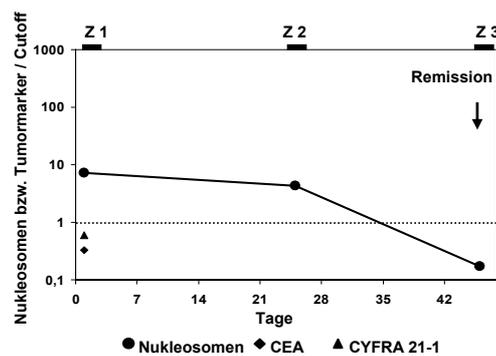
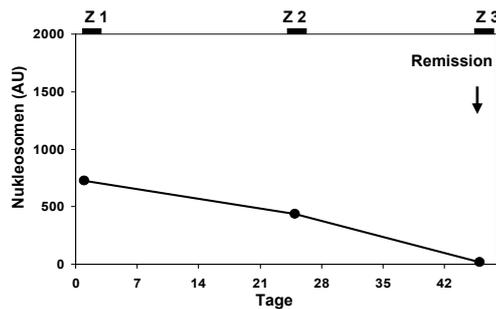
Pat. C10, H.K. 62 J. Bronchial-KA T4 Nx M1 (ZNS) SCLC (ext. dis)
 ED 3/98 primäre Chemotherapie
Chemotherapie (5 Zy): Cyclophosphamid 1400 mg/qm (Tag 1)
 (ACE-Protokoll) Adriamycin 60 mg/qm (Tag 1)
 Etoposid 100 mg/qm (Tage 1-3)
Radiatio: mediastinal (35 Gy) und cerebral (40 Gy)
Klinischer Verlauf: Remission



Pat. C11, C.T. 42 J. Bronchial-KA T4 N2 M1 (mult) NSCLC
 ED 1/98 multiple Chemotherapien Rez 11/98
Chemotherapie (7 Zy): Navelbine 30 mg/qm
Klinischer Verlauf: Remission



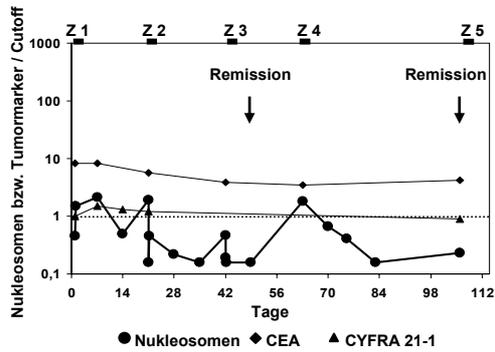
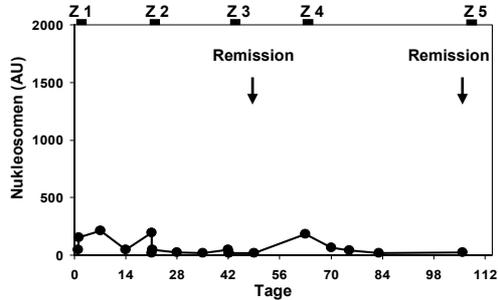
Pat. C12, F.K. 41 J. Bronchial-KA T3 N3 M0 G2 NSCLC
 ED 12/98 neoadjuvante Chemotherapie
Chemotherapie (3 Zy): Carboplatin 300 mg/qm (Tag 1)
 Taxol 200 mg/qm (Tag 1)
Klinischer Verlauf: Remission



Pat. C13, H.L. 72 J. Bronchial-KA T4 Nx M1 großzelliges CA ED 8/98 primäre Chemotherapie

Chemotherapie (5 Zy): Cisplatin 300 mg/qm (Tag 1)
Taxol 200 mg/qm (Tag 1)

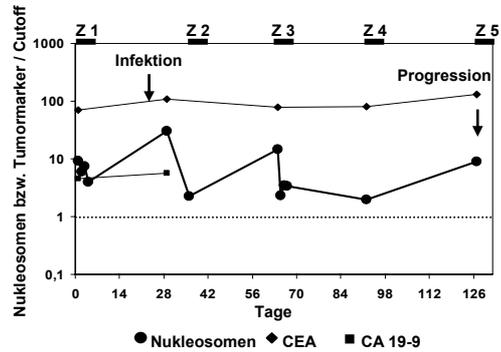
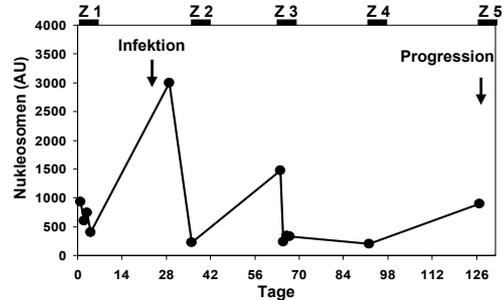
Klinischer Verlauf: Remission



Pat. C14, W.H. 64 J. Rektum-KA T3 N1 M1 (Leber) Duker D ED+OP 6/98 postoperative Chemotherapie

Chemotherapie (5 Zy): 5-Fluoruracil 600 mg/qm i.a. (Tage 1-5)
Folinsäure 300 mg i.a. (Tage 1-5)

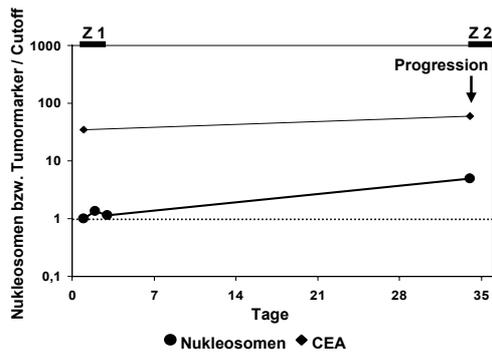
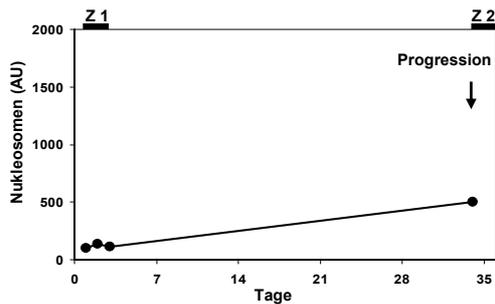
Klinischer Verlauf: Progression



Pat. C15, B.H. 71 J. Colon-KA T2 N1 M1 (multiple) G2 Duker D ED+OP 10/98 postoperative Chemotherapie

Chemotherapie (2 Zy): 5-Fluoruracil 600 mg/qm i.a. (Tage 1-5)
Folinsäure 300 mg i.a. (Tage 1-5)

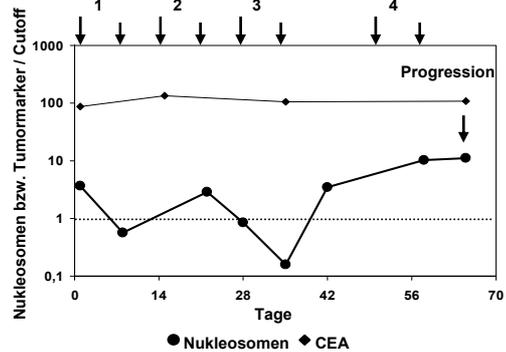
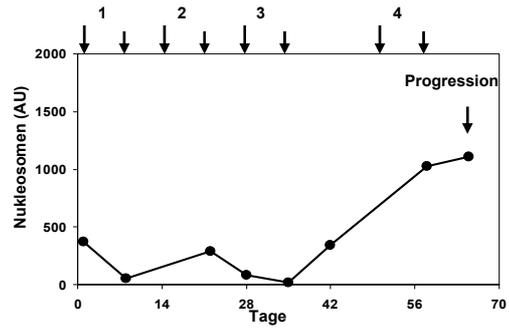
Klinischer Verlauf: Progression



Pat. C16, A.S. 57 J. Rektum-KA T2 N2 M1 (multiple) Duker D ED+OP 10/95 Rez 10/98

Chemotherapie (4 Zy): 5-Fluoruracil 3500 mg/qm i.v. (Tage 1+8)
(Hochdosis-Protokoll) Folinsäure 1000 mg i.v. (Tage 1+8)
Oxaliplatin 150 mg i.v. (Tag 8)

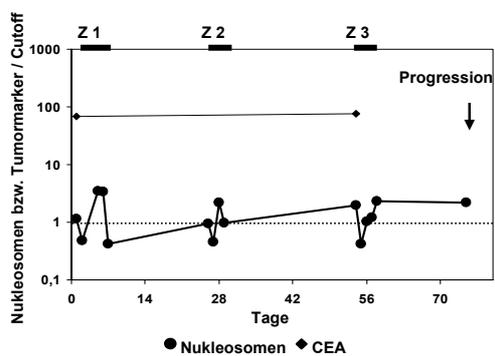
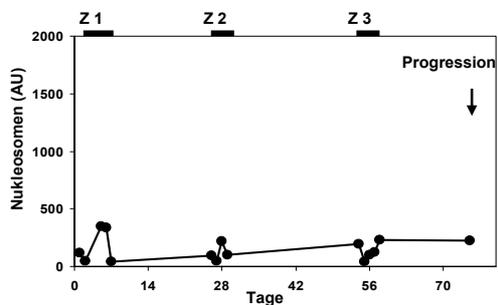
Klinischer Verlauf: Progression



Pat. C17, H.W. 58 J. Colon-KA T4 N0 M1 (multiple) G3 Duker D ED 1/98 Rez 10/98

Chemotherapie (3 Zy): 5-Fluoruracil 500 mg/qm i.v. (Tage 1-5)
Folinsäure 300 mg i.v. (Tage 1-5)
Oxaliplatin 130 mg i.v. (Tag 2)

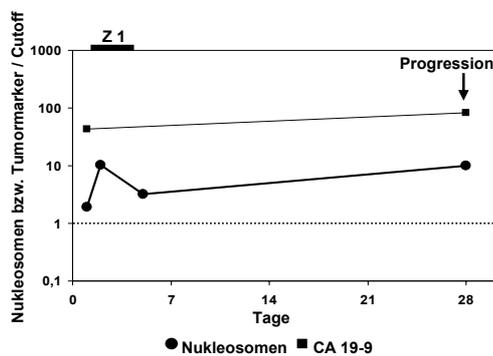
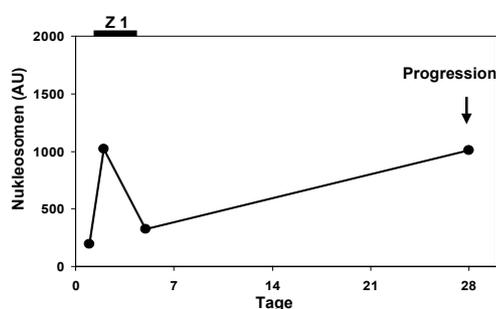
Klinischer Verlauf: Progression



Pat. C18, E.H. 67 J. Colon-KA Tx Nx M1 (multiple) G2 Duker D ED+OP 12/96 palliative Chemotherapie

Chemotherapie (1 Zy): 5-Fluoruracil 500 mg/qm (Tage 1-5)
(Münchner Protokoll) Folinsäure 300 mg (Tage 1-5)

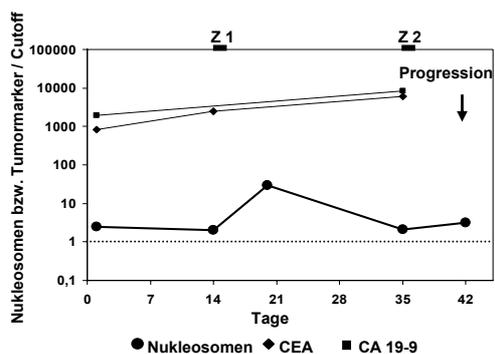
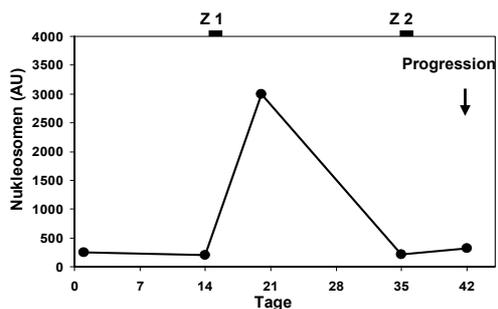
Klinischer Verlauf: Progression



Pat. C19, J.N. 45 J. Colon-KA Tx Nx M1 (Leber, Lunge) Duker D ED 10/98 primäre Chemotherapie

Chemotherapie (2 Zy): Carboplatin 300 mg/qm (Tag 1)
Taxol 135 mg/qm (Tag 1)

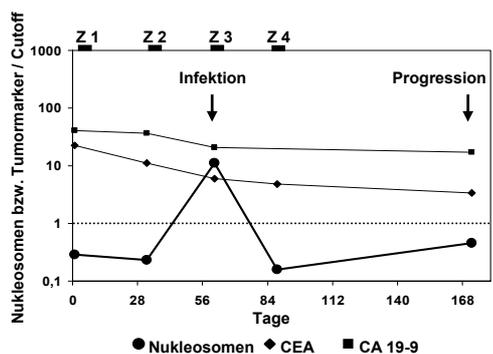
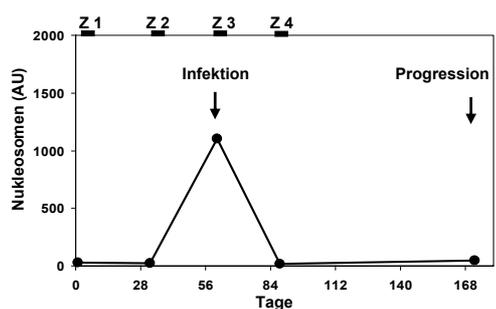
Klinischer Verlauf: Progression



Pat. C20, G.I. 57 J. Sigma-KA T3 N2 M1 (multiple) G2 Duker D ED+OP 10/96 postoperative Chemotherapie

Chemotherapie (4 Zy): 5-Fluoruracil 500 mg/qm (Tage 1-5)
(Münchner Protokoll) Folinsäure 300 mg (Tage 1-5)

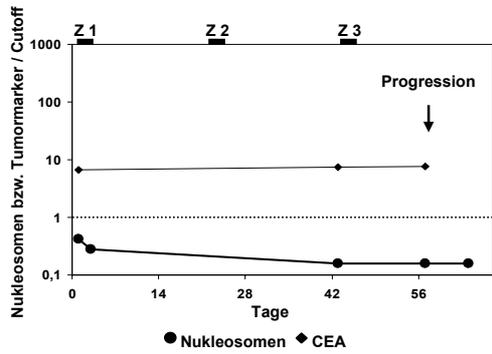
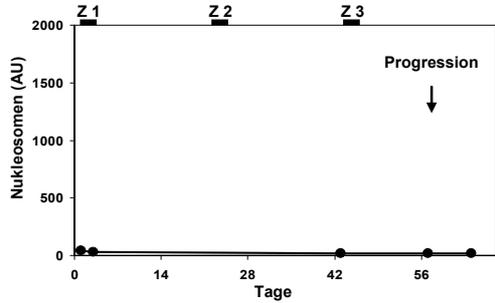
Klinischer Verlauf: Progression



Pat. C21, G.S. 60 J. Colon-KA T3 N1 M1 (multiple) G2 Dukes D
ED+OP 12/90 Rez 9/96

Chemotherapie (3 Zy): 5-Fluoruracil 500 mg/qm (Tage 1-5)
(Münchener Protokoll) Folinsäure 300 mg (Tage 1-5)

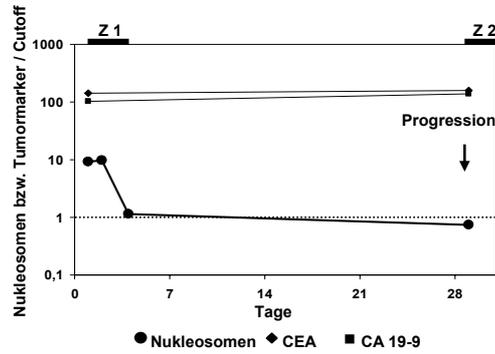
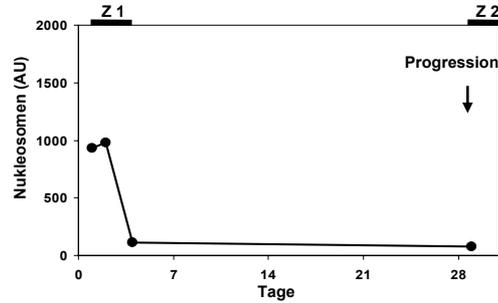
Klinischer Verlauf: Progression



Pat. C22, E.K. 60 J. Colon-KA T3 N2 M1 (multiple) G3 Dukes D
ED+OP 12/96 postoperative Chemotherapie

Chemotherapie (2 Zy): 5-Fluoruracil 500 mg/qm (Tage 1-5)
(Münchener Protokoll) Folinsäure 300 mg (Tage 1-5)

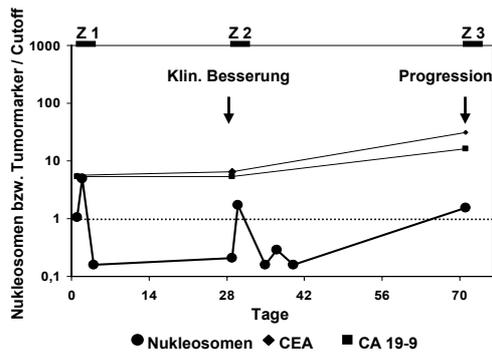
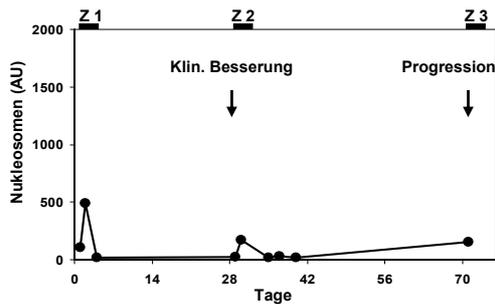
Klinischer Verlauf: Progression



Pat. C23, A.S. 66 J. Rektum-KA T3 N1 M0 G3 Dukes C
ED+OP 2/92 Radio+Chemotherapie Rez 10/96

Chemotherapie (3 Zy): 5-Fluoruracil 500 mg/qm (Tage 1-5)
(Münchener Protokoll) Folinsäure 300 mg (Tage 1-5)

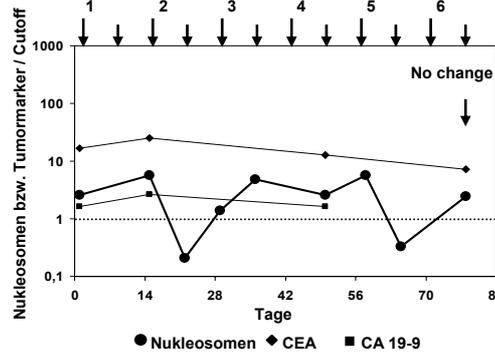
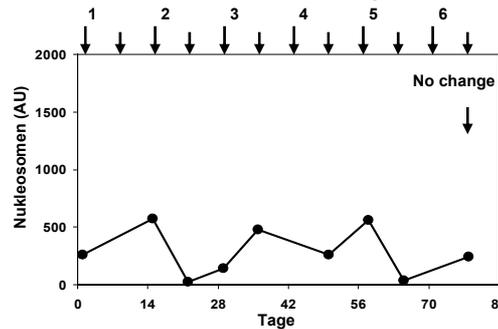
Klinischer Verlauf: Progression



Pat. C24, E.K. 61 J. Rektum-KA T3 N0 M1 (multiple) Dukes D
ED+OP 6/98 Radio+Chemotherapie Rez 10/98

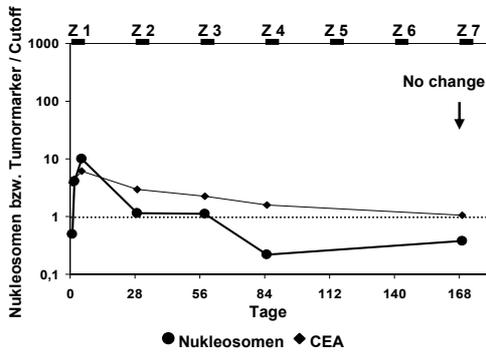
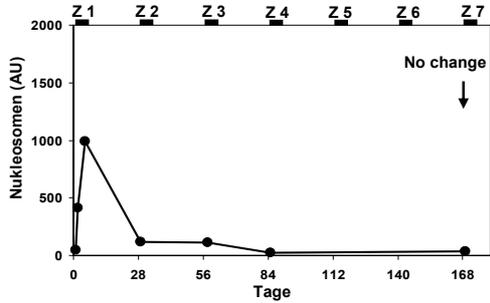
Chemotherapie (6 Zy): 5-Fluoruracil 3500 mg/qm i.v. (Tage 1+8)
(Hochdosis-Protokoll) Folinsäure 1000 mg i.v. (Tage 1+8)
Oxaliplatin 170 mg i.v. (Tag 8)

Klinischer Verlauf: keine Befundänderung



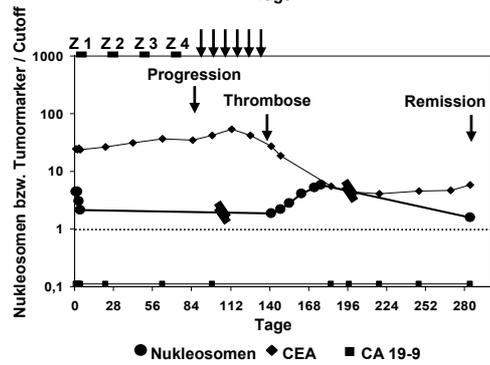
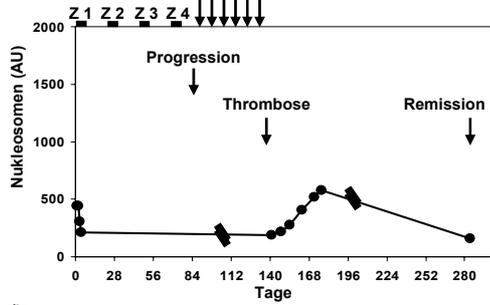
Pat. C25, H.K. 75 J. Colon-KA T3 N2 M1 (Leber) G2 Dukes D
ED+OP 9/89 multiple Chemotherapien Rez 10/96

Chemotherapie (7 Zy): 5-Fluoruracil 500 mg/qm (Tage 1-5)
(Münchener Protokoll) Folinsäure 300 mg (Tage 1-5)
Klinischer Verlauf: keine Befundänderung



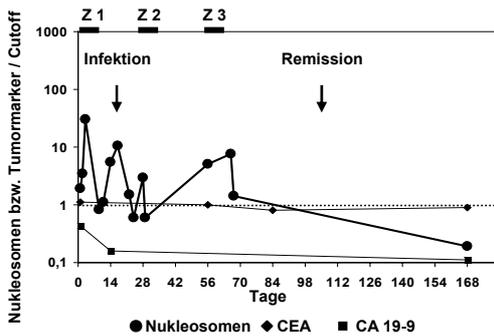
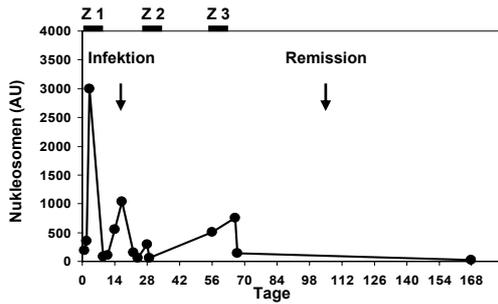
Pat. C26, B.S. 56 J. Colon-KA T3 N1 M1 (Leber) G2 Dukes D
ED 4/98 primäre Chemotherapie
Chemotherapie (4 Zy): 5-Fluoruracil 500 mg/qm i.v. (Tage 1-5)
Folinsäure 300 mg i.v. (Tage 1-5)

Klinischer Verlauf: Progression
Chemotherapie (6 Zy): 5-Fluoruracil 3500 mg/qm i.v. (Tage 1+8)
(Hochdosis-Protokoll) Folinsäure 1000 mg i.v. (Tage 1+8)
Oxaliplatin 150 mg i.v. (Tag 8)
Klinischer Verlauf: Remission



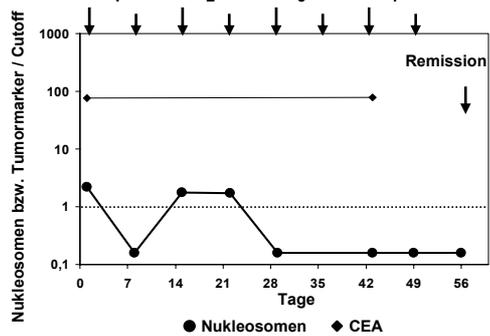
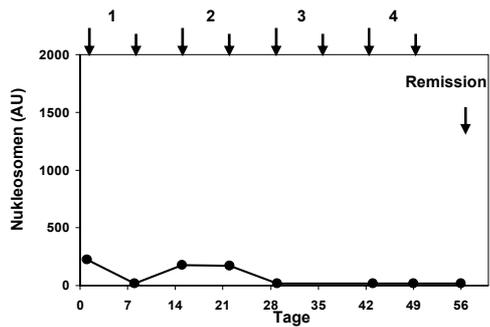
Pat. C27, H.G. 72 J. Rektum-KA Tx Nx M1 G2 Dukes D
ED+OP 1/89 Rez (Leber) 10/98

Chemotherapie (3 Zy): 5-Fluoruracil 500 mg/qm i.a. (Tage 1-5)
Folinsäure 300 mg i.a. (Tage 1-5)
Oxaliplatin 25 mg/qm i.a. (Tag 2)
Klinischer Verlauf: Remission



Pat. C28, H.W. 58 J. Colon-KA T4 N0 M1 (multiple) G3 Dukes D
ED 1/98 Rez 1/99

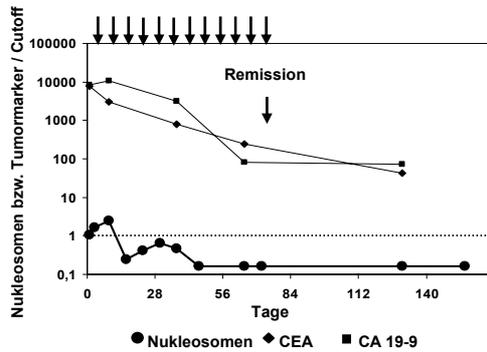
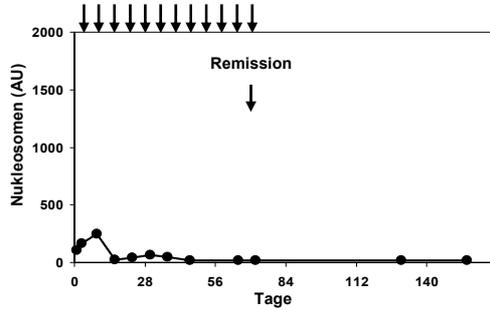
Chemotherapie (4 Zy): 5-Fluoruracil 3500 mg/qm i.v. (Tage 1+8)
(Hochdosis-Protokoll) Folinsäure 1000 mg i.v. (Tage 1+8)
Oxaliplatin 170 mg i.v. (Tag 8)
Klinischer Verlauf: Remission



Pat. C29, J.N. 45 J. Colon-KA Tx Nx M1 (Leber, Lunge) Dukus D
ED 10/98 Rez 12/98

Chemotherapie (mult): Gemcitabine 1000 mg/qm (Tag 1)
Adriamycin 10 mg/qm (Tag 1)

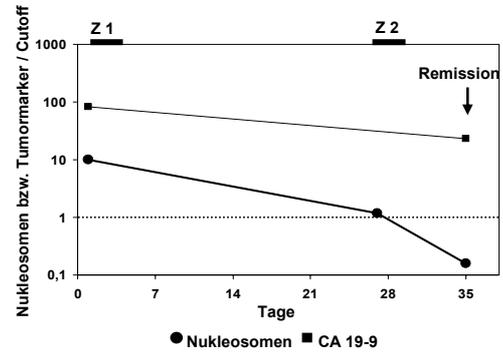
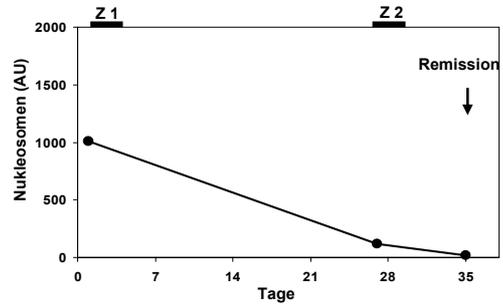
Klinischer Verlauf: Remission



Pat. C30, E.H. 67 J. Colon-KA Tx Nx M1 (multiple) G2 Dukus D
ED+OP 12/96 palliative Rezidiv-Chemotherapie

Chemotherapie (2 Zy): Epirubicin 40 mg/qm (Tag 1)
Vinorelbin 30 mg/qm (Tage 1+8)

Klinischer Verlauf: Remission

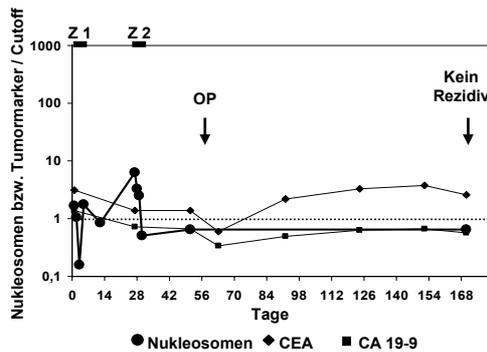
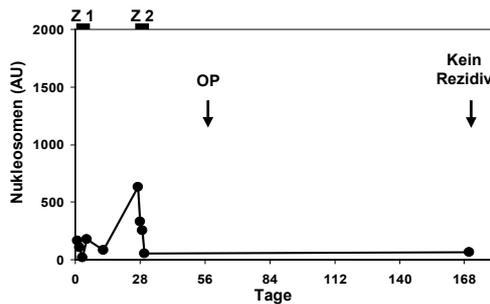


Pat. C31, H.F. 63 J. Rektum-KA Tx Nx M1 G2 Dukus D
ED+OP 11/95 Rez (Leber) 12/98

Chemotherapie (2 Zy): 5-Fluoruracil 500 mg/qm (Tage 1-5)
(Münchener Protokoll) Folsäure 300 mg (Tage 1-5)

Exstirpation der Lebermetastase

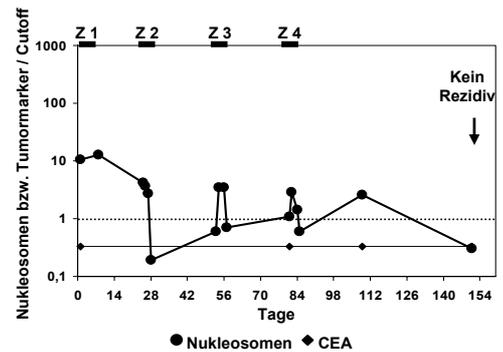
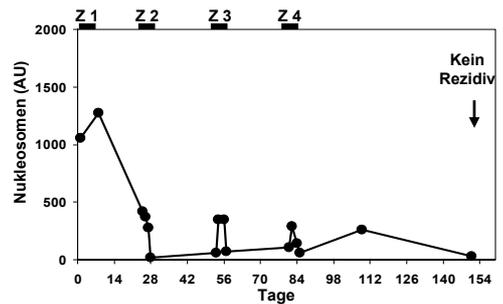
Klinischer Verlauf: kein Rezidiv



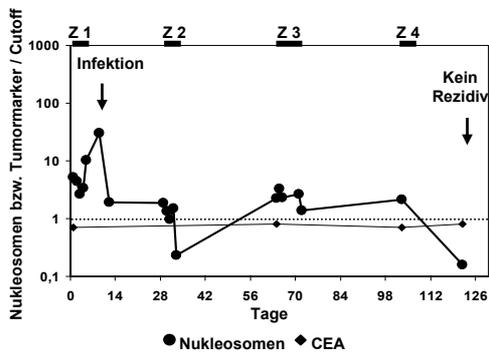
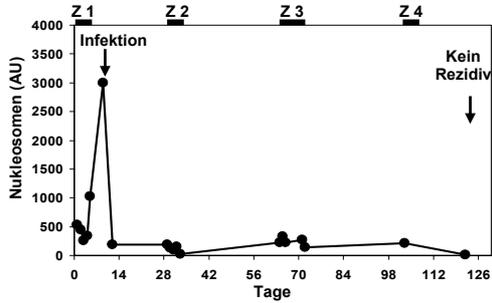
Pat. C32, A.G. 40 J. Sigma-KA T3 N1 M0 G3 Dukus C
ED+OP 8/98 postoperative Chemotherapie

Chemotherapie (4 Zy): 5-Fluoruracil 425 mg/qm i.v. Bolus (Tage 1-5)
Folsäure 20 mg i.v. Bolus (Tage 1-5)
Panorex 100 mg i.v. (vor 1. und 3. Zyklus)

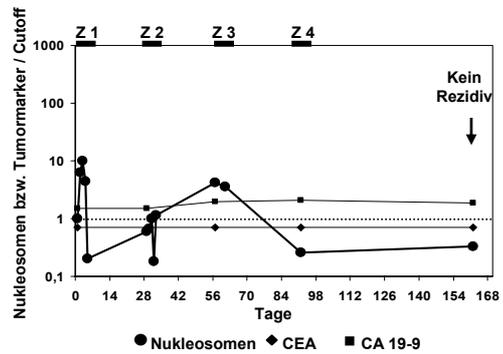
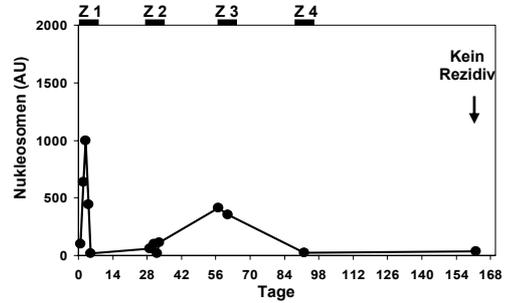
Klinischer Verlauf: kein Rezidiv



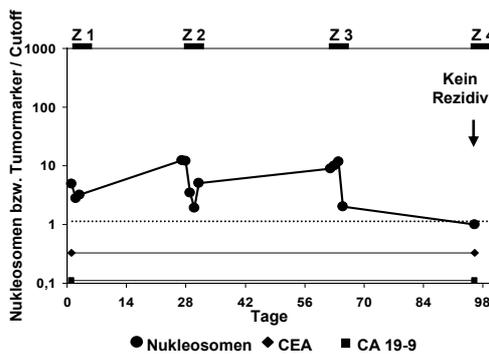
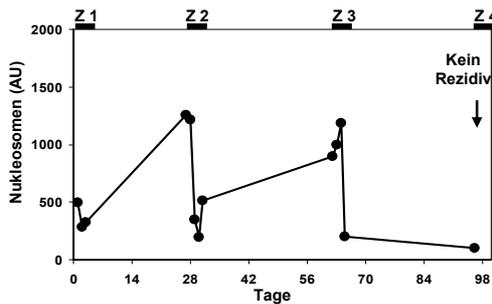
Pat. C33, R.S. 79 J. Sigma-KA T3 N1 M0 G2 Duker C
 ED+OP 8/98 postoperative Chemotherapie
Chemotherapie (4 Zy): 5-Fluoruracil 425 mg/qm i.v. Bolus (Tage 1-5)
 Folsäure 20 mg i.v. Bolus (Tage 1-5)
Klinischer Verlauf: kein Rezidiv



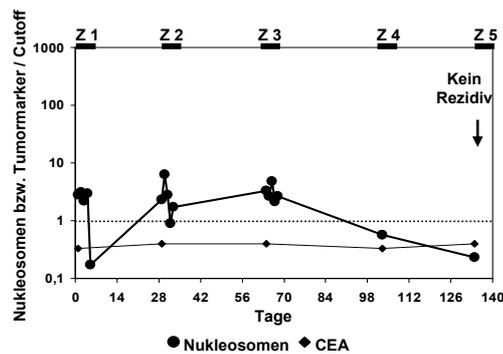
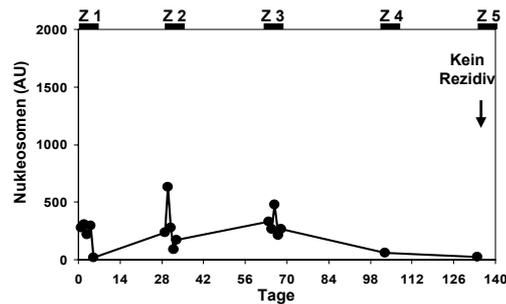
Pat. C34, J.K. 58 J. Sigma-KA T2 N1 M0 G3 Duker C
 ED+OP 10/98 postoperative Chemotherapie
Chemotherapie (4 Zy): 5-Fluoruracil 425 mg/qm i.v. Bolus (Tage 1-5)
 Folsäure 20 mg i.v. Bolus (Tage 1-5)
Klinischer Verlauf: kein Rezidiv



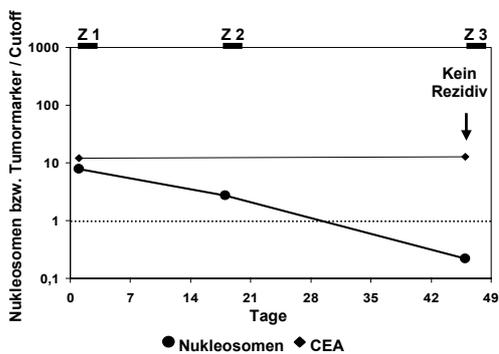
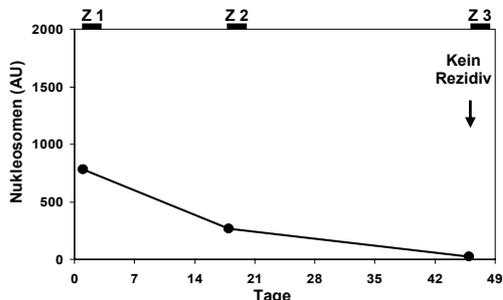
Pat. C35, M.S. 51 J. Colon-KA T3 N1 M0 G3 Duker C
 ED+OP 7/98 postoperative Chemotherapie
Chemotherapie (4 Zy): 5-Fluoruracil 425 mg/qm i.v. Bolus (Tage 1-5)
 Folsäure 20 mg i.v. Bolus (Tage 1-5)
 Panorex 100 mg i.v. (vor 1. und 3. Zyklus)
Klinischer Verlauf: kein Rezidiv



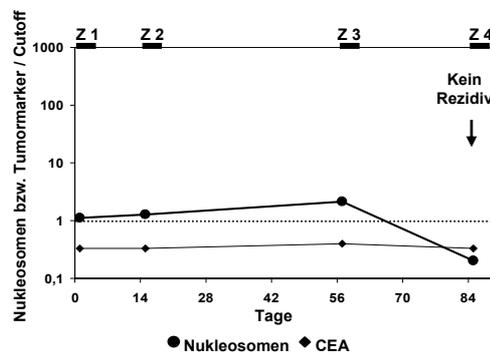
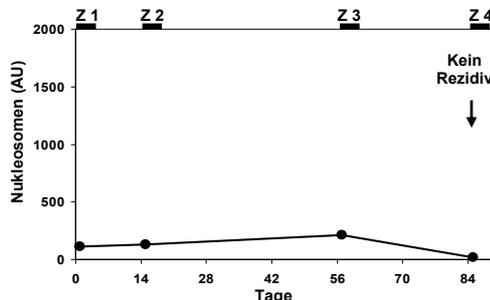
Pat. C36, C.W. 47 J. Colon-KA T3 N2 M0 G3 Duker C
 ED+OP 8/98 postoperative Chemotherapie
Chemotherapie (5 Zy): 5-Fluoruracil 425 mg/qm i.v. Bolus (Tage 1-5)
 Folsäure 20 mg i.v. Bolus (Tage 1-5)
 Panorex 100 mg i.v. (vor 1. und 3. Zyklus)
Klinischer Verlauf: kein Rezidiv



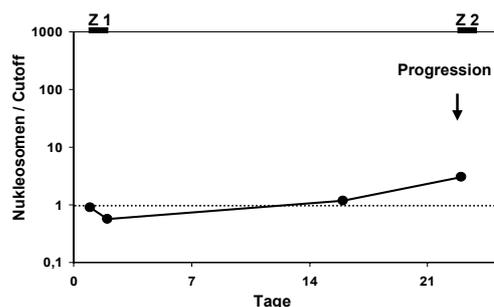
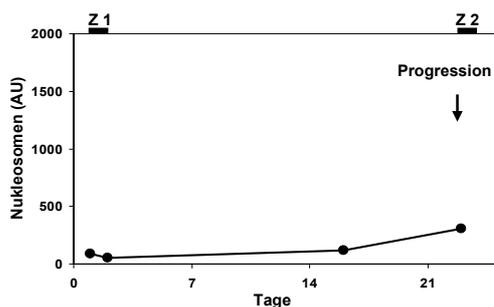
Pat. C37, I.T. 52 J. **Sigma-KA T2 N1 M0 G3 Duker C**
ED+OP 12/98 postoperative Chemotherapie
Chemotherapie (3 Zy): 5-Fluoruracil 425 mg/qm i.v. Bolus (Tage 1-5)
 Folinsäure 20 mg i.v. Bolus (Tage 1-5)
 Panorex 100 mg i.v. (vor 1. und 3. Zyklus)
Klinischer Verlauf: kein Rezidiv



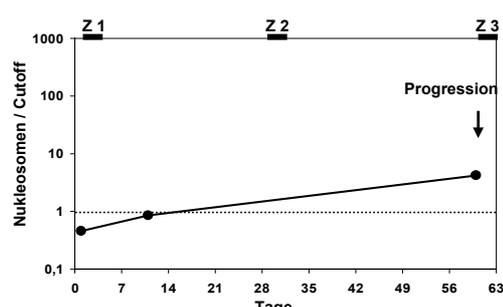
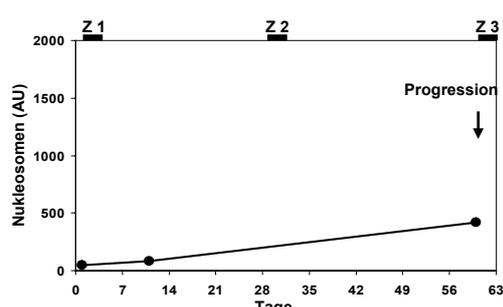
Pat. C38, V.K. 57 J. **Sigma-KA T3 N1 M0 Duker C**
ED+OP 10/98 postoperative Chemotherapie
Chemotherapie (4 Zy): Panorex 100 mg i.v.
Klinischer Verlauf: kein Rezidiv



Pat. C39, K.T. 51 J. **hochmal. NHL II A (Zungengrund)**
ED 11/96 primäre Chemotherapie
Chemotherapie (2 Zy): **COPBLAM-Protokoll**
 Cyclophosphamid 400 mg/qm (Tag 1)
 Vincristin 1 mg/qm (Tag 1)
 Adriamycin 40 mg/qm (Tag 1)
 Procarbazin 100 mg/qm (Tage 1-10)
 Prednison 40 mg/qm (Tage 1-10)
 Bleomycin 15 mg/qm (Tag 14)
Klinischer Verlauf: **Progression**



Pat. C40, G.B. 33 J. **IgG-Plasmozytom III (λ -Typ)**
ED 11/97 Rez 11/98
Chemotherapie (3 Zy): **VID-Protokoll**
 Vincristin 1,6 mg/qm (Tag 1)
 Idarubicin 10 mg/qm (Tage 1-4)
 Dexamethason 40 mg (Tage 1-4, 9-12, 17-20)
Klinischer Verlauf: **Progression**



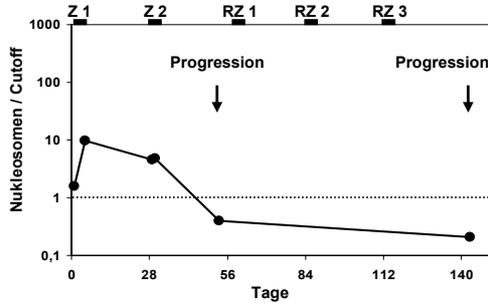
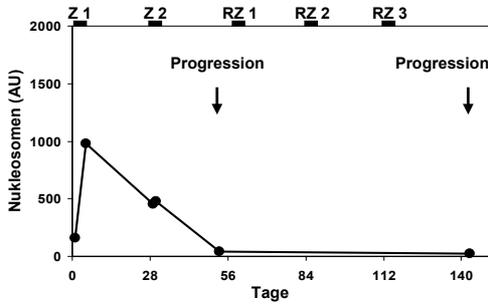
Pat. C41, O.S. 57 J. **niedrig malignes NHL (cc) IV B**
 ED 1/95 multiple Chemotherapien Rez 10/96

Chemotherapie (2 Zy): Fludarabin 50 mg (Tage 1-5)

Klinischer Verlauf: Progression

Rezidivtherapie (3 Zy): CEVD-Protokoll
 CCNU, Etoposid, Vindesin, Dexamethason

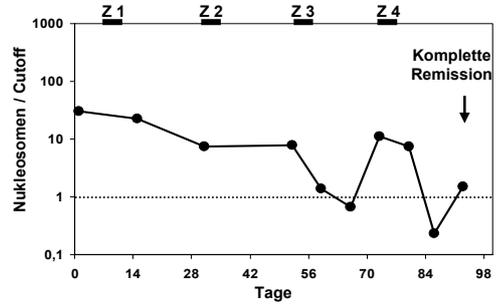
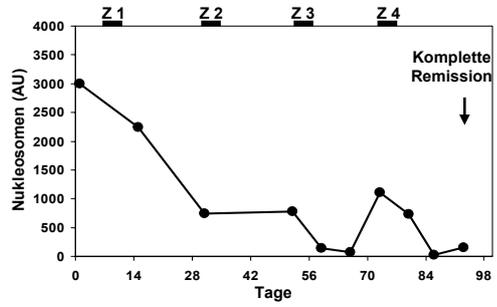
Klinischer Verlauf: Progression



Pat. C42, R.A. 72 J. **hochmalignes NHL (cb) II B + B-CLL**
 ED 9/98 primäre Chemotherapie

Chemotherapie (4 Zy): CHOP-Protokoll
 Cyclophosphamid 750 mg/qm (Tag 1)
 Adriamycin 50 mg/qm (Tag 1)
 Vincristin 1,4 mg/qm (Tag 1)
 Prednison 100 mg/qm (Tage 1-5)

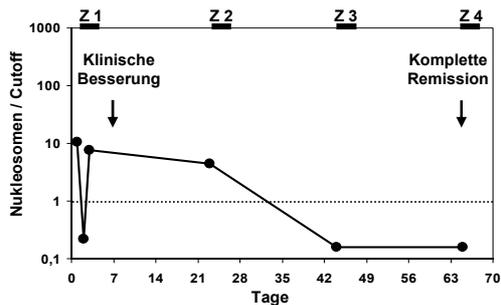
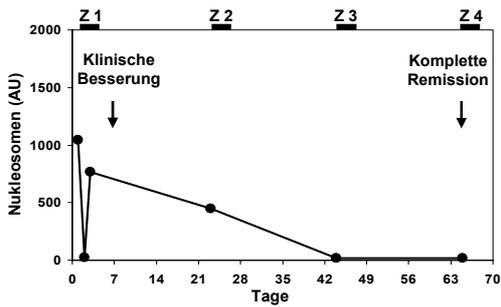
Klinischer Verlauf: Remission



Pat. C43, G.O. 56 J. **hochmal. B-Zell-NHL II B (MALT-Lymphom)**
 ED 9/98 primäre Chemotherapie

Chemotherapie (4 Zy): ABVD-Protokoll
 Adriamycin 25 mg/qm (Tag 1,15)
 Bleomycin 10 mg/qm (Tag 1,15)
 Vinblastin 6 mg/qm (Tag 1,15)
 Dacarbazin 375 mg/qm (Tag 1,15)

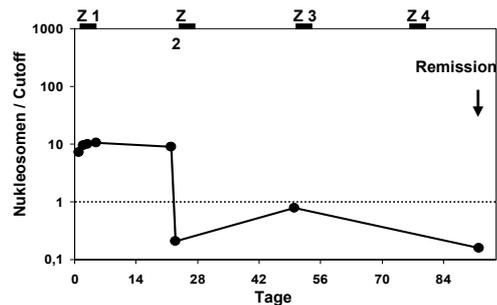
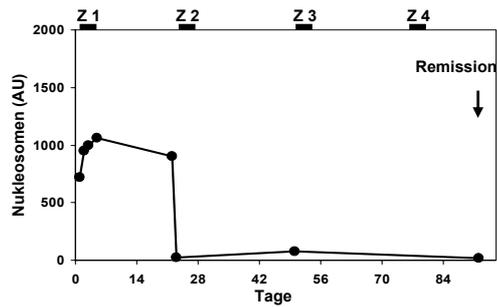
Klinischer Verlauf: Remission



Pat. C44, K.R. 68 J. **niedrig malignes NHL IV B (Immunocytom)**
 ED 9/91 multiple Chemotherapien Rez 1/97

Chemotherapie (4 Zy): COP-Protokoll
 Cyclophosphamid 400 mg/qm (Tage 1-5)
 Vincristin 2 mg/qm (Tag 1)
 Prednison 100 mg/qm (Tage 1-5)

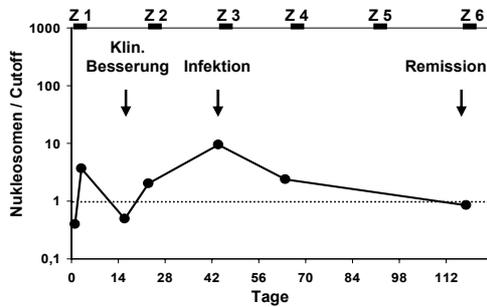
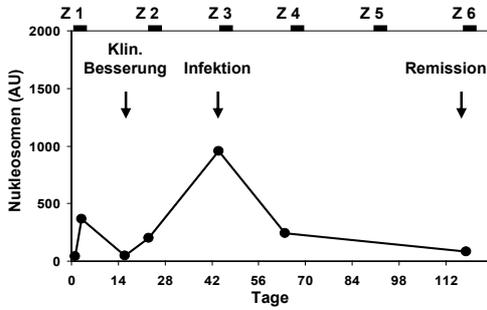
Klinischer Verlauf: Remission



Pat. C45, J.U. 61 J. hochmal. NHL (cb) III B (Tonsillen, cervical, mediastinal, mesenterial, paraaortal, abdominal)
ED 12/96 primäre Chemotherapie

Chemotherapie (6 Zy): COPBLAM-Protokoll
Cyclophosphamid 400 mg/qm (Tag 1)
Vinchristin 1 mg/qm (Tag 1)
Adriamycin 40 mg/qm (Tag 1)
Procarbazin 100 mg/qm (Tage 1-10)
Prednison 40 mg/qm (Tage 1-10)
Bleomycin 15 mg/qm (Tag 14)

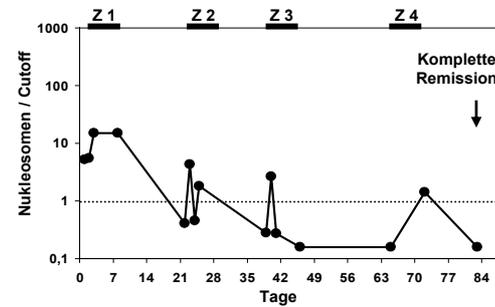
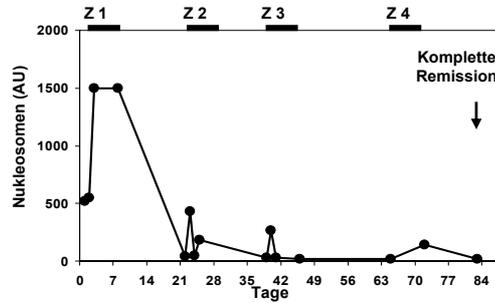
Klinischer Verlauf: Remission



Pat. C46, L.K. 58 J. M. Hodgkin II A
ED 10/98 primäre Chemotherapie

Chemotherapie (4 Zy): BEACOPP-Protokoll
Cyclophosphamid 650 mg/qm (Tag 1)
Adriamycin 25 mg/qm (Tag 1)
Etoposid 100 mg/qm (Tage 1-3)
Procarbazin 100 mg/qm (Tage 1-7)
Prednison 40 mg/qm (Tage 1-14)
Vinchristin 1,4 mg/qm (Tag 8)
Bleomycin 10 mg/qm (Tag 8)

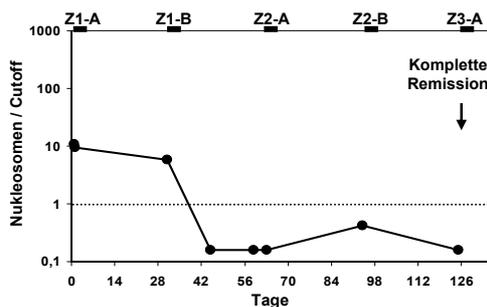
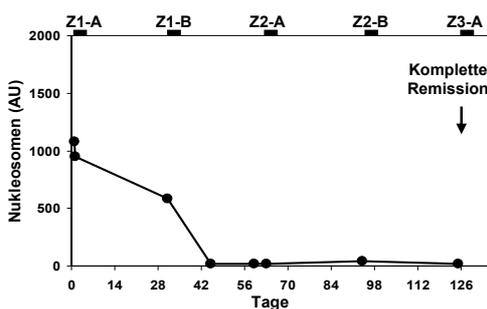
Klinischer Verlauf: Remission



Pat. C47, U.S. 29 J. M. Hodgkin III B
ED 12/96 primäre Chemotherapie

Chemotherapie (3 Zy): COPP ABVD-Protokoll
I: Cyclophosphamid, Vinchristin (je Tage 1+8)
Procarbazin, Prednison (je Tage 1-14)
II: Adriamycin, Bleomycin (Tage 29+43)
Velbe, Dacarbazin (je Tage 1+15)

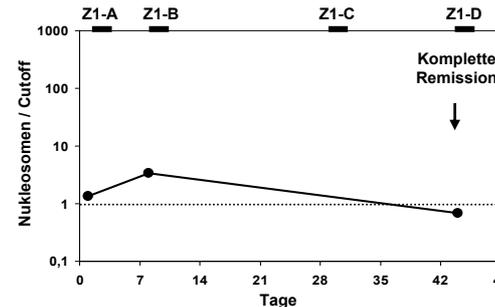
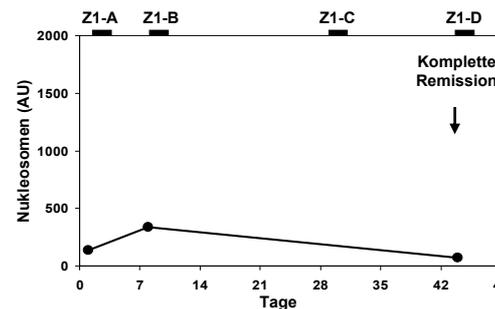
Klinischer Verlauf: Remission



Pat. C48, H.B. 56 J. M. Hodgkin II A
ED 8/98 primäre Chemotherapie

Chemotherapie (2 Zy): COPP ABVD-Protokoll
I: Cyclophosphamid, Vinchristin (je Tage 1+8)
Procarbazin, Prednison (je Tage 1-14)
II: Adriamycin, Bleomycin (Tage 29+43)
Velbe, Dacarbazin (je Tage 1+15)

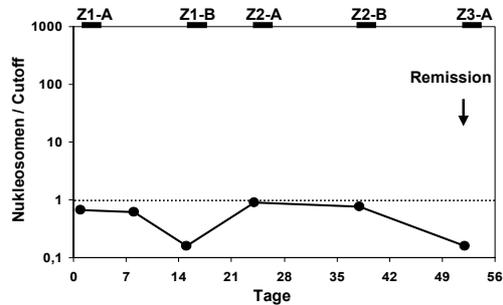
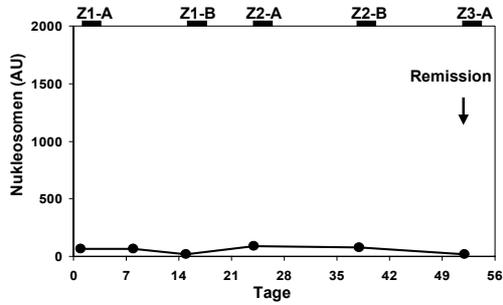
Klinischer Verlauf: Remission



Pat. C49, C.C. 30 J. M. Hodgkin II A
ED 12/98 primäre Chemotherapie

Chemotherapie (3 Zy): **ABVD-Protokoll**
 Adriamycin 25 mg/qm (Tag 1,15)
 Bleomycin 10 mg/qm (Tag 1,15)
 Velbe 6 mg/qm (Tag 1,15)
 Dacarbazin 375 mg/qm (Tage 1,15)

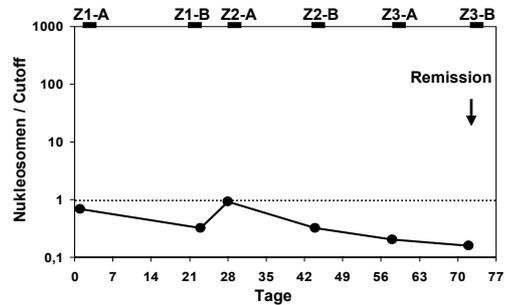
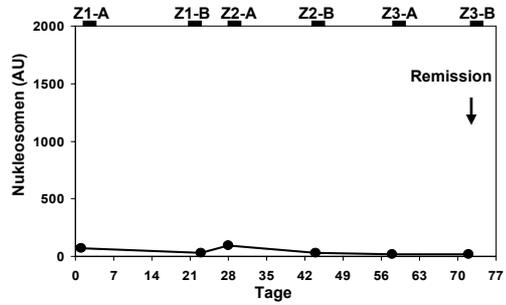
Klinischer Verlauf: **Remission**



Pat. C50, I.H. 27 J. M. Hodgkin II AE
ED 12/98 primäre Chemotherapie

Chemotherapie (3 Zy): **ABVD-Protokoll**
 Adriamycin 25 mg/qm (Tag 1,15)
 Bleomycin 10 mg/qm (Tag 1,15)
 Velbe 6 mg/qm (Tag 1,15)
 Dacarbazin 375 mg/qm (Tage 1,15)

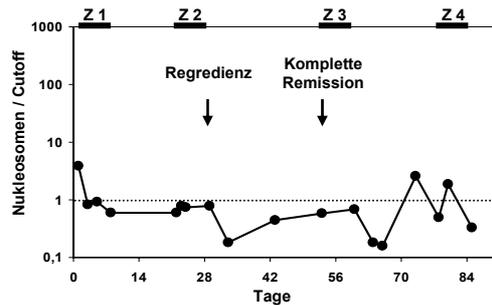
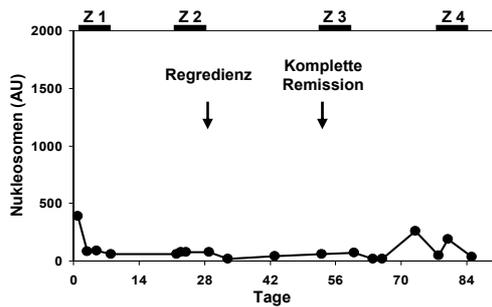
Klinischer Verlauf: **Remission**



Pat. C51, W.M. 56 J. M. Hodgkin II A
ED 10/95 Rez 8/98

Chemotherapie (4 Zy): **BEACOPP-Protokoll**
 Cyclophosphamid 650 mg/qm (Tag 1)
 Adriamycin 25 mg/qm (Tag 1)
 Etoposid 100 mg/qm (Tage 1-3)
 Procarbazin 100 mg/qm (Tage 1-7)
 Prednison 40 mg/qm (Tage 1-14)
 Vincristin 1,4 mg/qm (Tag 8)
 Bleomycin 10 mg/qm (Tag 8)

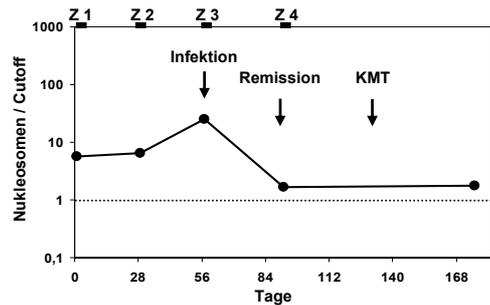
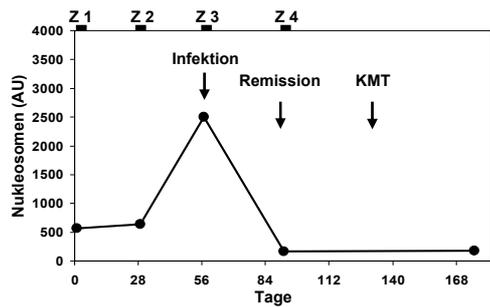
Klinischer Verlauf: **Remission**



Pat. C52, E.S. 44 J. IgG-Plasmozytom III
ED 10/98 primäre Chemotherapie

Chemotherapie (4 Zy): **VID-Protokoll**
 Vincristin 1,6 mg/qm (Tag 1)
 Idarubicin 10 mg/qm (Tage 1-4)
 Dexamethason 40 mg (Tage 1-4, 9-12, 17-20)

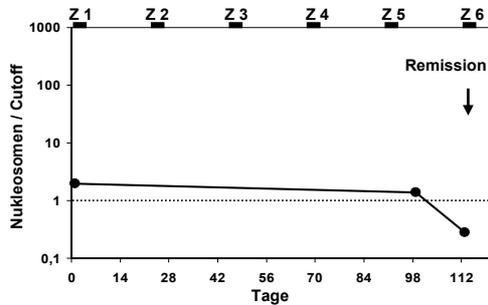
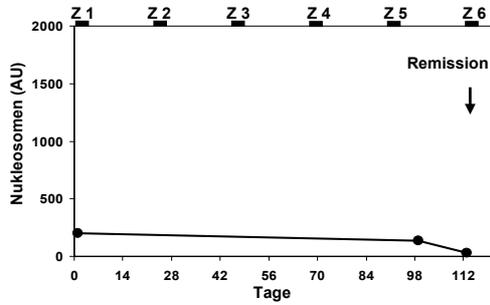
Klinischer Verlauf: **Remission**



Pat. C53, I.M. 64 J. **niedrig mal. NHL (cc-cb) IV** ED 11/95
hochmal. NHL (cb) ED 12/96

Chemotherapie (6 Zy): COPBLAM-Protokoll (prim. Chemotherapie)
 Cyclophosphamid 400 mg/qm (Tag 1)
 Vincristin 1 mg/qm (Tag 1)
 Adriamycin 40 mg/qm (Tag 1)
 Procarbazin 100 mg/qm (Tage 1-10)
 Prednison 40 mg/qm (Tage 1-10)
 Bleomycin 15 mg/qm (Tag 14)

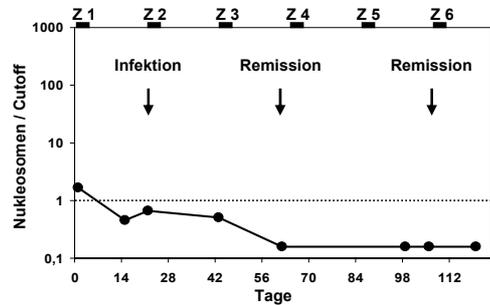
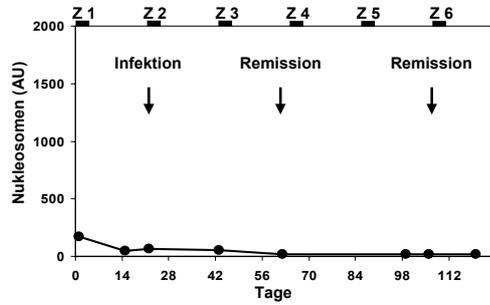
Klinischer Verlauf: Remission



Pat. C54, L.P. 66 J. **hochmal. polymorphzelliges NHL (cb) III** ED 12/96
primäre Chemotherapie

Chemotherapie (6 Zy): COPBLAM-Protokoll
 Cyclophosphamid 400 mg/qm (Tag 1)
 Vincristin 1 mg/qm (Tag 1)
 Adriamycin 40 mg/qm (Tag 1)
 Procarbazin 100 mg/qm (Tage 1-10)
 Prednison 40 mg/qm (Tage 1-10)
 Bleomycin 15 mg/qm (Tag 14)

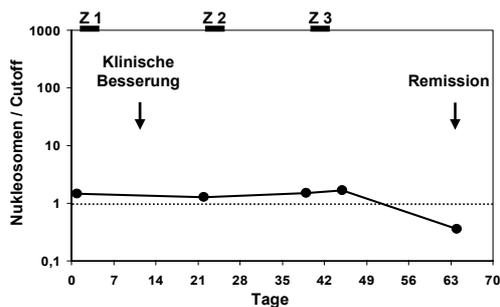
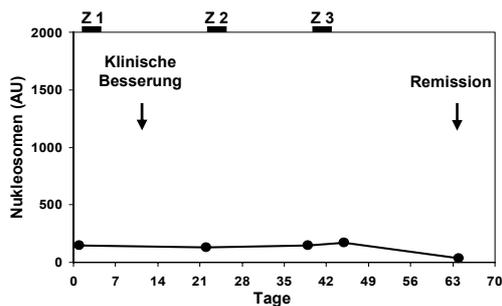
Klinischer Verlauf: Remission



Pat. C55, G.V. 60 J. **hochmalignes NHL (cb) II A** ED 12/98
primäre Chemotherapie

Chemotherapie (3 Zy): CHOP-Protokoll
 Cyclophosphamid 750 mg/qm (Tag 1)
 Adriamycin 50 mg/qm (Tag 1)
 Vincristin 1,4 mg/qm (Tag 1)
 Prednison 100 mg/qm (Tage 1-5)

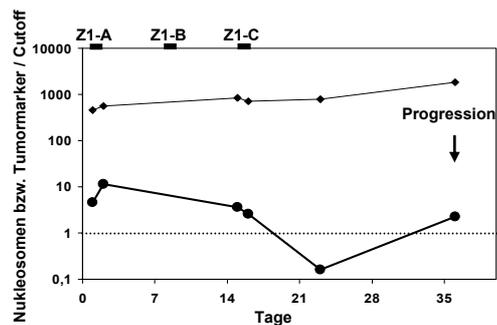
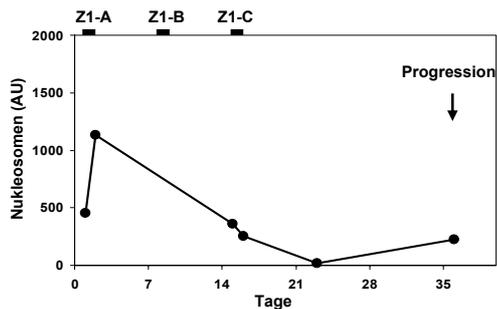
Klinischer Verlauf: Remission



Pat. C56, H.B. 71 J. **Pankreas-KA T3 N1 M1 (Leber) G3 Adeno-CA** ED 5/95
multiple Chemotherapien Rez 10/96

Chemotherapie (1 Zy): Cisplatin 85 mg/qm (Tage 1+15)
 Gemcitabine 1700 mg/qm (Tage 1, 8 und 15)

Klinischer Verlauf: Progression

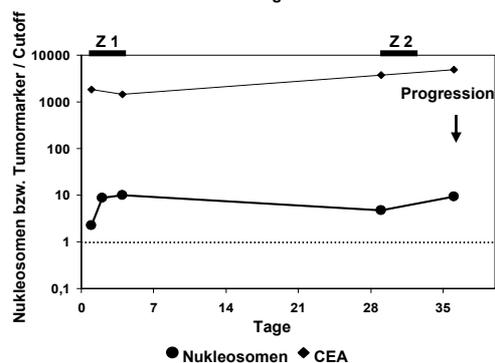
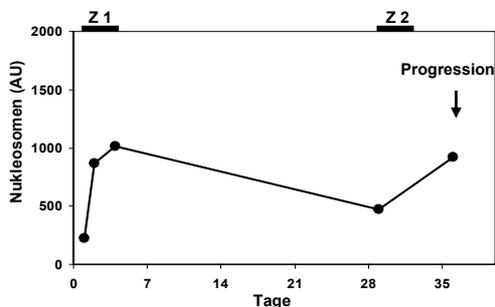


● Nucleosomen ◆ CEA

Pat. C57, H.B. 71 J. Pankreas-KA T3 N1 M1 (Leber) G3 Adeno-CA
ED 5/95 multiple Chemotherapien Rez 12/96

Chemotherapie (2 Zy): 5-Fluoruracil 500 mg/qm (Tage 1-5)
Folinsäure 300 mg Bolus (Tage 1-5)

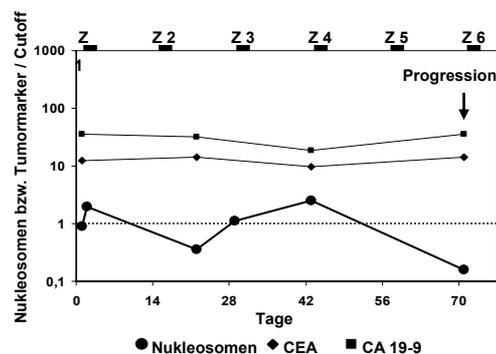
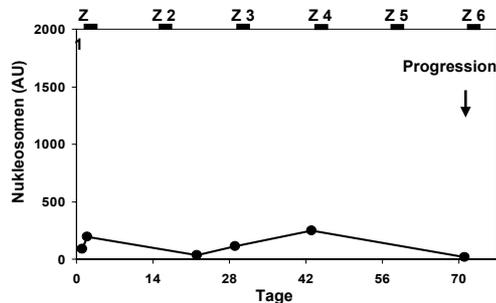
Klinischer Verlauf: Progression



Pat. C58, M.R. 41 J. Pankreas-KA T3 N2 M1 (Leber) G3
ED+OP 6/94 Rez 4/96

Chemotherapie (6 Zy): Cisplatin 85 mg/qm (Tage 1+15)
Gemcitabine 1700 mg/qm (Tage 1, 8 und 15)

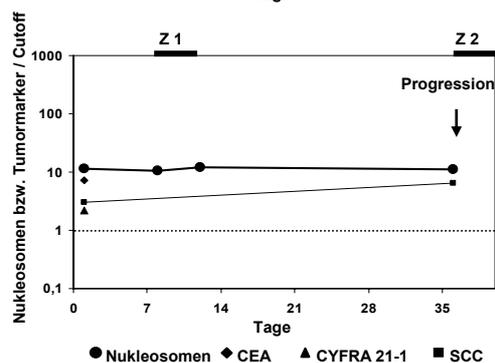
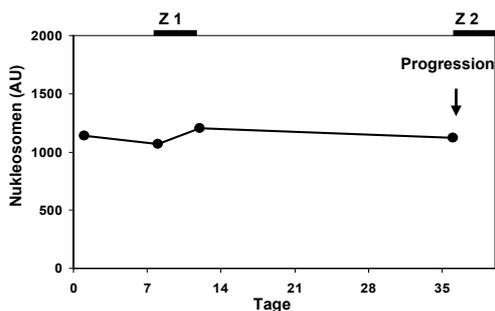
Klinischer Verlauf: Progression



Pat. C59, J.R. 46 J. Ösophagus-KA T4 N0 M1 (multiple) G3
ED 9/98 primäre Chemotherapie

Chemotherapie (2 Zy): Carboplatin 300 mg/qm i.v. (Tag 1)
5-Fluoruracil 1000 mg/qm i.v. (Tage 2-5)

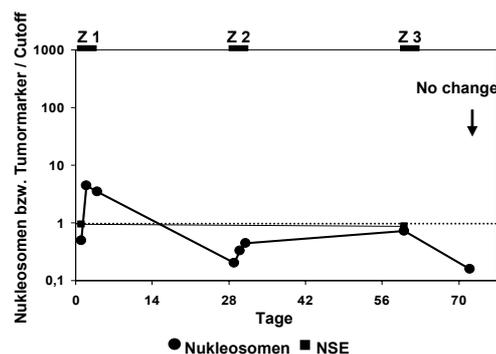
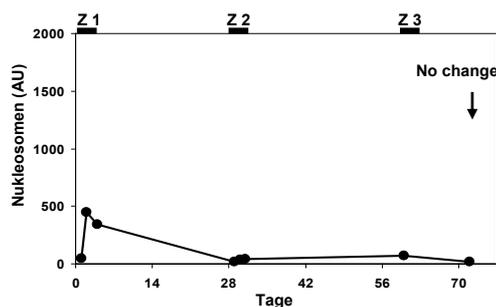
Klinischer Verlauf: Progression



Pat. C60, H.B. 67 J. Leiomyosarkom II (Coindre)
ED+OP 9/94 Radiatio Rez (Lunge) 11/96

Chemotherapie (3 Zy): Ifosfamid 1500 mg/qm (Tage 1-4)
Adriablastin 50 mg/qm (Tag 1)

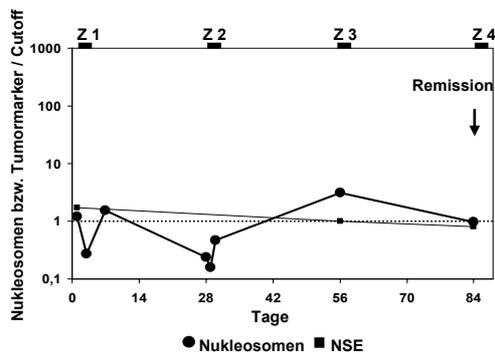
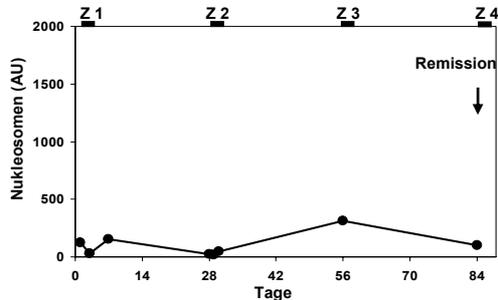
Klinischer Verlauf: keine Befundänderung



Pat. C61, K.N. 65 J. Leiomyosarkom (Duodenom)
ED+OP 7/96 Rez (Leber) 12/96

Chemotherapie (4 Zy): Ifosfamid 1500 mg/qm (Tage 1-4)
Adriblastin 50 mg/qm (Tag 1)

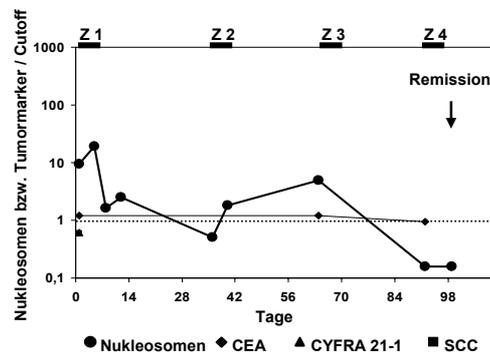
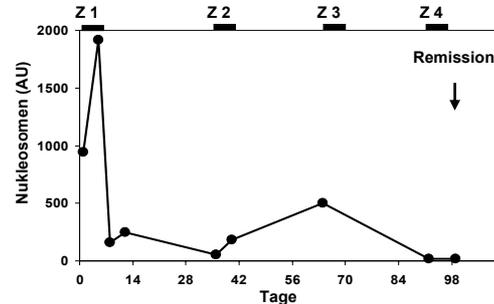
Klinischer Verlauf: Remission



Pat. C62, H.W. 56 J. Ösophagus-KA T4 N3 M1 (multiple) G2
ED 9/98 primäre Chemotherapie

Chemotherapie (4 Zy): Carboplatin 300 mg/qm i.v. (Tag 1)
5-Fluoruracil 1000 mg/qm i.v. (Tage 2-5)

Klinischer Verlauf: Remission



Korrelationen der Nucleosomenkinetik mit dem klinischen Therapieverlauf

Definition des Therapieerfolgs

Die Wirksamkeit der Chemotherapie wurde generell durch Staginguntersuchungen überprüft, die routinemäßig nach zwei bis vier Zyklen oder bei klinischem Verdacht auf eine rasche Verschlechterung der Erkrankung durchgeführt wurden. Dabei kamen bildgebende Verfahren (Computertomographie, Röntgen oder Sonographie) zum Einsatz, durch welche die Veränderungen der Tumorgöße objektiviert wurden. Die Therapieeffizienz wurde gemäß der UICC-Klassifikation nach folgenden Kategorien bewertet:

- Progression: Zunahme der Tumorgöße um mindestens 25%
oder Auftreten von neuen Läsionen
- Remission: Abnahme der Tumorgöße um mindestens 50%
- Komplette Remission: Vollständiges Verschwinden aller Tumormanifestationen
- no change: Zunahme der Tumorgöße um weniger als 25%
oder eine Abnahme um weniger als 50%.

Bei postoperativen Chemotherapien wurde das Ausbleiben eines Rezidivs als anhaltende Remission eingestuft.

Therapieerfolg bei verschiedenen Tumorerkrankungen

Insgesamt wurden bei den 62 untersuchten Personen in 34 Fällen eine Remission (55%), in drei Fällen keine Befundänderung (no change) (5%) und in 25 Fällen eine Progression der Erkrankung (40%) festgestellt.

Während die Untergruppe der Personen mit kolorektalem Karzinom eine ähnliche Verteilung des Therapieerfolgs aufwies, wichen die Gruppen der Personen mit Bronchialkarzinom und sonstigen Karzinomen mit einem höheren Anteil an progredienten Verläufen (57% bis 62%) sowie die Gruppe der Personen mit Lymphomen, die sich durch eine sehr gutes Ansprechen auf Therapie auszeichnen (82% Remissionen), deutlich davon ab.

Die Differenzierung der malignen Erkrankungen hinsichtlich des Krankheitsstadiums zeigte eine wesentlich höhere Remissionsrate bei noch nicht metastasierten Tumoren (87%) im Vergleich zu Tumoren, bei denen bereits eine Fernmetastasierung aufgetreten war (36%).

Auch der Krankheitsstatus vor Beginn der Therapie hatte Einfluss auf das Ansprechen der Therapie: Während Chemotherapien bei Personen mit Tumorrezidiven nur in 39% der Fälle zu einer Remission führten, lag der Erfolgs-Anteil bei primären Therapien neuerkrankter Personen sowie bei adjuvanten Therapien tumorektomierter Personen bei 64%. In der Subgruppe der postoperativen Therapien, die Personen mit kolorektalen Karzinomen betraf, zeigten alle vier mit metastasierten Tumorerkrankungen (Dukes D) einen progredienten Verlauf, alle sieben mit lokal beschränkten Tumoren (Dukes C) hingegen blieben auch nach der Therapie rezidivfrei.

Innerhalb der Gruppe der Personen mit Bronchial-Karzinom war die niedrige Ansprechrate mit auf den hohen Anteil der Personen mit bereits metastasierten Erkrankungen zurückzuführen (92%). Hinsichtlich der histologischen Differenzierung konnte in diesem selektierten Kollektiv beim nicht-kleinzelligen Karzinom immerhin ein Therapieerfolg von 50%, beim kleinzelligen Karzinom nur von 29% verzeichnet werden.

Bei Personen mit kolorektalem Karzinom fiel die hohe Ansprechrate beim Sigma-Karzinom (83%) gegenüber dem Kolon-Karzinom (47%) und dem Rektum-Karzinom (25%) auf. Allerdings war die Patientenzahl für die Untergruppen ungleich und klein. Dies fällt auch ins Gewicht bei der Betrachtung nach Krankheitsstatus, wobei in dieser Subgruppe primäre

Therapien schlechter abschnitten (33% Remissionen) als Rezidivtherapien (46%) und adjuvante Therapien (64%). Bezüglich des Stadiums hoben sich Tumore im Dukes C-Stadium mit einer hohen Remissionsrate von 88% von Dukes D-Tumoren (35%) deutlich ab.

Eine Untergliederung der vielen Formen an lymphatischen Neoplasien wurde auf die großen Gruppen der Hodgkin's- und Non-Hodgkin's-Lymphome beschränkt, die jeweils hohe Ansprechrate von 100% (Morbus Hodgkin) und 82% (Non-Hodgkin's-Lymphom) aufwiesen. Primäre Therapien führten häufiger zu einer Remission (92%) als Rezidivtherapien (50%). Hinsichtlich der Stadieneinteilung waren die Unterschiede geringer.

In der Gruppe sonstiger Tumoren befanden sich ausschließlich Personen in fortgeschrittenen, metastasierten Stadien, was die mangelhafte Therapie-Erfolgsquote erklärt. Pankreastumoren waren mit einer hohen Progressionsrate assoziiert (100%), Ösophagus-Karzinome und Sarkome zeigten immerhin in 50% der Fälle eine Remission. Dabei sprachen Rezidivtherapien wiederum schlechter an (20%) als Primärtherapien (50%).

In der folgenden Tabelle sind die einzelnen Karzinome (KA) und ihre Subtypen (NSCLC = Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, SCLC = Kleinzelliges Bronchialkarzinom, MH = Morbus Hodgkin, NHL = Non Hodgkin's Lymphom, MM = Multiples Myelom), der jeweilige Krankheitsstatus bei Therapiebeginn (prim = primäre Therapie, rez = Rezidivtherapie, pOP = postoperative Therapie), das Stadium (2, 3, 4), die jeweilige Gesamtzahl der Patienten (N) sowie der absolute und prozentuale Anteil der Patienten, deren Ansprechen auf die Therapie einer Remission (Rem), einer stabilen Situation (NC = no change) oder einer Progression (Prog) entsprach, zusammengefasst:

Tabelle 34: Ansprechen der Therapie bei Patienten während Chemotherapie

Tumor	Differential-Diagnose	Status	Stadium	N	Rem	Rem-%	NC	NC-%	Prog	Prog-%	
Alle Tumore	Insgesamt			62	34	54,8	3	4,8	25	40,3	
	Bronchial-KA			13	5	38,5	0	0,0	8	61,5	
	Kolorekt. KA			25	13	52,0	2	8,0	10	40,0	
	Lymphom			17	14	82,4	0	0,0	3	17,6	
	Sonstige KA			7	2	28,6	1	14,3	4	57,1	
		prim			28	18	64,3	0	0,0	10	35,7
		rez			23	9	39,1	3	13,0	11	47,8
		pOP			11	7	63,6	0	0,0	4	36,4
				2	9	88,9	0	0,0	1	11,1	
				3	14	85,7	0	0,0	2	14,3	
			4	39	35,9	3	7,7	22	56,4		
Bronchial-KA	Insgesamt			13	5	38,5	0	0,0	8	61,5	
	NSCLC			6	3	50,0	0	0,0	3	50,0	
	SCLC			7	2	28,6	0	0,0	5	71,4	
		prim			10	4	40,0	0	0,0	6	60,0
		rez			3	1	33,3	0	0,0	2	66,7
				3	1	100,0	0	0,0	0	0,0	
				4	12	33,3	0	0,0	8	66,7	
Kolorektales KA	Insgesamt			25	13	52,0	2	8,0	10	40,0	
	Kolon-KA			15	7	46,7	2	13,3	6	40,0	
	Sigma-KA			6	5	83,3	0	0,0	1	16,7	
	Rektum-KA			4	1	25,0	0	0,0	3	75,0	
		prim			3	1	33,3	0	0,0	2	66,7
		rez			11	5	45,5	2	18,2	4	36,4
		pOP			11	7	63,6	0	0,0	4	36,4
				3	8	87,5	0	0,0	1	12,5	
			4	17	35,3	2	11,8	9	52,9		
Lymphom	Insgesamt			17	14	82,4	0	0,0	3	17,6	
	MH			6	6	100,0	0	0,0	0	0,0	
	NHL			9	8	88,9	0	0,0	1	11,1	
	MM			2	1	50,0	0	0,0	1	50,0	
		prim			13	12	92,3	0	0,0	1	7,7
		rez			4	2	50,0	0	0,0	2	50,0
				2	9	88,9	0	0,0	1	11,1	
				3	5	80,0	0	0,0	1	20,0	
			4	3	66,7	0	0,0	1	33,3		
Sonstige KA	Insgesamt			7	2	28,6	1	14,3	4	57,1	
	Ösophag.-KA			2	1	50,0	0	0,0	1	50,0	
	Pankreas-KA			3	0	0,0	0	0,0	3	100,0	
	Sarkom			2	1	50,0	1	50,0	0	0,0	
		prim			2	1	50,0	0	0,0	1	50,0
		rez			5	1	20,0	1	20,0	3	60,0
				4	7	28,6	1	14,3	4	57,1	

Qualitative Veränderungen der spontanen und Therapie-induzierten Nukleosomenfreisetzung während Chemotherapie

Bei der qualitativ-deskriptiven Analyse zeigten 66% der Patienten während des ersten Zyklus‘ den charakteristischen Anstieg ($\geq 25\%$) der Nukleosomenwerte, auf den meist ein Abfall ($\geq 25\%$) erfolgte. Bei 34% der Patienten fielen die Werte, meist von einem hohen Niveau ausgehend, primär ab und stiegen eventuell später nochmals an. Während die Kombination Anstieg-Abfall häufiger bei Patienten mit Progression (67%) als mit Remission (39%) angetroffen wurde, waren primäre Abfälle öfter bei Patienten mit Remission (33%) als mit Progression (25%) vertreten. Kontinuierliche Anstiege sowie die Kombination Abfall-Anstieg waren weitere, seltenere Ereignisse.

Tabelle 35: Qualitative Veränderungen während des ersten Zyklus‘

Verlauf während der ersten Woche	Gesamt	Remission	No change	Progression
N	32	18	2	12
Anstieg – Abfall (je $\geq 25\%$)	50,0%	38,9%	50,0%	66,7%
Anstieg ($\geq 25\%$)	15,6%	16,7%	50,0%	8,3%
Abfall ($\geq 25\%$)	28,1%	33,3%	0%	25,0%
Abfall – Anstieg (je $\geq 25\%$)	6,3%	11,1%	0%	0%

Der generelle Verlauf der Basiswerte vor den Therapiezyklen konnte in die Kategorien der kontinuierlichen Abfälle und Anstiege (jeweils $\geq 25\%$) sowie in die Kombinationen eines Abfalls nach initialem Anstieg und eines Anstiegs nach initialem Abfall untergliedert werden. In wenigen Fällen traten auch Verläufe mit stark schwankenden Werten oder ohne nennenswerte Veränderungen ($< 25\%$) auf.

Tabelle 36: Qualitative Veränderungen der Basiswerte vor den Therapiezyklen

Genereller Verlauf der Basiswerte	Gesamt	Remission	No change	Progression
N	62	34	3	25
Kontinuierlicher Abfall	43,5%	67,7%	33,3%	12,0%
Abfall nach initialem Anstieg	22,6%	29,4%	33,3%	12,0%
Kontinuierlicher Anstieg	6,5%			16,0%
Anstieg nach initialem Abfall	16,1%			40,0%
gleich bleibend	1,6%			4,0%
Stark schwankend	9,7%	2,9%	33,3%	16,0%

Bei Patienten mit Remission wurden überwiegend kontinuierliche Abfälle (68%) oder ein Abfall nach initialem Anstieg (29%) beobachtet. Bei Patienten mit Progression waren diese Muster nur zu je 12% vertreten. Hingegen dominierten dort kontinuierliche Anstiege (40%), Anstiege nach initialem Abfall (16%) und stark schwankende Werte (16%).

Veränderungen der Werte bei klinischen Nebenwirkungen im Sinne von temporären Erhöhungen wurden bei 6 Patienten mit intermittierenden Infekten festgestellt. Bei einem Patienten blieben die Werte trotz eines Infekts auf niedrigem Niveau.

Parameter für die spontane und Therapie-induzierte Nukleosomenfreisetzung

Der Therapieerfolg bei den untersuchten Personen wurde mit der Kinetik der Nukleosomenfreisetzung in die Zirkulation verglichen. Von Interesse war dabei vor allem die Frage, ob es ein charakteristisches Verlaufsmuster der Nukleosomenkonzentration im Serum bei unterschiedlichem Ansprechen auf die Therapien gab und ob diese Veränderungen quantitativ zu erfassen waren. Für die Beurteilung war die spontane wie auch die Therapie-induzierte Nukleosomenfreisetzung von Bedeutung:

Aufgrund der schnellen Eliminationszeit der Nukleosomen aus dem Blutkreislauf ist nach der mehrwöchigen Therapiepause der Einfluss der vorhergehenden Chemotherapie sehr unwahrscheinlich. Deshalb spiegelt sich die Nukleosomenmenge, die durch die spontane Tumoraktivität freigesetzt wird, in den jeweils vor den Zyklen bestimmten Werten wider. Der Vergleich dieser präzyklischen Basiswerte miteinander und mit den Werten zum Zeitpunkt der Staginguntersuchungen erlaubt somit Rückschlüsse über die verbliebene Restaktivität des Tumors.

Die durch die Chemotherapie induzierte Nukleosomenfreisetzung sowie die effektive Beseitigung aus der Blutzirkulation hingegen kann durch unmittelbar während und nach der Medikamentengabe auftretende Veränderungen der Nukleosomenkonzentration im Serum erfasst werden. Diese beinhalten die Steilheit, Höhe und Latenz des Anstiegs, die Verzögerung und Geschwindigkeit des Abfalls sowie die erreichten Minimalwerte.

Um die vielfältigen Einflussgrößen auf die Nukleosomenkonzentration im Serum zu berücksichtigen und die einzelnen Parameter unter gleichen Bedingungen auf ihre potentielle

Aussagekraft für den Therapieerfolg zu untersuchen, wurde im Rahmen einer „explorativen Datenanalyse“ eine repräsentative Auswahl an Variablen für die spontane und Therapie-induzierten Nukleosomenfreisetzung vorgenommen, die mit dem klinischen Therapieerfolg in Beziehung gesetzt wurden. Im einzelnen setzte sich das Panel an Parametern zusammen aus:

- dem Basiswert vor dem ersten Therapiezyklus (BW-1)
- dem Maximalwert in der ersten Woche nach Therapiebeginn (Max-1)
- dem Verhältnis des Maximalwertes und zum Basiswert 1 ($\text{Max-1} / \text{BW-1}$)
- dem Basiswert vor dem zweiten (BW-2) und dritten Therapiezyklus (BW-3) sowie bei Therapieende bzw. den Staginguntersuchungen (BW-E)
- dem Verhältnis der Basiswerte 2 und 1 ($\text{BW-2} / \text{BW-1}$), 3 und 1 ($\text{BW-3} / \text{BW-1}$) sowie E und 1 ($\text{BW-E} / \text{BW-1}$)
- dem absoluten und prozentualen **täglichen** Abfall von Basiswert 1 zum Endwert oder einem vorher erreichten Minimalwert (Abfall / d bzw. Abfall / d%) (dabei bedeutet ein negativer Abfall einen Anstieg)
- sowie die daraus ableitbare Halbwertszeit (HWZ)

Korrelation der Parameter der spontanen und Therapie-induzierten Nukleosomenfreisetzung mit dem Verlauf bei Patienten unter Chemotherapie

Bei der Analyse aller Tumorarten und Therapiemodalitäten konnten aus der Vielzahl der genannten Parametern einige isoliert werden, die signifikant zwischen der Gruppe der Patienten, die durch die Therapie eine Remission der Erkrankung erzielten, und jener Patientengruppe mit progredientem Verlauf, unterscheiden. Dazu zählen:

- der Basiswert vor dem dritten Therapiezyklus (BW-3)
- das Verhältnis der Basiswerte 3 und 1 ($\text{BW-3} / \text{BW-1}$)
- der Basiswert bei Therapieende bzw. den Staginguntersuchungen (BW-E)
- das Verhältnis der Basiswerte E und 1 ($\text{BW-E} / \text{BW-1}$)
- der absolute tägliche Abfall von Basiswert 1 zum Endwert oder einem vorher erreichten Minimalwert (Abfall / d)
- der prozentuale tägliche Abfall von Basiswert 1 zum Endwert oder einem vorher erreichten Minimalwert (Abfall / d %)
- die Halbwertszeit (HWZ)

In der folgenden Tabelle sind die einzelnen Parameter mit ihren jeweiligen Medianen und Bandbreiten für die Patientengruppen mit Remission, keiner Befundänderung (no change) und Progression nach Therapie aufgeführt mit dem Signifikanzniveau des Diskriminationsvermögens.

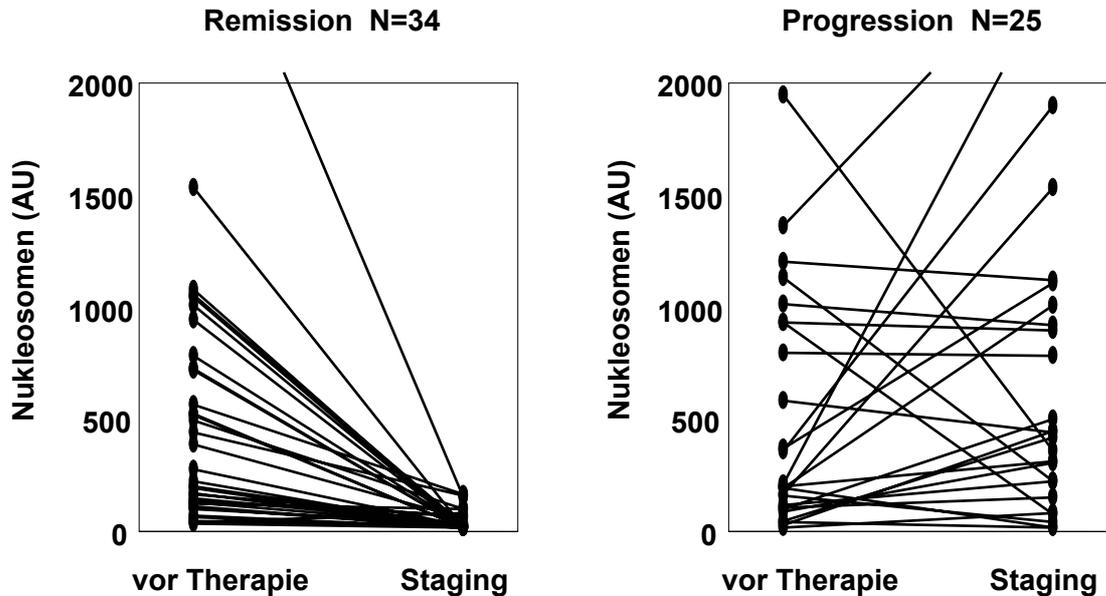
Tabelle 37: Differenzierung des Therapieansprechens durch Nukleosomenvariablen

Variable	Gesamt	Remission	No change	Progression	p-Wert (Trend-Test)
N	62	34	3	25	
BW-1	207 AU (<16-3000)	251 AU (37-3000)	50 AU (49-260)	199 AU (<16-1946)	0,480
Max-1	930 AU (90-3344)	628 AU (130-3000)	719 AU (447-991)	980 AU (90-3344)	0,742
Max-1 / BW-1	133,7% (100-2821%)	108,8% (100-2821%)	1458,2% (894-2022%)	216,7% (100-1507%)	0,329
BW-2	197 AU (<16-2475)	200 AU (<16-1257)	116 AU (20-571)	184 AU (<16-2475)	0,700
BW-2 / BW-1	69,6% (5-1151%)	59,6% (5-500%)	219,6% (40-237%)	80,6% (8-1151%)	0,654
BW-3	100 AU (<16-3601)	74 AU (<16-899)	110 AU (73-140)	197 AU (<16-3601)	0,017
BW-3 / BW-1	59,6% (1-915%)	38,3% (1-265%)	146,0% (54-225%)	158,5% (15-915%)	0,002
BW-E	52 AU (<16-2612)	21 AU (<16-167)	38 AU (<16-242)	421 AU (<16-2612)	<0,0001
BW-E / BW-1	32,7% (1-1151%)	14,5% (1-213%)	77,6% (32-93%)	158,3% (8-1151%)	<0,0001
Abfall / d	1,00 AU/d (-103-31,0)	2,28 AU/d (-0,39-31,0)	0,23 AU/d (0,13-0,48)	-1,43 AU/d (-103-30,6)	<0,0001
Abfall / d %	1,56 %/d (-11,8-11,5)	2,54 %/d (-0,65-11,5)	0,30 %/d (-0,09-1,59)	-0,86 %/d (-11,8-8,65)	<0,0001
HWZ	19,0 d (-531-2594)	24,5 d (-108-263)	229,0 d (43,2-744)	-14,3 d (-531-2594)	<0,0001

Patienten mit Remission hatten dabei signifikant niedrigere Basiswerte vor dem dritten Zyklus und zum Zeitpunkt der Staginguntersuchungen als Patienten mit Progression. Da die Ausgangswerte vor dem ersten Zyklus in etwa vergleichbar waren, ergab sich daraus auch ein prozentual stärkerer Abfall für Patienten mit Remission als für jene mit Progression.

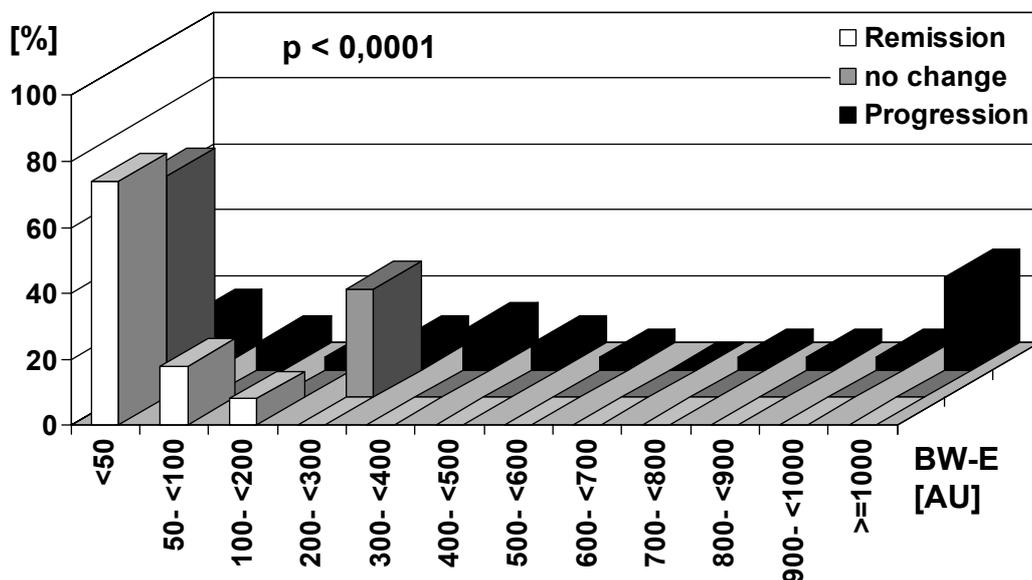
Darüber hinaus stiegen die Basiswerte bei Patienten mit Progression im Mittel und Median an, während sie bei Patienten mit Remission abfielen. Daraus ergibt sich eine kurze Halbwertszeit für letztere; Patienten mit Progression wiesen hingegen eine negative Halbwertszeit auf; Die Werte verdoppelten sich im Median alle 14,3 Tage.

Abbildungen 255 und 256: Nukleosomenkinetiken bei Patienten mit Remission und Progression



Im Detail zeigten 91% der Patienten mit Remission Endwerte (BW-E) unter 100 AU, keiner hatte Werte über 200 AU. Hingegen lagen die Endwerte bei nur 24% der Patienten mit Progression niedriger als 100 AU, bei 72% über 200 AU und noch bei 40% über 500 AU.

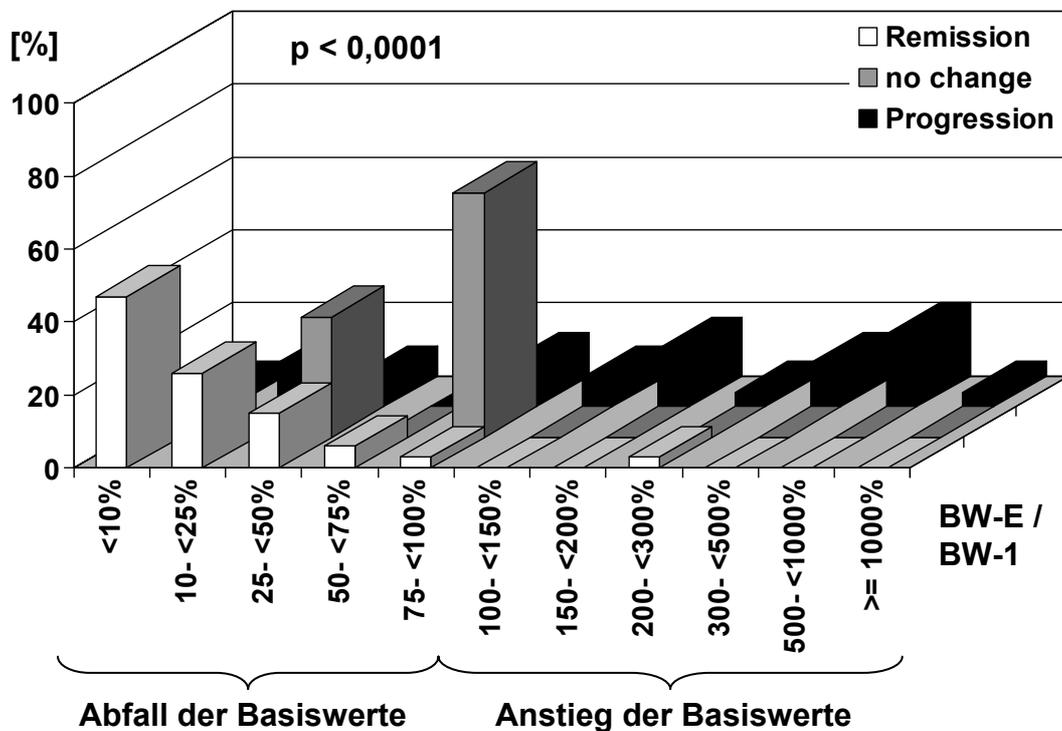
Abbildung 257: Verteilung der Nukleosomen-Endwerte bei Patienten mit Remission, no change und Progression



Bezüglich des prätherapeutischen Ausgangswertes (BW-1) fiel der Endwert (BW-E) bei 88% der Patienten mit Remission um mehr als 50%, bei 47% der Patienten sogar um mehr als 90% ab, während nur in einem Fall (3%) ein Anstieg verzeichnet wurde. Auch bei diesem Patienten fielen die Basiswerte nach einem Anstieg zum zweiten Zyklus hin wieder ab, blieben jedoch noch über dem Ausgangswert zum Zeitpunkt der Staginguntersuchungen.

Hingegen wurde bei nur 36% der Patienten mit Progression ein Abfall der Werte beobachtet, der in 24% der Patienten mehr als 50% betrug. Bei 56% kam es zu einem Anstieg von mehr als 50%, bei 40% gar zu einem mehr als 100%-igen Anstieg der Werte.

Abbildung 258: Verteilung der Kinetik der Nukleosomen-Basiswerte bei Patienten mit Remission, no change und Progression



In der folgenden Tabelle sind jene Nukleosomen-Variablen aufgelistet, die am besten mit dem Therapieverlauf korrelierten und somit zur Therapieeffizienzkontrolle eingesetzt werden können. Als Grenzwerte wurden für den Endwert (BW-E) die 95%-Perzentile gesunder Personen (100 AU), für die Kinetik der Basiswerte (BW-E/BW-1) ein mindestens 50%-iger Abfall bzw. Anstieg herangezogen:

Tabelle 38: Aussagekräftigste Diskriminatoren hinsichtlich des Therapieansprechens

Variable	gesamt	Remission	No change	Progression	p-Wert (X ² -Test)
N	62	34	3	25	
BW-E					<0,0001
≤ 100 AU	39 (63%)	31 (91%)	2 (67%)	6 (24%)	
> 100 AU	23 (37%)	3 (9%)	1 (33%)	19 (76%)	
Kinetik der Basiswerte (BW-E/BW-1)					<0,0001
Abfall ≥ 50%	37 (60%)	30 (88%)	1 (33%)	6 (24%)	
Abfall 0- <50%	8 (13%)	3 (9%)	2 (67%)	3 (12%)	
Anstieg 0- <50%	2 (3%)			2 (8%)	
Anstieg ≥ 50%	15 (24%)	1 (3%)		14 (56%)	

Multivariate Analyse der Nukleosomen-Parameter und klinischer Daten

Eine Abhängigkeitsprüfung unter Einbeziehung der klinischen Daten bestätigte den nahe liegenden Schluss, dass Patienten mit soliden Tumoren ohne Fernmetastasen (Stadium 3) oder Lymphomen ein signifikant ($p = 0,0002$) besseres Ansprechen auf die Therapie aufwiesen als Patienten mit bereits metastasierten, soliden Tumoren (Stadium 4). Deshalb wurden das oben genannte Panel an Parametern nochmals getrennt für die hinsichtlich des Therapieansprechens günstige (Lymphome und Stadium 3; N=26) und ungünstige Gruppe (Stadium 4; N=36) auf ihre Diskriminationsfähigkeit zwischen Patienten mit Remission, keiner Befundänderung und Progression untersucht. Dabei erwiesen sich in beiden Untergruppen als signifikante Diskriminatoren:

- der Basiswert bei Therapieende (Endwert: BW-E)
- das Verhältnis der Basiswerte E und 1 (BW-E / BW-1)
- der absolute tägliche Abfall von Basiswert 1 zum Endwert oder einem vorher erreichten Minimalwert (Abfall / d)
- der prozentuale tägliche Abfall von Basiswert 1 zum Endwert oder einem vorher erreichten Minimalwert (Abfall / d %)

Zusätzlich konnte in der ungünstigen Gruppe das Ansprechen auf Therapie anhand der Halbwertszeit (HWZ) eingeschätzt werden.

Da sich sowohl in der Gesamtheit aller untersuchten Tumore wie auch innerhalb der klinisch günstigen und ungünstigen Untergruppe im besonderen der Endwert (BW-E) sowie die Kinetik der Basiswerte (BW-E/BW-1) für die Unterscheidung zwischen Patienten mit gutem und ungenügenden Ansprechen der Therapie eigneten, wurden diese beiden Variablen mittels des Mantel-Haenszel-Tests hinsichtlich ihrer Unabhängigkeit geprüft; dabei wurden die 3 Patienten mit klinisch gleichbleibender Erkrankung (no change) nicht berücksichtigt.

Wie die folgende Tabelle zeigt, nimmt der Endwert einen signifikanten Einfluss auf das Therapieansprechen unabhängig von der klinischen Gruppierung und der Kinetik der Basiswerte ($p=0,0094$). Dies ist von besonderer Bedeutung in den mittleren (fett gedruckten) Subgruppen: In der klinisch günstigen Subgruppe mit konstanten oder ansteigenden Basiswerten und der klinisch ungünstigen Subgruppe mit abfallenden oder konstanten Basiswerten. Hier sind Endwerte ≤ 100 AU deutlich mit einer Remission assoziiert, Endwerte > 100 AU mit einer Progression, und ermöglichen so eine genauere Diskriminierung.

Hingegen finden sich in der klinisch günstigen Subgruppe mit abfallenden Basiswerten ohnehin fast nur Patienten mit Remission, in der klinisch ungünstigen Subgruppe mit ansteigenden Basiswerten ausschließlich Patienten mit Progression, so dass dort eine weitere Diskriminierung anhand des Endwertes entbehrlich ist.

Tabelle 39: Additive Information des Endwertes zur Kinetik der Basiswerte und der Klinik

Klinische Gruppierung	Kinetik der Basiswerte	Endwert (BW-E)	Anzahl	Remission	Progression
Günstige Gruppe (Stadium 3 + Lymphome)	Abfall $\geq 50\%$	≤ 100 AU	19	18 (95%)	1 (5%)
		> 100 AU	2	2 (100%)	0 (0%)
	Konstant	≤ 100 AU	1	1 (100%)	0 (0%)
		> 100 AU	1	0 (0%)	1 (100%)
	Anstieg $\geq 50\%$	≤ 100 AU	1	1 (100%)	0 (0%)
		> 100 AU	2	0 (0%)	2 (100%)
Ungünstige Gruppe (Stadium 4)	Abfall $\geq 50\%$	≤ 100 AU	13	10 (77%)	3 (23%)
		> 100 AU	3	1 (33%)	2 (67%)
	Konstant	≤ 100 AU	1	1 (100%)	0 (0%)
		> 100 AU	4	0 (0%)	4 (100%)
	Anstieg $\geq 50\%$	≤ 100 AU	2	0 (0%)	2 (100%)
		> 100 AU	10	0 (0%)	10 (100%)
Insgesamt	p = 0,0094		59	34	25

In der Umkehrung hat ebenso die Kinetik der Basiswerte einen signifikanten Einfluss auf das Therapieansprechen unabhängig von der klinischen Gruppierung und dem Endwert ($p=0,0062$). Wie in der folgenden Tabelle ersichtlich ist, tritt wiederum die zusätzliche Diskriminationsfähigkeit am deutlichsten in den mittleren Subgruppen zutage: In der klinisch günstigen Subgruppe mit Endwerten > 100 AU sowie der klinisch ungünstigen Subgruppe mit Endwerten ≤ 100 AU. Hier sind Abfälle der Basiswerte meist mit einer Remission, Anstiege mit einer Progression assoziiert (fett gedruckt).

In der klinisch günstigen Subgruppe mit Endwerten ≤ 100 AU und der klinisch ungünstigen Subgruppe mit Endwerten > 100 AU sammeln sich hingegen bis auf je eine Ausnahme nur Patienten mit Remission bzw. Progression, weshalb eine weitere Unterscheidung hinfällig ist.

Tabelle 40: Additive Information der Kinetik der Basiswerte zum Endwert und der Klinik

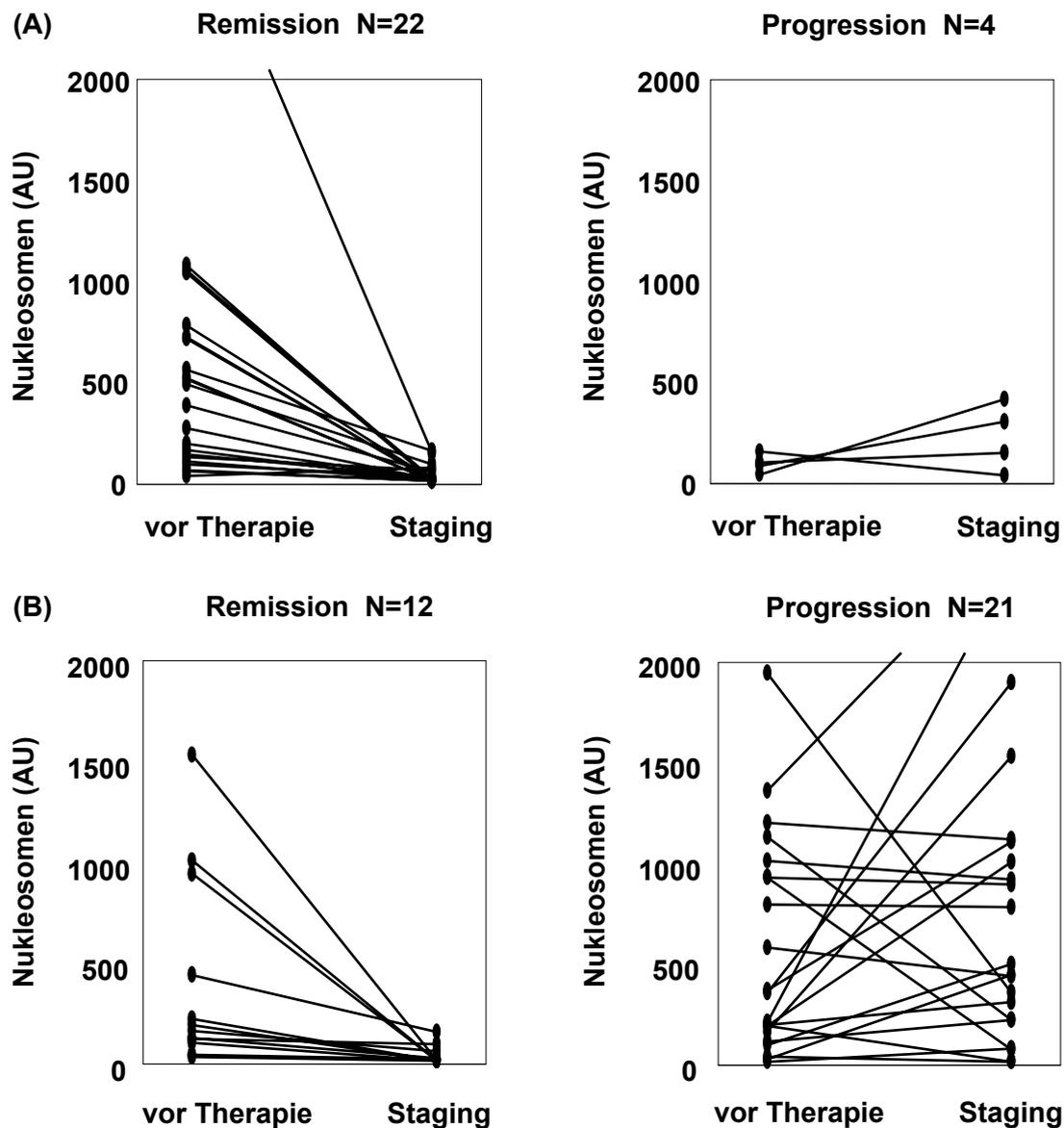
Klinische Gruppierung	Endwert (BW-E)	Kinetik der Basiswerte	Anzahl	Remission	Progression
Günstige Gruppe (Stadium 3 + Lymphome)	≤ 100 AU	Abfall $\geq 50\%$	19	18 (95%)	1 (5%)
		Konstant	1	1 (100%)	0 (0%)
		Anstieg $\geq 50\%$	1	1 (100%)	0 (0%)
	> 100 AU	Abfall $\geq 50\%$	2	2 (100%)	0 (0%)
		Konstant	1	0 (0%)	1 (100%)
		Anstieg $\geq 50\%$	2	0 (0%)	2 (100%)
Ungünstige Gruppe (Stadium 4)	≤ 100 AU	Abfall $\geq 50\%$	13	10 (77%)	3 (23%)
		Konstant	1	1 (100%)	0 (0%)
		Anstieg $\geq 50\%$	2	0 (0%)	2 (100%)
	> 100 AU	Abfall $\geq 50\%$	3	1 (33%)	2 (67%)
		Konstant	4	0 (0%)	4 (100%)
		Anstieg $\geq 50\%$	10	0 (0%)	10 (100%)
Insgesamt	p = 0,0062		59	34	25

Auf ähnliche Weise wurde anhand des Mantel-Haenszel-Tests die Unabhängigkeit der Aussagekraft des absoluten und prozentualen **täglichen** Abfalls der Nukleosomenwerte von der klinischen Gruppierung und dem Endwert untersucht.

Dabei zeigte sich, dass sowohl der absolute tägliche Abfall der Werte signifikanten Einfluss auf das Therapieansprechen unabhängig von der klinischen Gruppierung und dem Endwert hat ($p=0,0055$) wie auch in der Umkehrung der Einfluss des Endwert unabhängig von der klinischen Gruppierung und dem absoluten täglichen Abfall signifikant bleibt ($p<0,0001$).

Der prozentuale tägliche Abfall der Werte hatte in der Unabhängigkeitsprüfung von der klinischen Gruppierung und dem Endwert keinen zusätzlichen signifikanten Einfluss auf das Therapieansprechen ($p=0,0945$). Jedoch wurde in der Umkehrung ein signifikanter Einfluss des Endwertes unabhängig von der klinischen Gruppierung und dem prozentualen täglichen Abfall festgestellt ($p=0,0029$).

Zur Veranschaulichung sind in den folgenden Grafiken die Anfangs- und Endwerte sowie die Kinetik der Basiswerte für die klinisch günstigere (A: Stadium 3 und Lymphome) und ungünstigere Gruppe (B: Stadium 4) dargestellt.



Abbildungen 259 – 262: Nukleosomenkinetiken bei Patienten mit Remission und Progression für die klinische günstige (A) und ungünstige Gruppe (B)

5.3.6 Kinetik Tumor-assoziiertes Antigen in Korrelation zur Nukleosomenkinetik bei Patienten mit soliden, malignen Tumoren während Chemotherapie

Zur Kontrolle des biochemischen Ansprechens einer Therapie werden auch etablierte Tumor-assoziierte Antigene eingesetzt. Im besonderen eignen sie sich für die Verlaufsbeobachtung von Chemotherapien, die sich in der Regel über mehrere Monate erstrecken. Bei dieser Therapieform ist der Erfolg ansonsten durch klinisch erfassbare Veränderungen oder durch bildgebende Verfahren objektivierbar, die in größeren Zeitintervallen zur Anwendung kommen. Allerdings spiegeln diese die Effekte der Therapie oft nur grob und verzögert wider. Tumor-assoziierte Antigene hingegen zeigen häufig schon früh die biochemische Therapie-Wirksamkeit und ebenso eine nachlassende Effizienz an. Um ihre Kinetik genau zu erfassen, werden sie idealerweise vor jedem Therapiezyklus kontrolliert.

Auswahl der Tumor-assoziierten Antigene für die Verlaufsbeobachtung

Bei den hier angestellten Untersuchungen wurden parallel zu den Nukleosomenwerten auch Tumor-assoziierte Antigene im Verlauf der Chemotherapien bei Patienten mit soliden, malignen Tumoren bestimmt. Nach Möglichkeit erfolgten diese Bestimmungen vor jedem Therapiezyklus, zumindest aber zu den Staginguntersuchungen. Für jede Tumorart oder die histologischen Subtypen wurden die jeweils spezifischen Parameter untersucht:

- beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom: CEA, CYFRA 21-1
- beim kleinzelligen Bronchialkarzinom: CEA, NSE, ProGRP
- beim kolorektalen Karzinom: CEA, CA 19-9
- beim Pankreaskarzinom: CA 19-9, CEA
- beim Ösophaguskarzinom: CEA, CYFRA 21-1, SCC
- beim Sarkom: NSE

Häufig wurde bei einem Patienten nur eines der Tumor-assoziierten Antigene exprimiert oder freigesetzt. Dieser so genannte „führende Parameter“ wurde für die weitere Therapieeffizienzkontrolle herangezogen. In einigen Fällen waren allerdings die Serumkonzentrationen von mehreren Tumor-assoziierten Antigenen erhöht. Dann wurden alle betreffende Parameter während des Therapieverlaufs verfolgt. Für die Korrelation mit dem Therapieerfolg wurde der am stärksten exprimierte oder freigesetzte Marker ausgewählt.

Interpretation der Verläufe Tumor-assoziiertes Antigen während der Therapie

In der Praxis richtet sich die individuelle Bewertung des biochemischen Ansprechens der Therapie nach den Veränderungen des führenden Parameters oder dem Muster der Veränderungen mehrerer Parameter. Für die Interpretation spielt der Grad des Abfalls oder Anstiegs einzelner Marker eine Rolle, ferner die Geschwindigkeit des Abfalls oder Anstiegs, die aufgrund der unterschiedlichen Halbwertszeiten naturgemäß variiert, außerdem Veränderungen in der Dynamik wie eine Ab- oder Zunahme der Abfallgeschwindigkeit.

Bei gleichzeitiger Betrachtung mehrerer Parameter ergibt sich ein komplexes Bild vieler relevanter Einzelbeobachtungen, bei deren integrativen Beurteilung die biochemischen und messtechnischen Hintergründe der untersuchten Parameter sowie der klinische Kontext zu berücksichtigen sind.

Für die hier angestellte, vergleichende Beurteilung des Therapieerfolgs anhand Tumor-assoziiertes Antigen wurden einige Prämissen gewählt, um eine Vergleichbarkeit der individuellen Verläufe von Patienten mit unterschiedlichen Tumorarten in unterschiedlichen Stadien, in unterschiedlichem Krankheitsstatus bei unterschiedlichen Therapiemodalitäten, die mit unterschiedlichen Parametern überwacht wurden, zu gewährleisten:

- Für die Bewertung wurde nur der führende Parameter herangezogen.
- Dieser Parameter wurde normiert, indem er durch seinen Grenzwert dividiert wurde; der Grenzwert wurde anhand der 95%-Perzentile gesunder Personen bestimmt.
- Das normierte Tumor-assoziiertes Antigen wurde zu definierten Zeitpunkten betrachtet:
 - vor dem ersten (TA-1), zweiten (TA-2) und dritten Zyklus (TA-3) sowie zum Zeitpunkt der Staginguntersuchungen (TA-S)
- Außerdem wurde der jeweilige Grad der Veränderung ausgewertet:
 - das Verhältnis der Werte vor Zyklus 2 und 1 (TA-2 / TA-1), 3 und 1 (TA-3 / TA-1) sowie bei den Staginguntersuchungen und vor Zyklus 1 (TA-S / TA-1).
 - der absolute und prozentuale **tägliche** Abfall vom ersten Zyklus zum Staging (Abfall / d bzw. Abfall / d%)

Korrelation der Kinetik Tumor-assoziiertes Antigen mit dem klinischen Ansprechen auf Chemotherapie bei Patienten mit soliden, malignen Tumoren

Als führende Parameter wurden in 27 Fällen CEA, in zwei Fällen CYFRA 21-1, in sechs Fällen ProGRP, in fünf Fällen CA 19-9, in zwei Fällen NSE und in einem Fall SCC ausgewählt. Bei zwei Patienten mit Bronchial-Karzinom lag nur ein prätherapeutischer Wert vor. Deshalb wurden sie bei den Kinetikauswertungen nicht berücksichtigt. Ebenso konnten Patienten mit Lymphomen wegen fehlender Bestimmungen geeigneter Tumormarker nicht in die Auswertungen einbezogen werden. Somit wurde im Folgenden eine Subgruppe (N=43) der Patienten mit malignen Tumoren während Chemotherapie evaluiert.

Die normierten Tumor-assoziierten Antigene vor dem ersten (TA-1), zweiten (TA-2) und dritten Zyklus (TA-3) sowie vor den Staging-Untersuchungen (TA-S) lagen bei Patienten mit Remission im Median deutlich niedriger als bei Patienten mit Progression. Die prozentualen Veränderungen (TA-2/TA-1, TA-3/TA-1, TA-S/TA-1) zeigten für Patienten mit Remission im Verlauf tendenziell eine Abnahme (= <100%), für Patienten mit Progression eher eine Zunahme der Werte (= >100%). In der folgenden Tabelle sind die Mediane, Bandbreiten und das jeweilige Signifikanzniveau für die einzelnen Patientengruppen und Parameter aufgelistet:

Tabelle 41: Differenzierung des Therapieansprechens durch Tumor-assoziierte Antigene

Variable	Gesamt	Remission	No change	Progression	p-Wert (Trend-Test)
N	43	18	3	22	
TA-1	21,8 (0,3-7776)	2,4 (0,3-7776)	3,9 (1,0-16,7)	42,0 (1,2-2481)	0,003
TA-2	26,8 (0,5-6037)	5,1 (0,5-778)	13,9 (2,9-24,8)	60,3 (6,6-6037)	<0,001
TA-2 / TA-1	108,5% (4,3-243%)	57,8% (4,3-133%)	111,4% (74,4-148%)	154,6% (4,9-243%)	0,002
TA-3	5,7 (0,3-794)	1,7 (0,3-244)	2,2 (0,9-12,8)	21,3 (0,6-794)	0,007
TA-3 / TA-1	94,3% (0,2-557%)	100,0% (0,8-133%)	76,7% (56,4-90,0%)	97,7% (0,2-557%)	0,897
TA-S	7,7 (0,2-6037)	1,0 (0,2-79,3)	1,1 (0,9-7,2)	56,5 (0,6-6037)	<0,0001
TA-S / TA-1	100,0% (0,2-557%)	83,6% (0,3-133%)	43,1% (28,2-90,0%)	139,9% (0,2-557%)	0,002
Abfall / d	0,0 AU/d (-127-109)	0,002 AU/d (-0,055-109)	0,02 AU/d (0,001-0,12)	-0,198 AU/d (-127-3,13)	0,005
Abfall / d %	0,0 %/d (-4,02-7,09)	0,11 %/d (-0,22-7,09)	0,75 %/d (0,15-1,09)	-0,41 %/d (-4,02-6,61)	<0,001

Da Patienten mit soliden Tumoren ohne Fernmetastasen (Stadium 3; N=8) ein signifikant besseres Ansprechen auf die Therapie aufwiesen als Patienten mit bereits metastasierten, soliden Tumoren (Stadium 4; N=35), wurden die Tumor-assoziierten Antigene getrennt in beiden Gruppen auf ihre Diskrimierungsfähigkeit zwischen Patienten mit Remission, keiner Befundänderung und Progression untersucht. Dabei erwiesen sich in der hinsichtlich des Therapieansprechens ungünstigen Gruppe als signifikante Diskriminatoren:

- der Wert vor dem zweiten Zyklus (TA-2)
- das Verhältnis der Werte vor Zyklus 2 und 1 (TA-2 / TA-1)
- der Wert zum Zeitpunkt der Staginguntersuchungen (TA-S)
- das Verhältnis der Werte beim Staging und vor Zyklus 1 (TA-S / TA-1).
- der absolute tägliche Abfall vom ersten Zyklus zum Staging (Abfall / d)
- der prozentuale tägliche Abfall vom ersten Zyklus zum Staging (Abfall / d%)

In der günstigen Gruppe war nur ein Patient progredient.

Vergleich der Nukleosomen-Kinetik im Therapieverlauf mit der Kinetik Tumor-assoziiertes Antigene

Um zu überprüfen, ob bei Patienten mit soliden Tumoren während Chemotherapie der Therapieerfolg durch Nukleosomen oder Tumor-assoziierte Antigenen besser wiedergegeben würde und wie die beiden Parameter miteinander korrelierten, wurden die Kinetiken der Nukleosomen und der „führenden“ Tumor-assoziierten Antigene von Therapiebeginn bis zu den Staginguntersuchungen herangezogen und miteinander verglichen. Als Messgröße diente der Quotient aus dem Wert zum Zeitpunkt der Staginguntersuchungen und dem prätherapeutischen Basiswert (BW-E / BW-1 (Nukleosomen) und TA-S / TA-1 (Tumormarker)).

Ein Anstieg oder Abfall wurde erst dann angenommen, wenn sich die Werte vom Ausgangsniveau um mehr als 50% entfernten; eine derartige Veränderung der Werte sollte außerhalb der Messschwankungen liegen und als Kriterium für eine potentielle Therapieentscheidung herangezogen werden können. Die Bewertung des Therapieerfolgs wurde wie zuvor anhand morphologischer Veränderungen in den bildgebenden Verfahren der Staginguntersuchungen vorgenommen.

Bei den 22 Patienten mit einer Progression der Erkrankung stiegen die Nukleosomenwerte in 55% der Fälle an, etwas häufiger als die der „führenden“ Tumor-assoziierten Antigene (50%). Gleichsinnige Anstiege waren bei insgesamt 32% der Patienten zu verzeichnen.

Tabelle 42: Korrelation von Nukleosomen und Tumor-assoziierten Antigenen bei Progression

Progression	Nukleosomen			gesamt	
	Abfall \geq 50%	gleich bleibend	Anstieg \geq 50%		
führender Tumormarker	Abfall \geq 50%	0 0,0%	1 4,6%	1 4,6%	2 9,1%
	gleich bleibend	4 18,2%	1 4,6%	4 18,2%	9 40,9%
	Anstieg \geq 50%	1 4,6%	3 13,6%	7 31,8%	11 50,0%
	gesamt	5 22,7%	5 22,7%	12 54,6%	22 100,0%

Falsch-negative Abfälle wurden für Nukleosomen in 23%, für die Tumor-assoziierten Antigene in 9% der Fälle beobachtet. Bei keinem Patienten sanken trotz progredienten Verlaufs beide Parameter ab. Bemerkenswert ist die geringe Häufigkeit diskrepanter Ergebnisse: Nur einmal (5%) wurde ein Nukleosomenanstieg bei einem Tumormarkerabfall, ebenso oft (5%) ein Tumormarkeranstieg bei einem Nukleosomenrückgang gesehen.

Bei den 18 Patienten mit einer Remission der Tumorerkrankung ergab sich folgendes Bild:

Tabelle 43: Korrelation von Nukleosomen und Tumor-assoziierten Antigenen bei Remission

Remission	Nukleosomen			Gesamt	
	Abfall \geq 50%	gleich bleibend	Anstieg \geq 50%		
führender Tumormarker	Abfall \geq 50%	5 27,8%	1 5,6%	0 0,0%	6 33,3%
	gleich bleibend	12 66,7%	0 0,0%	0 0,0%	12 66,7%
	Anstieg \geq 50%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%
	gesamt	17 94,4%	1 5,6%	0 0,0%	18 100,0%

Bis auf einen Patienten, bei dem die Werte stagnierten, kam es bei allen Patienten zu einem Abfall der Nukleosomenkonzentration (94%). Hingegen blieben die Werte des „führenden“ Tumormarkers bei 12 Patienten auf dem gleichen Niveau (67%) und fielen in nur 6 Fällen ab (33%). Dies ist mitunter auf mehrere Patienten mit kolorektalem Karzinom zurückzuführen, die schon prätherapeutisch sehr niedrige Tumormarkerwerte hatten und während der Therapie auf diesem niedrigen Niveau verharrten.

Hinsichtlich gleichsinniger Werteabfälle ergibt sich dadurch eine geringere Übereinstimmung (28%); werden jedoch die gleich bleibenden Werte bei beiden Parametern als bedingt richtungsweisend hinzugezählt, werden damit alle Patienten erfasst. Im Umkehrschluss wurde bei keinem Patienten mit einer Remission ein falsch-positiver Anstieg der Nukleosomen oder der Tumormarker verzeichnet. Ebenso wenig wurden diskrepante Verläufe entdeckt.

Schließlich wurde bei den drei Patienten mit gleichbleibender Tumorerkrankung in zwei Fällen ein Abfall der Tumormarkerwerte bei unveränderten Nukleosomenwerten und in einem Fall ein Nukleosomenrückgang bei stagnierenden Tumormarkerwerten beobachtet.

Tabelle 44: Korrelation von Nukleosomen und Tumor-assoziierten Antigenen bei No change

		Nukleosomen			Gesamt
		Abfall \geq 50%	gleich bleibend	Anstieg \geq 50%	
führender Tumormarker	No change				
	Abfall \geq 50%	0 0,0%	2 66,7%	0 0,0%	2 66,7%
	gleich bleibend	1 33,3%	0 0,0%	0 0,0%	1 33,3%
	Anstieg \geq 50%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%
gesamt		1 33,3%	2 66,7%	0 0,0%	3 100,0%

Prädiktion der Therapieeffizienz durch die Kinetik von Nukleosomen und Tumor-assoziierten Antigenen bei Patienten mit malignen Tumoren während Chemotherapie

Die eigentliche Bedeutung der Bestimmung von Kinetiken biochemischer Parameter während Therapie liegt in der Prädiktion der Therapieeffizienz zu einem gegebenen Zeitpunkt. Kann das Ansprechen der Therapie präzise vorausgesagt, könnten weitere Staginguntersuchungen eingespart oder aufgeschoben werden. Eine entscheidende Rolle für die Vorhersagequalität spielen dabei die Häufigkeit von falsch-negativen oder falsch-positiven Ergebnissen.

Nach Möglichkeit wird bei der Durchführung der Chemotherapie das Erreichen einer Remission als Therapieziel angestrebt. Deshalb wurde im Folgenden die Gruppe der auf die Therapie ansprechenden Patienten der Gruppe von Patienten mit ungenügendem Therapieerfolg gegenübergestellt, zu welcher die Patienten mit gleich bleibenden und progredienten Verläufen zusammengefasst wurden.

Bei alleiniger Betrachtung der Nukleosomen-Kinetik wurde der Verlauf der Tumorerkrankung in 68 % der Fälle richtig erkannt. Diese hohe Rate ist besonders auf die hohe Trefferquote bei ansteigenden Nukleosomenwerten zurückzuführen, die in 100 % mit einer Progression assoziiert waren. Somit wurden bei den untersuchten Patienten keine falsch-positiven Resultate beobachtet. Hingegen deutete eine rückläufige Kinetik nur in 74 % eine Remission unter Therapie an; dies entspricht einer Quote von 26 % falsch-negativer Ergebnisse. Insgesamt war das Diskriminationsvermögen durch die Nukleosomenkinetik hochsignifikant ($p < 0,0001$).

Tabelle 45: Korrelation von klinischer Therapieeffizienz und Nukleosomen

		Klinische Therapieeffizienz			gesamt
		Remission	No change	Progression	
Nukleosomen	Abfall \geq 50%	17 39,6%	1 2,3%	5 11,6%	23 53,5%
	gleich bleibend	1 2,3%	2 4,7%	5 11,6%	8 18,6%
	Anstieg \geq 50%	0 0,0%	0 0,0%	12 27,9%	12 27,9%
gesamt	18 41,9%	3 7,0%	22 51,2%	43 100,0%	

Veränderungen der Wertlagen Tumor-assoziiertes Antigen konnten das Ansprechen der Therapie nur in 40 % richtig erkennen. Während eine ansteigende Kinetik mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für eine Progression sprach (100 %), lag im Falle eines Werteabfalls der Tumormarker nur in 60 % eine Remission vor. Die Rate falsch-negativer Ergebnisse erreichte somit 40 %. Insgesamt konnte anhand der Kinetik Tumor-assoziiertes Antigen signifikant ($p=0,002$) zwischen den drei Gruppen unterschieden werden.

Tabelle 46: Korrelation von klinischer Therapieeffizienz und Tumor-assoziierten Antigenen

		klinische Therapieeffizienz			gesamt
		Remission	No change	Progression	
führender Tumormarker	Abfall \geq 50%	6 13,9%	2 4,7%	2 4,7%	10 23,3%
	gleich bleibend	12 27,9%	1 2,3%	9 20,9%	22 51,2%
	Anstieg \geq 50%	0 0,0%	0 0,0%	11 25,6%	11 25,6%
	gesamt	18 41,9%	3 7,0%	22 51,2%	43 100,0%

Ein additiver Effekt von Nukleosomen und Tumor assoziierten Antigenen könnte vorliegen, wenn gleichzeitig ein Parameter auf dem Ausgangsniveau blieb und der andere abfiel oder anstieg. Deshalb wurde als Kriterium des biochemischen Ansprechens der Therapie (biochemische Remission) der Rückgang mindestens eines Markers bei gleichzeitigem Nicht-Anstieg des anderen gefordert. Als eine biochemische Progression wurde der Anstieg mindestens eines Parameters bei zeitgleichem Nicht-Abfall des anderen gewertet. Die verbleibenden Kombinationen diskrepanter Veränderungen im Sinne eines gleichzeitigen Anstiegs und Abfalls je eines Parameters sowie konstant stagnierender Wertlagen wurden in die Gruppe biochemisch nicht beurteilbarer Verläufe gefasst.

Bei dieser Herangehensweise konnten fast 75% der Patienten durch die Kinetiken von Nukleosomen und Tumor-assoziierten Antigenen richtig eingeordnet werden. Eine so definierte biochemische Progression korrelierte in 100% der Fälle mit einer bildgebend nachgewiesenen Progression; eine biochemische Remission entsprach nur zu einem Prozentsatz von 69 % einer bildgebend festgestellten Remission.

Tabelle 47: Korrelation von klinischer Therapieeffizienz, Tumor-assoziierten Antigenen und Nukleosomen

		klinische Therapieeffizienz			
		Remission	no change	Progression	gesamt
führender Tumormarker und Nukleosomen	mind. ein Abfall und kein Anstieg	18 41,9%	3 7,0%	5 11,6%	26 60,5%
	beide gleich bleibend oder ein Anstieg und ein Abfall	0 0,0%	0 0,0%	3 7,0%	3 7,0%
	mind. ein Anstieg und kein Abfall	0 0,0%	0 0,0%	14 32,5%	14 32,5%
	gesamt	18 41,9%	3 7,0%	22 51,1%	43 100,0%

Anhand des Mantel-Haenszel-Tests wurde multivariat ein potentieller additiver Effekt der Aussagekraft der Kinetiken von Nukleosomen und Tumormarkern überprüft: Dabei zeigte sich, dass die Nukleosomenkinetik unabhängig von der Tumormarkerkinetik einen signifikanten Einfluss auf das Therapieansprechen nimmt ($p=0,0015$). Insbesondere wurde der additive Effekt der Nukleosomen deutlich innerhalb der Subgruppe der Patienten mit einem Abfall oder konstanten Tumormarkerwerten. Hier konnten Patienten mit Remission mittels abfallender Nukleosomenwerte und Patienten mit Progression durch eine ansteigende Kinetik weiter unterschieden werden. Alle Patienten mit einem Tumormarkeranstieg waren progredient. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle veranschaulicht:

Tabelle 48: Additiver Effekt von Nukleosomen zu Tumor assoziierten Antigenen

Kinetik der Tumormarker	Kinetik der Nukleosomen	Anzahl	Remission	no change	Progression
Abfall \geq 50%	Abfall \geq 50%	5	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
	Konstant	4	1 (25%)	2 (50%)	1 (25%)
	Anstieg \geq 50%	1	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)
Konstant	Abfall \geq 50%	17	12 (70%)	1 (6%)	4 (24%)
	Konstant	1	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)
	Anstieg \geq 50%	4	0 (0%)	0 (0%)	4 (100%)
Anstieg \geq 50%	Abfall \geq 50%	1	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)
	Konstant	3	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)
	Anstieg \geq 50%	7	0 (0%)	0 (0%)	7 (100%)
Insgesamt	p = 0,0015	43	18	3	22

In der Umkehrung hatte die Tumormarkerkinetik unabhängig von der Nukleosomenkinetik einen signifikanten Einfluss auf das Therapieansprechen ($p=0,0103$). Am deutlichsten sichtbar war der additive Effekt der Tumormarker innerhalb der Subgruppe der Patienten mit einem Abfall oder konstanten Nukleosomenwerten. Hier konnten vor allem Patienten mit Progression durch eine ansteigende Kinetik identifiziert werden – wie die folgende Tabelle zeigt:

Tabelle 49: Additiver Effekt von Tumor assoziierten Antigenen zu Nukleosomen

Kinetik der Nukleosomen	Kinetik der Tumormarker	Anzahl	Remission	no change	Progression
Abfall \geq 50%	Abfall \geq 50%	5	5 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
	Konstant	17	12 (70%)	1 (6%)	4 (24%)
	Anstieg \geq 50%	1	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)
Konstant	Abfall \geq 50%	4	1 (25%)	2 (50%)	1 (25%)
	Konstant	1	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)
	Anstieg \geq 50%	3	0 (0%)	0 (0%)	3 (100%)
Anstieg \geq 50%	Abfall \geq 50%	1	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)
	Konstant	4	0 (0%)	0 (0%)	4 (100%)
	Anstieg \geq 50%	7	0 (0%)	0 (0%)	7 (100%)
Insgesamt	p = 0,0103	43	18	3	22

Der wechselseitige additive Effekt der Nukleosomen- und der Tumormarkerkinetik blieb auch unter Berücksichtigung der klinischen Differenzierung in eine günstige (Stadium 3) und eine ungünstige Gruppe (Stadium 4) erhalten.

Unabhängig von der klinischen Gruppierung und der Tumormarkerkinetik war der Einfluss der Nukleosomenkinetik auf das Therapieansprechen mit $p=0,0122$ signifikant. Ebenfalls unabhängig von der klinischen Gruppierung und der Nukleosomenkinetik nahm die Tumormarkerkinetik signifikanten Einfluss auf das Therapieansprechen ($p=0,0208$).

5.3.7 Kinetik der Nukleosomen im Serum bei Patienten mit malignen Tumoren während Radiotherapie

Die Strahlentherapie kann je nach Größe des Bestrahlungsfeldes als lokale oder systemische Therapie eingesetzt werden. Nach Eingrenzung der zu bestrahlenden Körperregion werden schwere α -Teilchen, β - oder γ -Strahlen auf den Tumor unter Einbeziehung der umgebenden Gewebe gerichtet, in denen sich möglicherweise versprengte Tumorzellen aufhalten könnten.

Im Routine-Alltag wird heute meist perkutan harte γ -Strahlung (10 Mega-Volt Photonen) verwendet, die gut steuerbar ist und tief ins Gewebe eindringen kann. Durch die γ -Strahlung werden an der DNA der getroffenen Zellen Einzel- und Doppelstrangbrüche verursacht. Da Tumorzellen ohnehin eine fragilere DNA besitzen und oft nicht mehr über effiziente Reparatursysteme verfügen, sind sie besonders anfällig für Strahlenschäden. Ähnliches gilt allerdings auch für alle anderen schnell proliferierenden Gewebe, die aufgrund der kurzen Zellzykluszeiten DNA-Schäden oft nicht rechtzeitig vor der nächsten Zellteilung reparieren können und ebenfalls zugrunde gehen (Hendry 1997).

Indikationen für die Radiotherapie sind fortgeschrittene und metastasierte Tumorerkrankungen, ferner die adjuvante Konsolidierung nach Operationen oder Chemotherapien sowie die neoadjuvante Vorbehandlung vor chirurgischen Eingriffen. Außerdem werden zunehmend kombinierte Radiochemotherapie-Schemata zur Steigerung der therapeutischen Wirksamkeit eingesetzt.

Aus Gründen der besseren Verträglichkeit und Effizienz kommt zumeist eine fraktionierte Strahlentherapie zur Anwendung: Ein bis maximal zweimal täglich an 5 Tagen der Woche werden Bestrahlungsdosen von 1,5 bis 2 Gray (Gy) appliziert. Dieses Schema wird insgesamt über vier bis sechs Wochen fortgeführt bis eine für das bestrahlte Gewebe zulässige kumulative Höchstdosis – meistens zwischen 25 und 60 Gy – erreicht ist. Im Gegensatz zur Chemotherapie sind meist keine längeren Regenerationspausen vorgesehen.

Die kombinierte Radiochemotherapie kann zeitverschoben oder zeitgleich angelegt sein. Bei der ersten Version sind der Strahlentherapie einige Zyklen Chemotherapie vor- und / oder

nachgeschaltet; bei der gleichzeitigen Applikation werden während der Strahlentherapie an definierten Tagen chemotherapeutische Medikamente zusätzlich gegeben.

Für unsere ersten Untersuchungen wählten wir Patienten aus mit unterschiedlich großen Bestrahlungsfeldern und Bestrahlungshöchstdosen. Patienten mit Bronchial-Karzinomen und HNO-Karzinomen erhielten eine hohe Gesamtdosis zwischen 50 und 60 Gy, allerdings war das bestrahlte Gebiet auf die unmittelbare Umgebung des Tumors begrenzt. Patienten mit Lymphomen hingegen wurden nur mit geringerer Gesamtdosis bis 25 Gy bestrahlt, da bei der typischen Mantelfeldbestrahlung ein deutlich größeres Gebiet erfasst wurde, in dem sich sehr strahlensensible Gewebe wie das Knochenmark befinden.

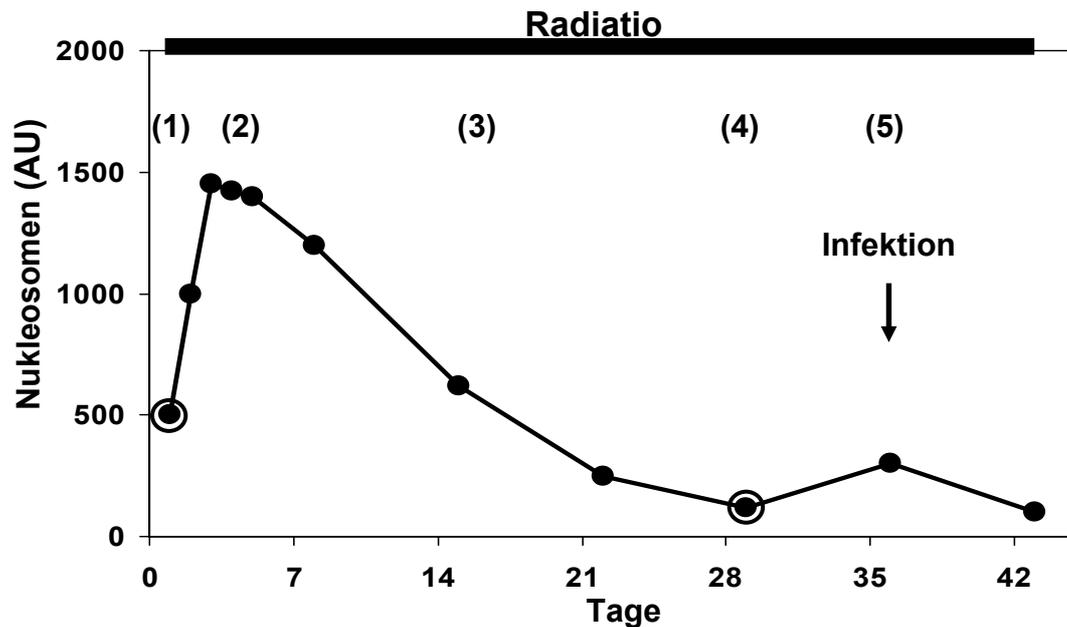
Zu erwartende Kinetik der Nukleosomenkonzentration während Radiotherapie

Durch die kontinuierliche, fraktioniert erfolgende Strahlentherapie ist die bestrahlte Körperregion beständig schädigenden Stimuli ausgesetzt. Deshalb ist mit einer kumulativen Zelltod-Induktion strahlensensibler Zellen zu rechnen. Durch den direkten Ansatz der Noxen an der DNA und den hohen Wirkungsgrad der γ -Strahlen kann von einem raschen und starken Anstieg der Zelltodrate und somit der Nukleosomenfreisetzung ins Blut ausgegangen werden. Je nach Menge der verbleibenden, sensiblen Zellen dürfte die Nukleosomenkonzentration durch die folgenden Fraktionen auf einem hohen Niveau erhalten bleiben oder mit der Reduktion dieser Zellen langsam absinken. Die schließlich während oder nach der Therapie erreichten Minimumwerte könnten ein Hinweis auf die restliche Aktivität des Tumors sein.

Im Vergleich der verschiedenen Tumorarten wie auch im Hinblick auf die therapeutische Wirksamkeit und eventuell auftretende Nebenwirkungen sind einige Merkmale der Nukleosomenkinetik zu berücksichtigen:

1. Der Ausgangswert vor der Strahlentherapie (1)
2. Der Anstieg während der Therapie (Latenz, Höhe) (2)
3. Der Abfall während oder nach der Therapie (Latenz, Geschwindigkeit) (3)
4. Die erreichten Minimalwerte während oder nach der Therapie (4)
5. Die Veränderungen bei klinischen Nebenwirkungen (5)

Abbildung 263: Schematische Darstellung eines Verlaufs während Radiotherapie



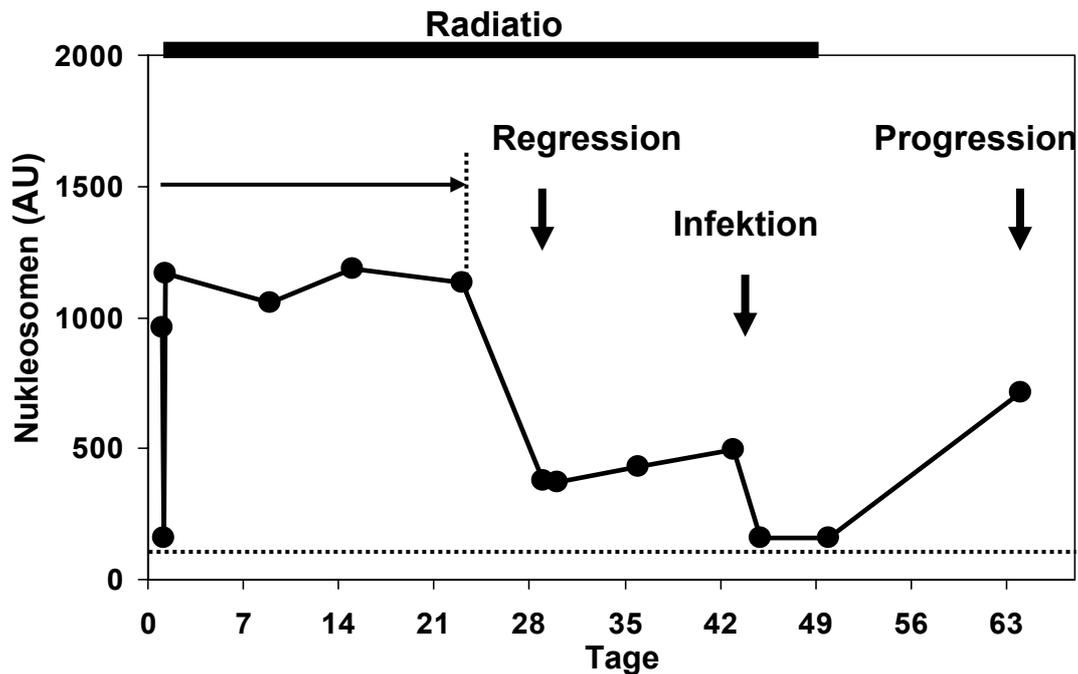
Tatsächliche Kinetik der Nukleosomenkonzentration während Radiotherapie

Bei den meisten Patienten war – ausgehend von unterschiedlichen prätherapeutischen Werten – ein initialer, steiler Anstieg der Nukleosomenwerte innerhalb von nur sechs bis 24 Stunden nach Applikation der ersten Radiotherapie-Fraktion zu verzeichnen. Dabei wurden keine Unterschiede zwischen Patienten mit Lymphomen, Bronchial-, HNO- oder anderen Karzinomen beobachtet. Zu erwähnen ist allerdings, dass es bei einigen Patienten drei bis sechs Stunden nach der ersten Dosisgabe zu einem temporären Abfall der Nukleosomenwerte kam, ehe sie dann steil anstiegen.

Auf diesem hohen Niveau blieben die Nukleosomenkonzentrationen dann für eine unterschiedlich lange Zeitdauer zwischen einem Tag und mehreren Wochen, ehe sie langsam, manchmal auch sehr rasch wieder abfielen. Zeitgleich oder kurz nach diesem Werterückgang wurde in den bildgebenden Verfahren häufig eine deutlich sichtbare Regression des Tumors festgestellt.

Daraufhin pendelten sich die Werte im Bereich von gesunden Personen konstant ein oder blieben auf einem höheren Niveau, von dem aus sie wieder ansteigen konnten. In diesen Fällen wurde mit geringem zeitlichem Abstand oft eine Rezidivierung der Erkrankung oder eine Metastasenbildung diagnostiziert. Allerdings konnten auch infektiöse Nebenwirkungen zu vorübergehenden, teilweise deutlichen Erhöhungen der Werte führen.

Abbildung 264: Verlauf eines Patienten mit einer Progression nach Radiotherapie

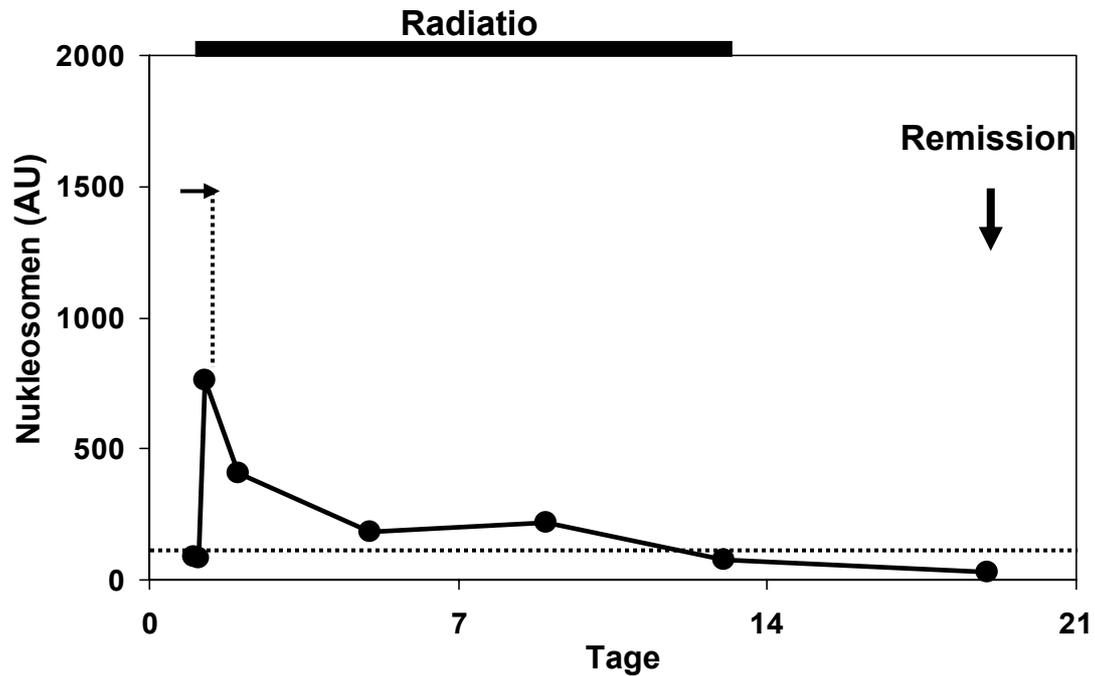


Am Verlauf dieses Patienten mit einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom im Stadium IIIb, der insgesamt mit einer Dosis von 60 Gy im Mediastinum und den supraklavikulären Lymphknoten bestrahlt wurde, sind die beschriebenen Phasen illustriert:

Kurz nach Therapiebeginn stiegen die Werte rasch an, persistierten über mehrere Wochen auf hohem Niveau, ehe sie einhergehend mit einer Verringerung der Tumormassen abfielen. Nach einer Infekt-bedingten temporären Erhöhung gingen sie unter antibiotischer Behandlung weiter zurück, erreichten jedoch nicht den Bereich gesunder Personen (95%-Perzentile = 100 AU). Nach Therapieende stiegen die Werte zeitgleich zum Auftreten neuer Metastasen wieder an.

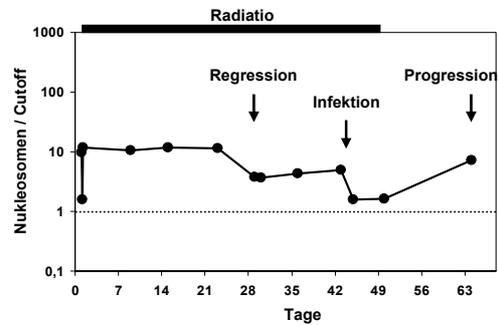
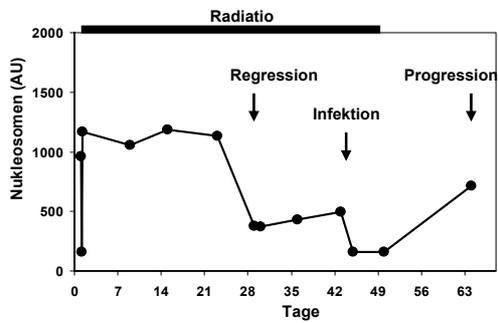
Auch bei dem folgenden Patienten mit einem lokal wachsenden Hypopharynx-Karzinom, der eine Radiochemotherapie mit einer Gesamt-Dosis von 42 Gy und täglich Cisplatin erhielt, war der initiale Anstieg zu beobachten. Allerdings fielen die Nukleosomenwerte gleich am ersten Tag nach Erreichen des Maximalwertes schnell und vollständig bis in den Bereich gesunder Personen unter 100 AU ab. Sonographisch wurde ein fast vollständige Remission des Tumors festgestellt, die auch nach dem Beobachtungszeitraum anhielt.

Abbildung 265: Verlauf eines Patienten mit einer Remission nach Radiotherapie

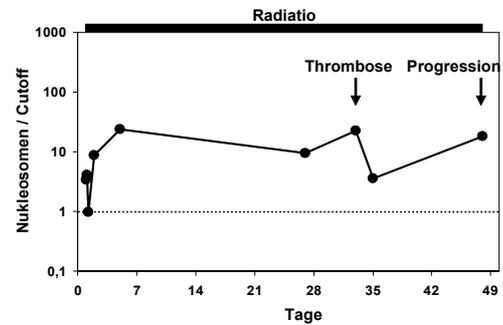
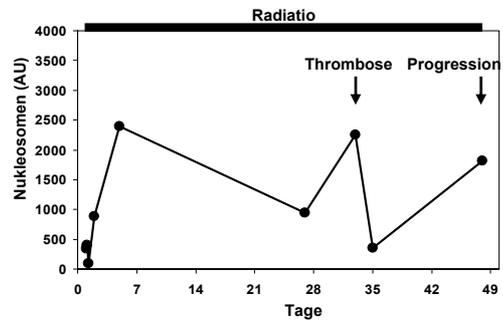


Im Folgenden sind die Nukleosomen-Verläufe aller Patienten während Radio- oder Radiochemotherapie dokumentiert; dabei sind in der ersten Abbildung wieder jeweils die Absolutwerte, in der zweiten die genormten, durch den Grenzwert (100 AU = 95%-Perzentile gesunder Personen) dividierten Nukleosomenwerte gezeigt (KA = Karzinom, ED = Erst-diagnose, Rez = Rezidivdiagnose, KI = Karnofsky Index, LK = Lymphknoten, Zy = Zyklen):

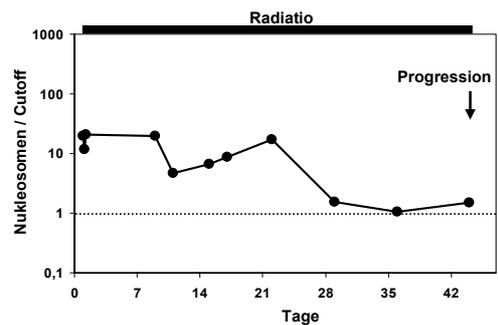
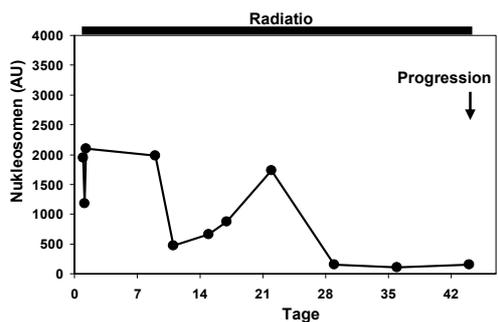
Pat. R1, E.K. 65 J. Bronchial-KA T4 N3 M0 G3 NSCLC
 ED 10/96 primäre Radiotherapie
 Perkutane Radiatio: Mediastinum, supraclav. LK bds. KI: 60 %
 Volumen: 9922 ml Dosis gesamt: 60,0 Gy tgl Fraktion: 2,0 Gy
 Nebenwirkungen: Infektion, maligner Pleura+Perikarderguß
 Klinischer Verlauf: erst Regression, dann Progression und Metastasierung



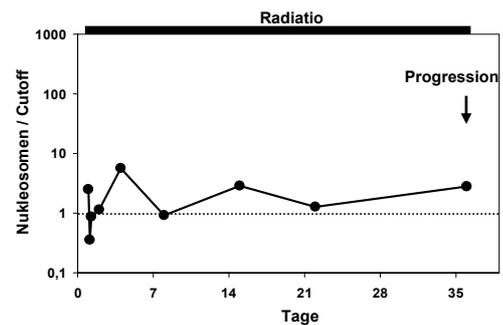
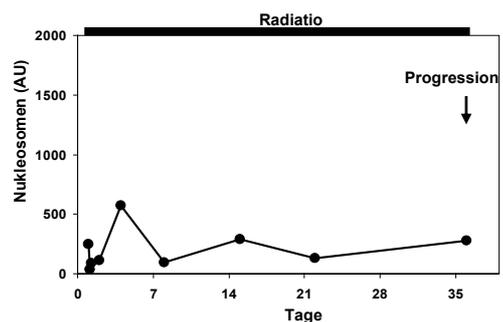
Pat. R2, K.B. 56 J. Bronchial-KA T4 N2 M0 Adeno-KA
 ED 5/96 6 Zy Chemotherapie Rez 1/97
 Perkutane Radiatio: Tumor, Mediastinum, supraclav. LK bds. KI: 60 %
 Volumen: 8778 ml Dosis gesamt: 60,0 Gy tgl Fraktion: 2,0 Gy
 Nebenwirkungen: Unterschenkelthrombose
 Klinischer Verlauf: Progression (Lungen- & Lebermetastasierung)



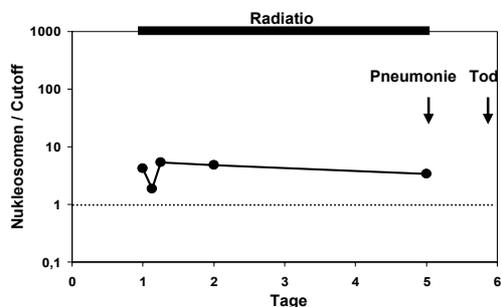
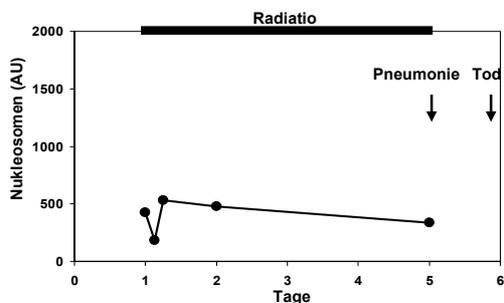
Pat. R3, D.W. 74 J. Bronchial-KA T4 N2 M0 G3 Plattenepithel-KA
 ED 10/96 Rez 11/96
 Perkutane Radiatio: Tumor, Mediastinum, supraclav. LK bds. KI: 50 %
 Volumen: 11700 ml Dosis gesamt: 56,0 Gy tgl Fraktion: 2,0 Gy
 Nebenwirkungen: Mukositis I°
 Klinischer Verlauf: Progression



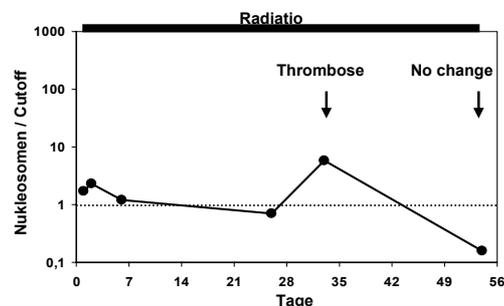
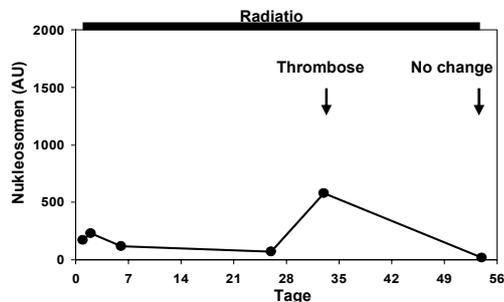
Pat. R4, K.K. 83 J. Bronchial-KA T2 N2 M0 G3 NSCLC
 ED+OP 7/95 Rez 11/96
 Perkutane Radiatio: Tumor, Mediastinum, supraclav. LK bds. KI: 80 %
 Volumen: 9975 ml Dosis gesamt: 60,0 Gy tgl Fraktion: 2,0 Gy
 Nebenwirkungen: Mukositis I°, Dermatitis I°
 Klinischer Verlauf: Progression



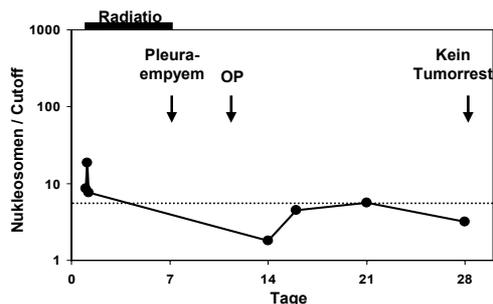
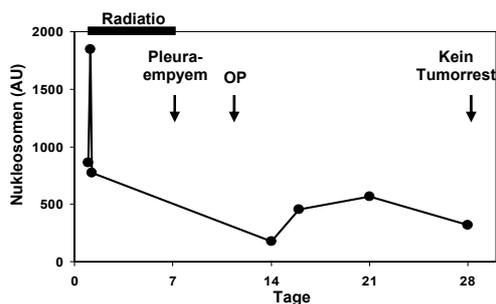
Pat. R5, R.H. 76 J. Maxilla-KA G3 Plattenepithel-KA
 ED 1/96 Radiatio 4/96 Rez 10/96
Rezidivradiochemotherapie
 Oropharynx & cervikale LK KI: 70 %
 Perkutane Radiatio: Dosis gesamt: 16,8 Gy tgl Fraktion: 2 x 2,1 Gy
 Volumen: 1650 ml
 Chemotherapie: 6 mg/qm Cisplatin (tgl)
 Nebenwirkungen: Pneumonie
 Klinischer Verlauf: Tod, klin. Progression



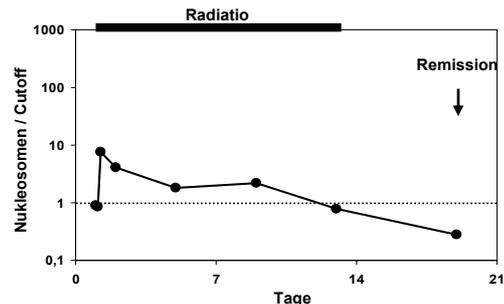
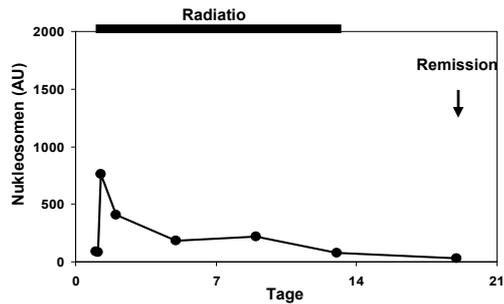
Pat. R6, A.K. 38 J. Tracheal-KA T4 N0 M0 G3 undiff. KA
 ED+OP 1/96 Rez 1/97
Rezidivradiochemotherapie
 Hypopharynx & Mediastinum KI: 90 %
 Perkutane Radiatio: Dosis gesamt: 60,0 Gy tgl Fraktion: 2,0 Gy
 Volumen: 6498 ml
 Chemotherapie: 10 mg Cisplatin (tgl: Tage 1-5 und 33-40)
 Nebenwirkungen: Mukositis I°, Dermatitis I°, Subklavia-Thrombose
 Klinischer Verlauf: keine Befundänderung



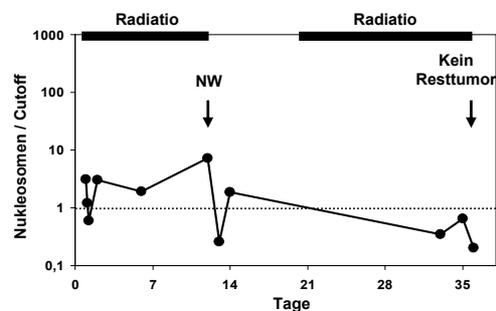
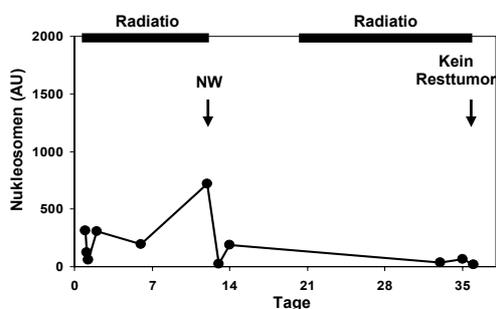
Pat. R7, G.D. 71 J. Bronchial-KA T2 N0 M0 G3 Plattenepithel-KA
 ED 10/96 primäre Radiotherapie
 Tumor, Mediastinum, supraclav. LK bds. KI: 50 %
 Perkutane Radiatio: Dosis gesamt: 10,0 Gy tgl Fraktion: 2,0 Gy
 Volumen: 8928 ml
 Nebenwirkungen: Pleurempyem => OP
 Klinischer Verlauf: Stabilisierung, kein Resttumor, Remission



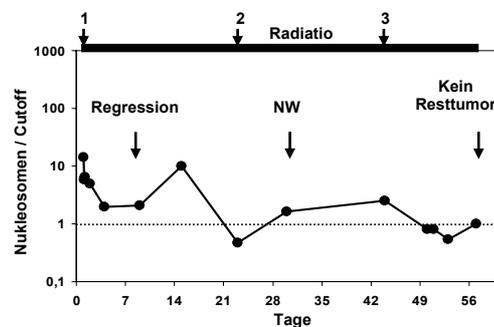
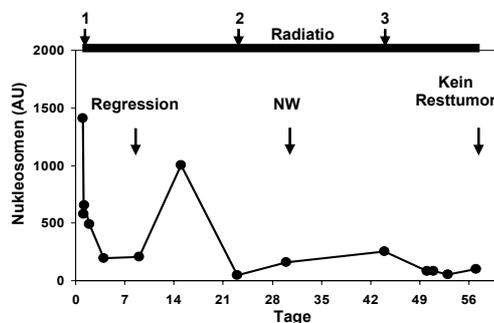
Pat. R8, T.M. 71 J. Hypopharynx-KA T4 N0 M0 G2 Plattenepithel-KA
 ED 10/96 primäre Radiochemotherapie
 Hypopharynx & cervikale LK KI: 70 %
 Perkutane Radiatio: Dosis gesamt: 42,0 Gy tgl Fraktion: 2 x 2,1 Gy
 Volumen: 3762 ml
 Chemotherapie: 6 mg/qm Cisplatin (tgl)
 Nebenwirkungen: Mucositis II°, Dermatitis II°
 Klinischer Verlauf: Remission



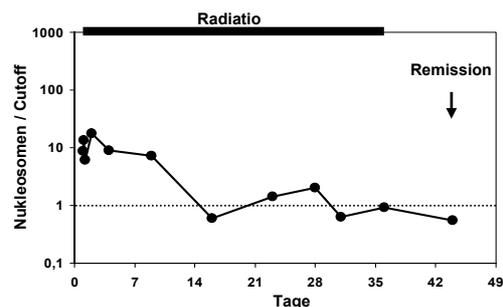
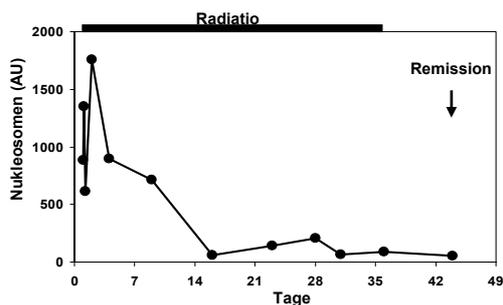
Pat. R9, K.H. 54 J. Hypopharynx-KA T2 N0 M0 G3 Plattenepithel-KA
ED+OP 11/96 postoperative Radiochemotherapie
Hypopharynx & cervikale LK KI: 90 %
Perkutane Radiatio: Dosis gesamt: 56,7 Gy tgl Fraktion: 2 x 2,1 Gy
Volumen: 2562 ml
Chemotherapie: 6 mg/qm Cisplatin (tgl)
Nebenwirkungen: Mukositis III°, Dermatitis II°
Klinischer Verlauf: kein Resttumor, Remission



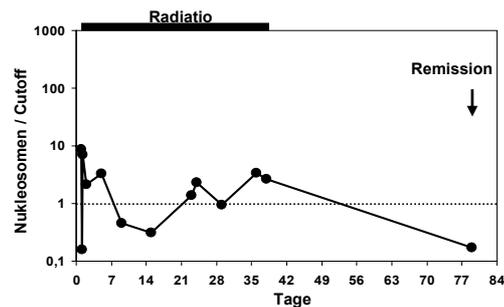
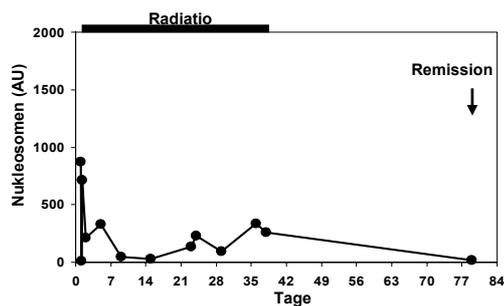
Pat. R10, H.W. 54 J. Hypopharynx-KA T4 N0 M0 G3 Plattenepithel-KA
ED 10/96 primäre Radiochemotherapie
Hypopharynx & cervikale LK KI: 90 %
Perkutane Radiatio: Dosis gesamt: 70,2 Gy tgl Fraktion: 2 x 1,8 Gy
Volumen: 3780 ml
Chemotherapie (3 Zy): Cisplatin 110 mg (T1), 5-FU 1920 mg (T1), 640 mg (T2+3)
Nebenwirkungen: Mukositis III°
Klinischer Verlauf: Remission



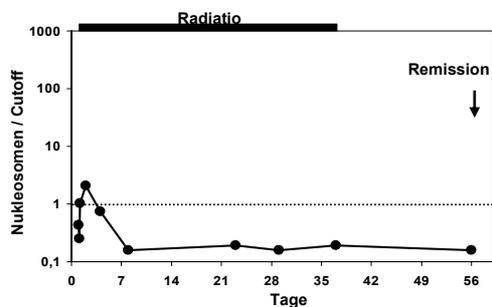
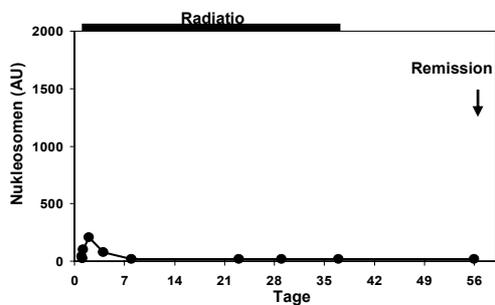
Pat. R11, M.K. 67 J. Follikuläres NHL (cb-cc) III A + Anal-KA T3 Nx Mx
(iliacale, inguinale, retroperitoneale & retrocrurale LK)
ED 12/96 primäre Radiotherapie
Ganzabdomen (1), Becken (2) KI: 80 %
Perkutane Radiatio: Dosis gesamt: 25,5 Gy tgl Fraktion: 1,5 Gy
(1) Volumen: 48864 ml
(2) Volumen: 10960 ml Dosis gesamt: 12,6 Gy tgl Fraktion: 1,8 Gy
Nebenwirkungen: Diarrhoe I°, Panzytopenie
Klinischer Verlauf: Regredienz der LK und des Anal-KAs, Remission



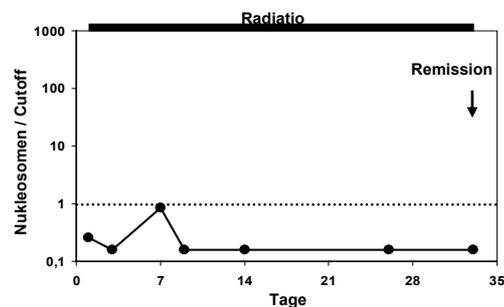
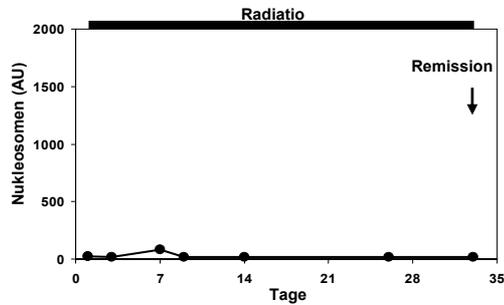
Pat. R12, C.D. 56 J. Follikuläres NHL (cb-cc) II A (inguinale LK bds)
ED 4/92 6 Zy Chemotherapie Rez 11/96
Ganzabdomen KI: 100 %
Perkutane Radiatio: Dosis gesamt: 25,5 Gy tgl Fraktion: 1,5 Gy
Volumen: 50841 ml
Nebenwirkungen: Diarrhoe I°, Leuko- und Thrombopenie I°
Klinischer Verlauf: Regression der Lymphome, Remission



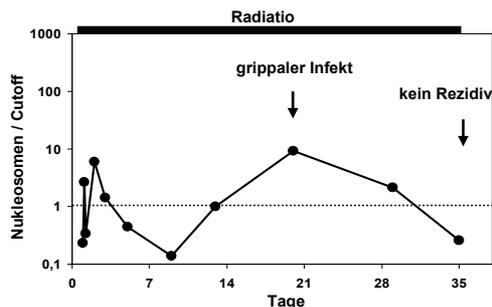
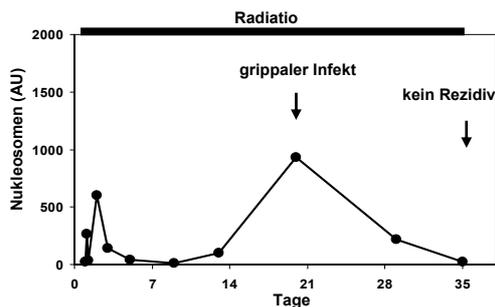
Pat. R13, H.M. 49 J. Follikuläres NHL (cb-cc) IV B
(Milz, abd., ing., cerv., supraclav., med. & axil. LK)
ED 4/96 insges. 9 Zy Chemotherapie
Perkutane Radiatio: Ganzabdomen, inguinal bds. KI: 80 %
Volumen: 50841 ml Dosis gesamt: 25,5 Gy tgl Fraktion: 1,5 Gy
Nebenwirkungen: Panzytopenie, Diarrhoe III°, Übelkeit
Klinischer Verlauf: Regression der Lymphome, Remission



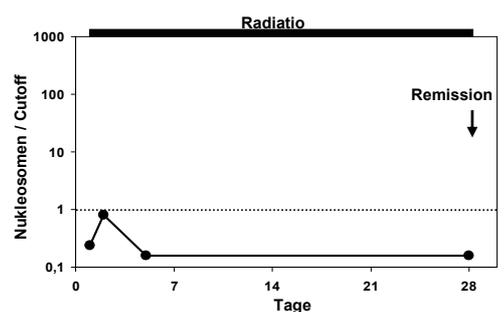
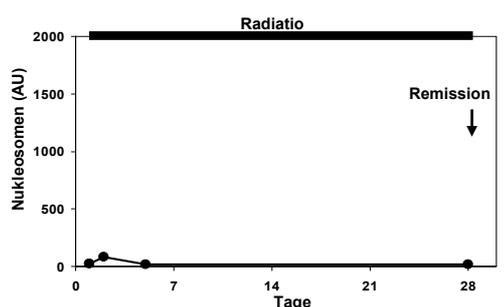
Pat. R14, K.B. 72 J. Follikuläres B-Zell-NHL II A (Abdomen u. Milz)
ED 9/96 6 Zy Chemotherapie Rest-LK
Ganzabdomen KI: 80 %
Volumen: 22898 ml Dosis gesamt: 25,5 Gy tgl Fraktion: 1,5 Gy
Nebenwirkungen: Mäßige Diarrhoe, Panzytopenie
Klinischer Verlauf: Regression der Lymphome, Remission



Pat. R15, S.L. 49 J. Rektum-KA T3 N1 M0 G2 Adeno-KA
ED+OP 10/96 postoperative Radiochemotherapie
Perkutane Radiatio: Becken KI: 100 %
Chemotherapie: 300 mg/qm 5-Fluoruracil
Volumen: 6992 ml Dosis gesamt: 54,0 Gy tgl Fraktion: 1,8 Gy
Nebenwirkungen: Diarrhoe II°, grippaler Infekt
Klinischer Verlauf: kein Rezidiv, Remission



Pat. R16, J.A. 67 J. Rektum-KA T3 N1 M0 G2 Adeno-KA
ED+ OP 10/96 postoperative Radiatio
Becken KI: 70 %
Volumen: 9206 ml Dosis gesamt: 36,0 Gy tgl Fraktion: 1,8 Gy
Nebenwirkungen: Diarrhoe I°
Klinischer Verlauf: kein Rezidiv, Remission



Korrelationen der Nukleosomenkinetik mit dem klinischen Therapieverlauf

Definition des Therapieerfolgs

Staginguntersuchungen einschließlich bildgebender Verfahren wurden meist erst am Ende der Strahlentherapie durchgeführt oder bei klinischem Anhalt für eine rasche Verschlechterung der Erkrankung. Ähnlich wie bei der Beurteilung der Therapieeffizienz bei Chemotherapie wurden die UICC-Kriterien zur Klassifikation des Therapieerfolgs herangezogen. Bei postoperativen Radiotherapien wurde das Ausbleiben eines Rezidivs als anhaltende Remission gewertet.

Therapieerfolg bei verschiedenen Tumorerkrankungen

Insgesamt wurden bei den 16 untersuchten Personen in zehn Fällen eine Remission (63%), in einem Fall keine Befundänderung (no change) (6%) und in fünf Fällen eine Progression der Erkrankung (31%) festgestellt. Obwohl bei dieser kleinen Personenzahl eine Differenzierung keine repräsentativen Aussagen zulässt, seien einige Beobachtungen herausgestellt:

Während höhere Remissionsraten bei den Subgruppen der Patienten mit HNO-Karzinom (75%), kolorektalem Karzinom (100%) und Lymphomen (100%) festgestellt wurden, hoben sich Patienten mit Bronchial-Karzinom, die eine Remissionsrate von nur 17% und einen höheren Anteil an progredienten Verläufen (67%) aufwiesen, deutlich ab.

Einfluss auf das Ansprechen der Therapie hatte auch der Krankheitsstatus vor Beginn der Therapie: Während Radiotherapien bei Personen mit Tumorrezidiven nur in 38% der Fälle zu einer Remission führten, lag der Erfolgs-Anteil bei primären Therapien neuerkrankter Personen sowie adjuvanten Therapien tumorektomierter Personen bei 80% beziehungsweise 100%. Hingegen zeigte die kombinierte Verwendung von Radio- und Chemotherapie im Vergleich zur alleinigen Anwendung von Radiotherapie keine Vorteile hinsichtlich des Therapieerfolgs. Bei beiden Modalitäten ergaben sich Remissionen in 63% der Fälle.

Innerhalb der Gruppe der Personen mit Bronchial-Karzinom war die niedrige Ansprechrate mit auf den hohen Anteil der Personen mit rezidivierenden Erkrankungen zurückzuführen (67%), bei denen keine Remission erreicht wurde. Unter alleiniger Radiotherapie waren 75% der Personen progredient, unter kombinierter Radiochemotherapie 50%. Obwohl auch unter den Personen mit Lymphomen die Mehrzahl (75%) an einem Rezidiv litten, wurde dort in allen Fällen ein Therapieerfolg sowohl unter Radio-Monotherapie wie auch unter Radiochemotherapie festgestellt. Bei Personen mit HNO-Tumoren kam nur die kombinierte

Radiochemotherapie zur Anwendung, die mit Ausnahme eines Patienten mit Rezidiv-Erkrankung zur Remission führte (75%). Bei den beiden Patienten mit kolorektalem Karzinom wurde eine anhaltende Remission nach postoperativer Bestrahlung beobachtet.

In der folgenden Tabelle sind die einzelnen Karzinome (KA), der jeweilige Krankheitsstatus bei Therapiebeginn (prim = primäre Therapie, rez = Rezidivtherapie, pOP = postoperative Therapie), die Therapieform (RT = Radiotherapie, RCT = Radiochemotherapie), die jeweilige Gesamtzahl der Patienten (N) sowie der absolute und prozentuale Anteil der Patienten, deren Ansprechen auf die Therapie einer Remission (Rem), einer stabilen Situation (NC = no change) oder einer Progression (Prog) entsprach, zusammengefasst.

Tabelle 50: Ansprechen der Therapie bei Patienten während Radiotherapie

Tumor	Differential-Diagnose	Status	Therapie	N	Rem	Rem-%	NC	NC-%	Prog	Prog-%	
Alle Tumore	Insgesamt			16	10	62,5	1	6,3	5	31,3	
	Bronchial-KA			6	1	16,7	1	16,7	4	66,7	
	HNO-KA			4	3	75,0	0	0,0	1	25,0	
	Lymphom			4	4	100,0	0	0,0	0	0,0	
	Kolorekt. KA			2	2	100,0	0	0,0	0	0,0	
		prim			5	4	80,0	0	0,0	1	20,0
		rez			8	3	37,5	1	12,5	4	50,0
		pOP			3	3	100,0	0	0,0	0	0,0
				RT	8	5	62,5	0	0,0	3	37,5
			RCT	8	5	62,5	1	12,5	2	25,0	
Bronchial-KA				6	1	16,7	1	16,7	4	66,7	
		prim		2	1	50,0	0	0,0	1	50,0	
		rez		4	0	0,0	1	25,0	3	75,0	
				RT	4	1	25,0	0	0,0	3	75,0
				RCT	2	0	0,0	1	50,0	1	50,0
HNO-KA				4	3	75,0	0	0,0	1	25,0	
		prim		2	2	100,0	0	0,0	0	0,0	
		rez		1	0	0,0	0	0,0	1	100,0	
		pOP		1	1	100,0	0	0,0	0	0,0	
				RCT	4	3	75,0	0	0,0	1	25,0
Lymphom				4	4	100,0	0	0,0	0	0,0	
		prim		1	1	100,0	0	0,0	0	0,0	
		rez		3	3	100,0	0	0,0	0	0,0	
				RT	3	3	100,0	0	0,0	0	0,0
				RCT	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0
Kolorektales KA				2	2	100,0	0	0,0	0	0,0	
		pOP		2	2	100,0	0	0,0	0	0,0	
				RT	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0
				RCT	1	1	100,0	0	0,0	0	0,0

Parameter für die spontane und Therapie-induzierte Nukleosomenfreisetzung

Auch während Radiotherapie wurde der Therapieerfolg bei den untersuchten Personen mit der Kinetik der Nukleosomenkonzentration im Serum verglichen und nach charakteristischen Mustern bei unterschiedlichem Ansprechen auf die Therapien gesucht. Auch hierbei waren die spontane und die Therapie-induzierte Nukleosomenfreisetzung von besonderem Interesse.

Aufgrund der kontinuierlichen Therapie konnte die spontane Nukleosomenfreisetzung nur durch den prätherapeutischen Wert sowie Nukleosomenwerte, die mit mindestens einwöchigem Abstand zur vorangegangenen Strahlentherapie bestimmt wurden, eingeschätzt werden. Der Vergleich des prätherapeutischen mit den posttherapeutischen Werten gewährt somit Einblick in die verbliebene Restaktivität des Tumors.

Der durch die Bestrahlungsfractionen induzierten Nukleosomenfreisetzung sowie der Elimination der Nukleosomen aus dem Blutkreislauf kommen dagegen größere Bedeutung zu. Sie können anhand der Veränderungen der Nukleosomenkonzentration im Serum während des gesamten Therapieprotokolls beobachtet werden. Wertvolle Aussagen sind dabei von der Steilheit, Höhe und Latenz des Anstiegs, der Verzögerung und Geschwindigkeit des Abfalls sowie den während und der Therapie erreichten Minimalwerten zu erwarten.

Um die Bedeutung der einzelnen Parameter der spontanen sowie der Therapie-induzierten Nukleosomenfreisetzung für das Ansprechen der Strahlentherapie beurteilen zu können, wurden anhand einer „explorativen Datenanalyse“ eine Reihe von Variablen untersucht und mit dem klinischen Therapieerfolg in Beziehung gesetzt:

- der Basiswert vor Therapiebeginn (BW)
- der Maximalwert in der ersten Woche nach Therapiebeginn (Max)
- das Verhältnis des Maximalwertes zum Basiswert (Max / BW)
- die Dauer bis zum Beginn eines anhaltenden Werteabfalls um mehr als 25% nach Erreichen des Maximalwertes (Abfall-Start)
- der Minimalwert während der Therapie (Min)
- das Verhältnis des Minimalwertes zum Basiswert (Min / BW)
- der Endwert nach Therapie (End)
- das Verhältnis des Endwertes zum Basiswert (End / BW)

- der absolute und prozentuale **tägliche** Abfall vom prätherapeutischen Basiswert zum Minimalwert (Abfall / d bzw. Abfall / d%)
- die daraus ableitbare Halbwertszeit (HWZ)
- der generelle Verlauf während der Therapie
- die Veränderungen der Werte bei klinischen Nebenwirkungen
- die normierte Fläche unter der Kurve der Werte der ersten Woche, die durch die Anzahl der Tage dividiert wurde (AUC / d).

In diese normierte Fläche gingen mehrere Komponenten der Kinetik wie der Ausgangswert, die Steilheit, Höhe und Latenz des Anstiegs sowie die Verzögerung und die Geschwindigkeit des Abfalls mit ein.

Bei allen Patienten wurde ein striktes Blutabnahme-Protokoll angewandt, so dass während der ersten Woche Nukleosomenwerte an den Tagen jeweils vor der ersten Bestrahlung (I) sowie drei (II), sechs (III), 24 (IV), 72 (V) Stunden und eine Woche (VI) nach Beginn der Radiatio vorhanden waren. Da die letzte Abnahme je nach Entlassung des Patienten manchmal um einen Tag vorgezogen wurde, die Fläche aber von dem Zeitraum der vorliegenden Werte abhängt, wurde sie durch die Anzahl der Tage dieses Zeitraums dividiert und ging als normierte Fläche in die Auswertung ein. Somit wurde eine bessere interindividuelle Vergleichbarkeit erreicht.

Korrelation der Parameter spontaner und Therapie-induzierter Nukleosomen-freisetzung mit dem Therapieverlauf bei Patienten unter Radiotherapie

Bei gleichzeitiger Analyse aller Tumorarten und Therapiemodalitäten zeigten folgende Parameter einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe der Patienten, die durch die Therapie eine Remission erzielten, und jener Patientengruppe mit progredientem Verlauf:

- die Dauer bis zum Beginn des Werteabfalls (Abfall-Start)
- der Minimalwert während der Therapie (Min)
- der Endwert nach Therapie (End)
- der prozentuale tägliche Abfall vom prätherapeutischen Basiswert zum Minimalwert (Abfall / d%)
- die normierte Fläche unter der Kurve der Werte der ersten Woche, die durch die Anzahl der Tage dividiert wurde (AUC / d).

Dabei wiesen Patienten mit einer Remission einen signifikant früheren und schnelleren Abfall der Werte, niedrigere Minimal- und Endwerte sowie eine kleinere Fläche unter der Kurve der ersten Woche auf als Patienten mit einer Progression.

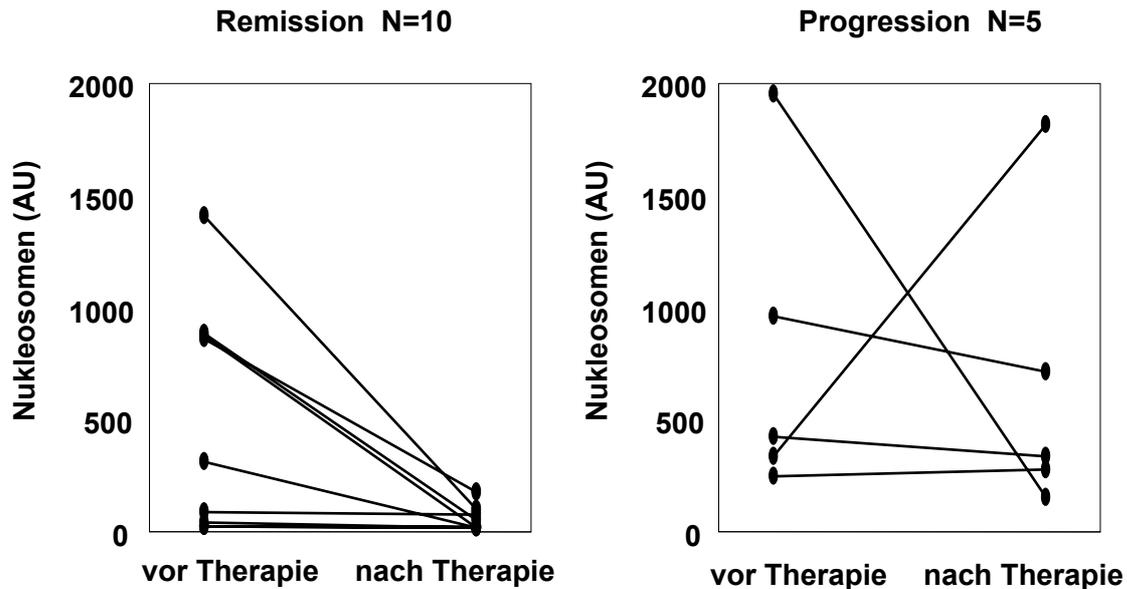
In der folgenden Tabelle sind die einzelnen Parameter mit ihren jeweiligen Medianen und Bandbreiten für die Patientengruppen mit Remission, stabilem Zustand (= No change) und Progression nach Therapie aufgeführt mit dem Signifikanzniveau des Diskriminationsvermögens.

Tabelle 51: Differenzierung des Therapieansprechens durch Nukleosomenvariablen

Variable	gesamt	Remission	No change	Progression	p-Wert (Trend-Test)
N	16	10	1	5	
BW	326 AU (23-1952)	202 AU (23-1410)	174 AU	423 AU (249-1952)	0,162
Max	657 AU (81-2392)	657 AU (81-1849)	230 AU	1167 AU (530-2392)	0,218
Max / BW	206,4% (100-2622%)	268,5% (100-2622%)	132%	125,3% (108-710%)	0,672
Abfall-Start (d)	1,0 d (0-21 d)	1,0 d (0-6 d)	1 d	4,0 d (0-21 d)	0,040
Min	53,5 AU (<16-354)	27,0 AU (<16-179)	71 AU	158,0 AU (93-354)	0,001
Min / BW	34,2% (3-105%)	25,9% (3-70%)	40,8%	37,4% (5-105%)	0,368
End	41,5 AU (<16-1818)	23 AU (<16-318)	<16 AU	336 AU (152-1818)	0,001
End / BW	37,0% (2-539%)	33,9% (2-113%)	9,2%	79,4% (8-539%)	0,058
Abfall / d	20,0 % (-0,5-62,0)	13,9 AU/d (0,9-62,0)	4,1 AU/d	21,8 AU/d (-0,5-52,7)	0,833
Abfall / d%	8,80 %d (-0,14-21,20)	12,29% d (4,44-21,20)	3,52% d	5,59% d (-0,14-13,12)	0,041
HWZ	6,3 d (-478-19,3)	5,3 d (2,9-15,3)	19,3 d	8,4 d (-478-16,8)	0,483
Fläche AUC / d	287 AU/d (42-2028)	242 AU/d (42-981)	180 AU/d	1096 AU/d (302-2028)	0,006

Die beiden Gruppen mit klinisch positivem und negativem Ansprechen auf die Therapie konnten anhand des posttherapeutischen Endwertes und des während der Therapie erreichten Minimalwertes voneinander unterschieden werden. Allerdings befanden sich bei einigen Patienten mit Remission bereits prätherapeutisch die Nukleosomenwerte auf einem niedrigen Niveau, so dass der prozentuale Abfall weniger deutlich ausfiel.

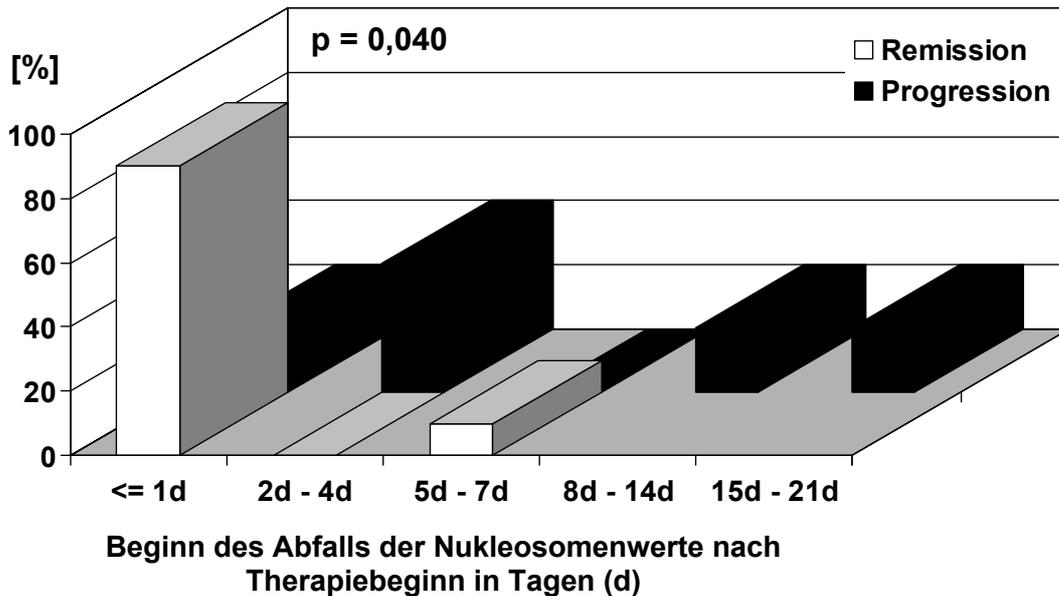
Abbildungen 298 und 299: Nukleosomenkinetiken bei Patienten mit Remission und Progression



Generell war bei 14 der 16 Patienten (88%) der typische Anstieg zu Therapiebeginn zu beobachten. Bei 63% kam es zu einem temporären Abfall drei bis sechs Stunden nach der ersten Fraktion, ehe die Werte steil anstiegen. Davon waren Patienten mit Remission und Progression gleichermaßen betroffen. Nach Erreichen des Maximalwertes sanken die Werte bei allen Patienten nach unterschiedlicher Latenz ab. Während die Werte bei Patienten mit Remission häufig frühzeitig und auf ein sehr niedriges Niveau abfielen und dort konstant blieben, war der Abfall bei Patienten mit Progression oft verzögert, nicht derart vollständig oder die Werte stiegen im Verlauf der Therapie wieder an.

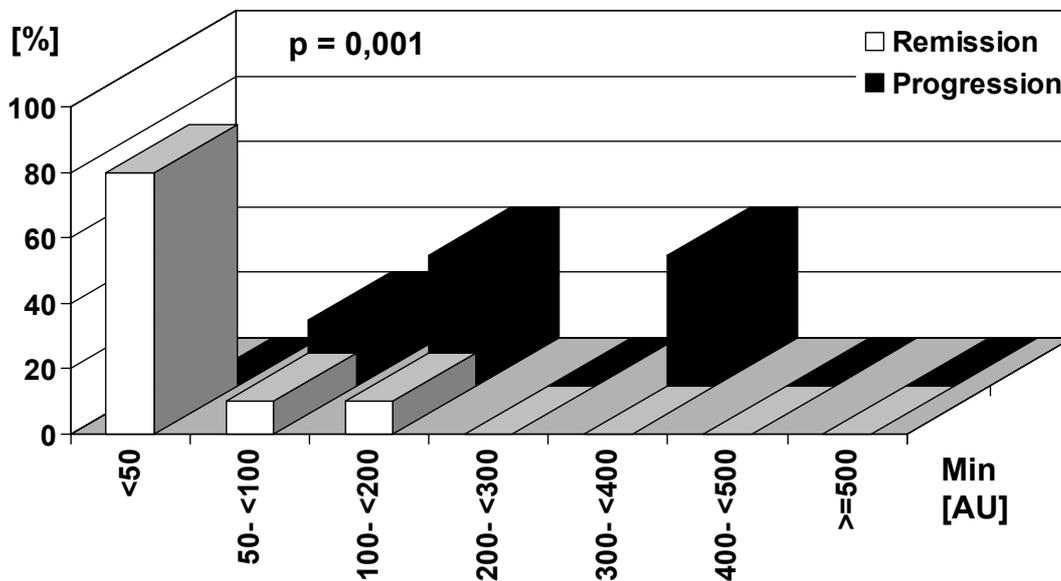
Im Detail begannen bei 90% der Patienten mit Remission die Nukleosomenwerte schon innerhalb eines Tages nach Erreichen des Maximalwertes wieder abzufallen, während sie bei 80% der Patienten mit Progression länger auf hohem Niveau stagnierten – in einem Fall sogar bis zu drei Wochen, ehe sie zurückgingen.

Abbildung 300: Verteilung des „Beginn des Abfalls der Nukleosomenwerte“ bei Patienten mit Remission und Progression



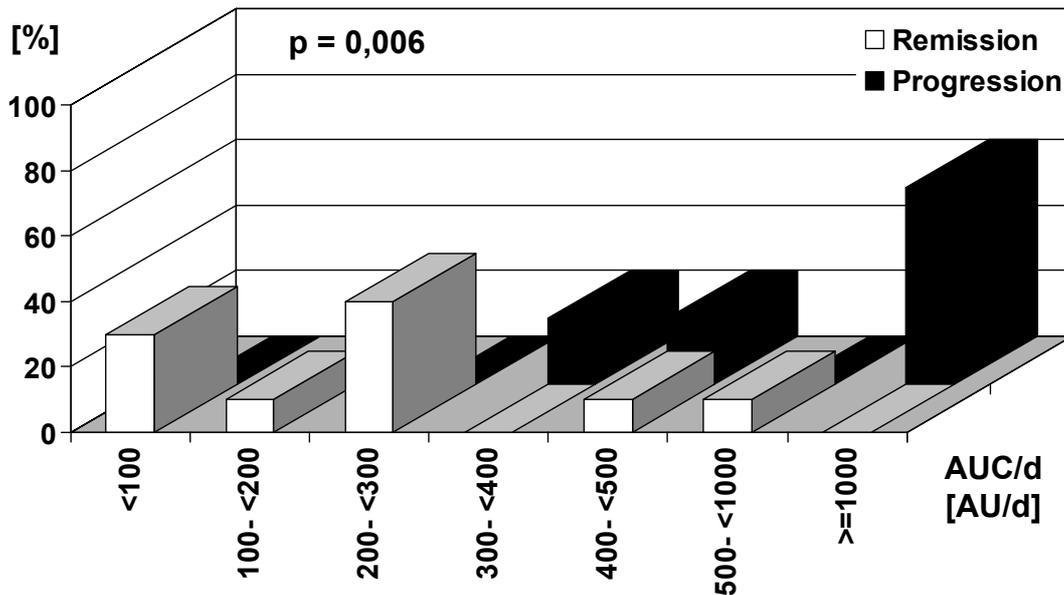
Bezüglich des Minimalwertes während Therapie sanken die Nukleosomenwerte bei 90% der Patienten mit Remission unter 100 AU, bei 80% gar unter 50 AU, während nur einer der Patienten mit Progression (20%) einen Wert unter 100 AU aufwies. Über 200 AU blieben ausschließlich Patienten mit Progression übrig.

Abbildung 301: Verteilung des Minimalwertes während Therapie bei Patienten mit Remission und Progression



Die Fläche unter der Kurve der ersten Woche als integratives Maß summierte die niedrigen prätherapeutischen Basiswerte, Maximal- und Minimalwerte sowie die nur kurzzeitige Latenz und Vollständigkeit des Abfalls der Nukleosomenkonzentration bei Patienten mit Remission zu einem deutlich niedrigeren Index als bei Patienten mit Progression.

Abbildung 302: Verteilung der „Fläche unter der Kurve der ersten Woche“ (AUC/d) bei Patienten mit Remission und Progression



90% der Patienten mit Remission hatten eine AUC/d unter 500 AU/d, 80% unter 300 AU/d, 30% sogar unter 100 AU/d. Hingegen erreichten keiner der Patienten mit Progression einen Wert unter 300 AU/d, lediglich 40% blieben unter 500 AU/d, die restlichen 60% lagen gar über 1000 AU/d.

Folgende Tabelle fasst die aussagekräftigsten Korrelationen der Nukleosomen-Variablen während Radiotherapie mit dem Therapieverlauf zusammen:

Tabelle 52: Aussagekräftigste Diskriminatoren hinsichtlich des Therapieansprechens

Variable	gesamt	Remission	No change	Progression	p-Wert (X ² -Test)
N	16	10	1	5	
Abfall-Start					0,009
≤ 1 Tag	11 (69%)	9 (90%)	1	1 (20%)	
> 1 Tag	5 (31%)	1 (10%)		4 (80%)	
Min					0,009
≤ 100 AU	11 (69%)	9 (90%)	1	1 (20%)	
> 100 AU	5 (31%)	1 (10%)		4 (80%)	
End					0,005
≤ 100 AU	10 (63%)	9 (90%)	1	0 (0%)	
> 100 AU	6 (37%)	1 (10%)		5 (100%)	
Fläche AUC/d					0,006
≤ 300 AU/d	9 (56%)	8 (80%)	1	0 (0%)	
> 300 AU/d	7 (44%)	2 (20%)		5 (100%)	

Klinischen Nebenwirkungen in Form eines Infekts, einer Mukositis, Dermatitis, Diarrhoe, Panzytopenie oder Thrombose wurde zumindest in leichter Ausprägung bei allen Patienten festgestellt. Bei sieben Patienten traten starke Nebenwirkungen als akuter Infekt, Thrombose sowie als Mukositis oder Dermatitis im Stadium III° der WHO-Klassifikation auf. Diese waren in sechs Fällen mit temporären Erhöhungen der Nukleosomenwerte im Serum verbunden.

Auch aufgrund klinischer Voraussetzungen konnten Patientengruppen mit unterschiedlichem Therapieansprechen identifiziert werden: Alle Patienten mit Lymphomen oder soliden Tumoren mit postoperativer Bestrahlung hatten posttherapeutisch eine Remission (7 von 7), während die Mehrzahl der Patienten mit soliden Tumoren und primärer bzw. Rezidivtherapie progredient war (5 von 9). Innerhalb der letzteren Subgruppe konnte - vermutlich wegen der kleinen Patientenzahl – nur mittels der Latenzzeit bis zum Abfall der Werte (Abfall-Start) eine signifikante Unterscheidung zwischen den Patienten mit Remission und Progression vorgenommen werden.

5.3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse der Longitudinaluntersuchungen

Bei den Untersuchungen zur Kinetik der Nukleosomenkonzentration im Serum wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Bei gesunden Personen wurden über längere Zeiträume keine größeren Schwankungen der Nukleosomenkonzentration gefunden.
2. Akute Infekte führten häufig zu einem deutlichen Anstieg der Nukleosomenmenge im Serum, die während antibiotischer Behandlung wieder zurückging. In vielen Fällen wurde eine Parallelität zur Kinetik des C-reaktiven Proteins festgestellt.
3. Nach operativen Eingriffen bei Tumorpatienten stieg die Nukleosomenkonzentration häufig innerhalb weniger Tage an, um danach wieder abzusinken. In einigen Fällen kam es zeitgleich mit postoperativen Komplikationen etwa 7 bis 10 Tage nach der Operation zu einem nochmaligen Anstieg der Nukleosomenwerte.
4. Bei Tumorpatienten während einer Chemotherapie wurde häufig ein schneller Anstieg der Nukleosomenkonzentration innerhalb ein bis drei Tage nach der Medikamentengabe beobachtet, auf den ein Rückgang in der behandlungsfreien Zeit folgte. Folgende Therapiezyklen riefen ähnlich Spitzen hervor. Außerdem konnten intermittierende Infekte zu temporären Erhöhungen führen. Neben diesen typischen Verläufen wurden in einigen Fällen während der Therapiephasen auch primäre Abfälle vorgefunden.
5. Für die Korrelation mit dem Therapieerfolg wurden spontane und Therapie-induzierte Veränderungen der Nukleosomenfreisetzung berücksichtigt:
 - Die spontane Nukleosomenkonzentration im Serum wurde anhand der Basiswerte vor jedem neuen Zyklus verfolgt. Ein Abfall der Werte im Therapieverlauf wurde häufig bei Patienten mit Remission beobachtet, ein Anstieg der Werte war oft mit einer Progression verbunden, wenn eine Infektion ausgeschlossen werden konnte. Hinsichtlich des Therapieerfolgs zeigten sich signifikante Unterschiede bei den Basiswerten zu Beginn des dritten Zyklus und am Therapieende, die bei Patienten mit Remission deutlich niedriger waren. Auch der prozentuale Abfall vom

prätherapeutischen Ausgangswert zu den Basiswerten zu Beginn des dritten Zyklus und am Therapieende war signifikant ausgeprägter für Patienten mit Remission. Dies spiegelte sich auch in einem stärkeren absoluten und prozentualen täglichen Werteabfall sowie einer kürzeren Halbwertszeit bei Patienten mit Remission wider.

- Die Therapie-induzierten Veränderungen der Nukleosomenfreisetzung wurden durch zusätzliche Bestimmungen während der ersten Woche nach Therapiebeginn ermittelt. Dabei wurden insbesondere der Ausgangswert, der Maximalwert sowie der prozentuale Anstieg untersucht, die jedoch zwischen Patienten mit Remission und Progression nicht signifikant diskriminieren konnten.
6. Auch klassische Tumor-assoziierte Antigene korrelierten mit dem Therapieerfolg. Allerdings überschritten sich die Wertlagen der normierten, „führenden“ Tumormarker vor Therapiebeginn und vor den folgenden Zyklen bei Patienten mit gutem und mangelhaftem Ansprechen der Therapie zum Teil erheblich. Im Median jedoch unterschieden sich Patienten mit Remission von solchen mit Progression durch niedrigere präzyklische Werte bei den Querschnittsuntersuchungen und durch eine meist rückläufige Kinetik in den Longitudinaluntersuchungen; hingegen stiegen die Werte bei Patienten mit Progression im Verlauf häufig an.
7. Beim Vergleich der Kinetik der Nukleosomen- und Tumormarkerwerte wurden oft gleichsinnige Veränderungen beider Parameter sichtbar; bei Patienten mit Remission sanken die Werte im Therapieverlauf ab, bei progredienten Tumorleiden stiegen sie an. Falsch-positive wie -negative Resultate kamen nur zu einem kleinen Prozentsatz vor. Die Kinetik der Nukleosomenwerte gab den bildgebend objektivierten Therapieerfolg sowohl bei Progression wie auch bei Remission deutlicher an als die der Tumor-assoziierten Antigene. Durch eine Kombination von Nukleosomen und Tumormarkern konnte eine weitere Steigerung der Detektionsgenauigkeit erreicht werden. Ein genereller wechselseitiger, additiver Effekt konnte in der multivariaten Analyse gezeigt werden. Auch unter Berücksichtigung von klinischen Daten, die für die Prädiktion des Therapieansprechen relevant waren (Stadium 3 gegenüber Stadium 4) blieb der additive Effekt von Nukleosomen und Tumor-assoziierten Antigenen erhalten. Somit ermöglicht die Kombination von Nukleosomen und Tumor-assoziierten Antigenen sogar innerhalb

prognostisch einheitlicher Gruppen eine bessere Beurteilung der Therapieeffizienz während Chemotherapie.

8. Bei Tumorpatienten während Radiotherapie wurde in fast allen Fällen ein noch schnellerer Anstieg der Nukleosomenkonzentration bereits 6 bis 24 Stunden nach der ersten Applikation beobachtet. Nach unterschiedlich langer Latenz sanken die Werte während der kontinuierlich fortgesetzten Therapie wieder ab. Parallel dazu wurde bildgebend oft eine Regression des Tumors konstatiert. Bei fehlender Therapieeffizienz und Progression der Erkrankung stiegen die Werte häufig wieder deutlich an. Auch hier führten gravierende Nebenwirkungen der Therapie zu temporären Erhöhungen der Nukleosomenwerte.

9. Für die Korrelation mit dem Therapieerfolg kamen aufgrund der mehrwöchigen Behandlungsdauer den Therapie-induzierten Veränderungen der Nukleosomenkonzentration größere Bedeutung zu. Der Ausgangswert, die Steilheit, Höhe und Latenz des Anstiegs sowie die Verzögerung und Geschwindigkeit des Abfalls wurden dabei in einer zusätzlichen integrativen Variablen, der normierten Fläche unter der Kurve der Werte in der ersten Woche, zusammengefasst. Diese war signifikant kleiner für Patienten mit Remission als für jene mit Progression. Weitere signifikante Diskriminatoren waren die Latenz bis zum Abfall der Werte, die danach erreichten Minimalwerte während der Therapie, der prozentuale, tägliche Abfall sowie die Werte am Therapieende. Während fast alle Patienten mit Remission einen frühen Abfall nach weniger als einem Tag sowie einen schnellen und kompletten Abfall um mehr als 50% vom Ausgangswert bis in den Bereich gesunder Personen <100 AU aufwiesen, sanken bei der Mehrzahl der Patienten mit Progression die Nukleosomenwerte erst nach mehrtägiger bis –wöchiger Latenz ab und blieben über dem Niveau gesunder Personen.

6 Diskussion

Nukleosomen sind die Form, in der DNA bevorzugt im Blutkreislauf zirkulieren (Rumore 1990). Ihre Freisetzung steht in engem Zusammenhang mit dem Tod von Zellen, die sich bereits in der Blutbahn befinden, oder die Anschluss an das Gefäßsystem erlangt haben (Stroun 2000; Lichtenstein 2001). Somit hängt ihre Konzentration im Plasma oder Serum einerseits vom Umfang des Zellumsatzes und Zelltodvorkommens wie auch von der Geschwindigkeit und Effizienz der Elimination aus der Zirkulation ab. Veränderungen mindestens einer dieser beiden Komponenten im Sinne einer Erhöhung der Nukleosomenmenge über das physiologische Maß finden bei verschiedenen pathologischen Prozessen statt und können vielfältige Auswirkungen haben.

Die direkte Bestimmung von Nukleosomen im Blut ist ein viel versprechender Ansatz, um das Ausmaß der zugrunde liegenden Störung und somit die Akuität eines Krankheitsgeschehens einzuschätzen. Aufgrund der geringen Invasivität bietet sich eine derartige Nukleosomen-Messung vor allem für Verlaufsbeobachtungen der spontanen oder therapie-induzierten Zelltodkinetik an.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Testverfahren etabliert, das die Quantifizierung von Nukleosomen in flüssigen Medien wie Serum, Plasma, Urin oder Liquor erlaubt. Als Ausgangstest dafür wurde der Cell Death Detection – ELISA^{plus} der Firma Roche Diagnostics verwendet, der auf immunchemischem Weg Nukleosomen in Zellpräparationen und –überständen detektiert. Da die Konzeption des Tests diesen allenfalls für Forschungsuntersuchungen tauglich machte und eine Übertragbarkeit auf flüssige Medien nicht gegeben war, wurde durch zahlreiche Modifikationen und Standardisierungen daraus ein Testsystem entwickelt, das eine zuverlässige, reproduzierbare Quantifizierung von Nukleosomen in flüssigen Medien gewährleistete und für die Routineanwendung im klinischen Alltag geeignet war. Zur Prüfung der methodische Unbedenklichkeit wurden umfangreiche Untersuchungen der Testqualität, der präanalytischen Vorgehensweise und potentieller Störgrößen durchgeführt. Auf dieser Grundlage wurde die klinische Aussagekraft des Nukleosomen-Tests bei einzeitigen Querschnittsuntersuchungen sowie bei mehrzeitigen Longitudinaluntersuchungen bewertet.

Methodische Voraussetzungen und Standardisierung der Testdurchführung

Die am Testsystem vorgenommenen Veränderungen betrafen die Standardisierung der Messzeit, die Einführung einer Standardkurve und der darauf bezogenen Skalierungseinheit „Arbitrary Units“. Im Vergleich zu der vom Hersteller empfohlenen Bestimmung eines Anreicherungsfaktors auf der Basis einer im Testkit enthaltenen Kontroll-Probe wurde mit der modifizierten Version der Variationskoeffizient im Interassay-Vergleich von mehr als 40% auf weniger als 15% gesenkt. Damit entsprach der modifizierte Nukleosomentest den Qualitätsanforderungen an einen manuellen Assay und ermöglichte auch vergleichende Messungen an verschiedenen Tagen (Fateh-Moghadam 1993).

Definition der Messzeit und Einführung einer Standardkurve

Ein wesentlicher Schritt bei der Testdurchführung ist die Zugabe des Substrates zu den schon im Ansatz befindlichen Antigen-Antikörper-Komplexen. Damit wird der für die Messung erforderliche Farbumschlag bewirkt, der mit zunehmender Inkubationszeit stärker ausgeprägt wird. Um den Unterschied zwischen Proben, die sich am Anfang und Ende der Mikrotiterplatte befinden, auszugleichen, wird häufig ein Stopreagenz eingesetzt, das in gleicher Weise wie das Substrat zugegeben wird, oder die Messzeit selbst so definiert, dass die Pipettierunterschiede nicht zu stark ins Gewicht fallen. Für den Nukleosomentest war eine Festsetzung der Substrat-Inkubationszeit auf 30 Minuten ausreichend, um den theoretischen Fehler auf vertretbare 5% zu begrenzen.

Zur Herstellung der Standardkurve werden häufig synthetische Materialien gegenüber solchen humanen Ursprungs bevorzugt, um potentielle Infektionsgefahren auszuschließen. Leider ließen sich bei Verwendung von künstlich aus DNA und Histonen hergestellten Nukleosomen keine reproduzierbaren Messsignale und auch keine lineare Verdünnungsreihe erzielen. Die Gründe dafür können in der mangelhaften Qualität der einzelnen Elemente, ihrer nicht stabilen Assoziationsfähigkeit oder weiteren störenden Einflüsse liegen.

Als vorläufiger Standard für die methodische und klinische Evaluierung des Nukleosomentests wurde deshalb ein Material herangezogen, das aus der Vermischung von EDTA-Vollblut gesunder Blutspender gewonnen wurde. Bei dieser Vorgehensweise wird bekanntermaßen Zelltod durch eine so genannte „Mixed lymphocyte reaction“ in großem

Umfang induziert (O'Flaherty 2000). Aus Praktikabilitätsgründen wurde das so erhaltene, nukleosomenreiche Standardmaterial auf Plasmabasis hergestellt, auch wenn gleiche Matrixbedingungen wie bei den Patientenproben – das heißt ein Standardmaterial auf Serumbasis – wünschenswert gewesen wäre.

Verdünnungen des nukleosomenreichen Positiv-Plasmas mit nukleosomenarmem Negativ-Plasma wie auch mit Inkubationspuffer ergaben reproduzierbare und lineare Reihen. Somit waren die Grundvoraussetzungen für ein brauchbares Standardmaterial erfüllt. Als Verdünnungsmittel kamen sowohl Negativ-Plasma wie auch Inkubationspuffer in Frage. Dabei überraschte die Beobachtung, dass die Verdünnung des Positiv-Plasmas mit Negativ-Plasma zu einer flacheren Kurve als mit Inkubationspuffer führte; bei gleicher Verdünnungsstufe waren die Werte bei der Verdünnung mit Negativ-Plasma also deutlich niedriger als bei Verdünnung mit Inkubationspuffer. Da im Inkubationspuffergemisch keine nennenswerte Störgröße vorhanden war, war von einer Wechselwirkung plasmatischer Bestandteile des Positiv- und Negativ-Plasmas auszugehen, welche die Messsignale reduzierten. Um derartige Interferenzen auszuschalten und das Infektionsrisiko zu minimieren, wurde im weiteren Verlauf Inkubationspuffer als Verdünnungsmittel verwendet.

Einstellung des Messbereichs

Der Messbereich eines Tests wird gewöhnlich durch die Optimierung der Mischungsverhältnisse der im Test eingesetzten Reagenzien so eingestellt, dass der Großteil der Probenmaterialien messbare Signale erzeugt und in jenem Bereich liegt, der mit dem Photometer noch sicher erfasst wird. Als idealer Ansatzpunkt dafür bot sich im Nukleosomentest die Regulation der Antikörperkonzentrationen im Konjugat-Gemisch an. Tatsächlich ließen sich mit stufenweiser Senkung der Antikörpermengen im Konjugat auch die erhaltenen Messsignale konzentrationsabhängig senken.

Als weitere günstige Stellgröße wurde die Optimierung der Nukleosomenmengen in den eingesetzten Probematerialien durch generelle Verdünnungsschritte vor der Durchführung des Tests untersucht. Sowohl bei der Verdünnung nukleosomenreicher Serumproben mit einem nukleosomenarmen Negativ-Serum wie auch mit Inkubationspuffer wurden lineare Verdünnungskurven erhalten. Die Kurve mit Negativ-Serum als Verdünnungsmedium lag

geringfügig über der Kurve mit Inkubationspuffer, was auf ein zusätzliches Messsignal durch die wenigen Nukleosomen im Negativ-Serum zurückzuführen war. Im Gegensatz zu der Verdünnungsreihe der Standardkurve, wurde allerdings keine wechselwirkende Schwächung der Signale bei der Verdünnung des Positiv-Serums mit Negativ-Serum beobachtet.

Da alle regulativen Maßnahmen zur Optimierung des Messbereichs ähnlich gute Ergebnisse erzielten, wurde für die methodische und klinische Evaluierung des Nukleosomentests eine generelle Verdünnung der Serumproben mit Inkubationspuffer vor der Testdurchführung vorgenommen, um möglichst wenig in das Testsystem selbst einzugreifen.

Verwendung von Arbitrary Units als Messeinheit

Als Messeinheit wurden an der Standardkurve orientierte, so genannte „Arbitrary Units“ gewählt. Die Unschärfe dieser Bezeichnung beruht auf der komplexen Zusammensetzung der Nukleosomen im Blut: Neben Mononukleosomen sind dort auch Oligonukleosomen unterschiedlicher Länge sowie Polynukleosomen in ungeklärter Proportionalität vorhanden (Rumore 1990; Burlingame 1996; Jahr 2001).

Der Grad der Fragmentierung in kleine Nukleosomeneinheiten ist jedoch von Bedeutung für die Detektion der Nukleosomen im untersuchten Testsystem. Denn die Bindung der Peroxidase markierten Anti-DNA-Antikörper, die sich für das resultierende Messergebnis verantwortlich zeichnen, hängt von der Zugänglichkeit der DNA für Antikörper ab. Bei komplexen Strukturen kann diese im Vergleich zu Mononukleosomen reduziert sein. Andererseits können bei Oligonukleosomen längere Stücke der Nukleosomen-verbindenden „linker DNA“ konserviert sein, an die zusätzliche Antikörper binden können. Somit spiegelt die gemessene Anti-DNA-Antikörper-Menge nicht unbedingt die genaue Zahl an Nukleosomen im Messvolumen der Probe wider.

Bei Kenntnis der Zusammensetzung der Nukleosomen im Blut wäre es möglich, mit dem Einsatz einer definierten Menge an Nukleosomen in vergleichbarer Verteilung eine Abgleichung mit der Standardkurve vorzunehmen und die relativen in absolute Messeinheiten wie „ng/ml“ zu überführen. In einem Versuchsansatz wurden dafür aus Histonen und DNA synthetisch Nukleosomen hergestellt. Jedoch konnten damit keine konstanten Ergebnisse erzielt werden. Möglicherweise traten Schwankungen in der Assoziationsfähigkeit zwischen

DNA und Histonen auf oder die synthetischen Nukleosomen wurden an den Wänden der Probengefäße adhären.

Prinzipiell sind solche Versuche zur Absolutierung der Messeinheit nur als Näherung an die Wirklichkeit zu verstehen: Zum einen kann das Verhalten von humanen und synthetischen Nukleosomen hinsichtlich der Assoziationsfähigkeit und -stärke der Einzelbestandteile Histone und DNA unterschiedlich sein, ebenso die Aggregation mit weiteren Nukleosomen. Ferner kann die Affinität der Antikörper zu humanen oder synthetischen Nukleosomen variieren. Außerdem ist die *in vivo* Verteilung der Nukleosomen inter- und intraindividuell verschieden, wodurch theoretisch eine Kalibrierung jeder einzelnen Probe notwendig würde.

Noch vor einigen Jahren gingen einzelne Arbeitsgruppen von einem überwiegenden oder ausschließlichen Vorkommen von Mononukleosomen im Blut aus (Fournie 1995). Diese Ansicht wurde jedoch von Studien neueren Datums widerlegt (Burlingame 1996; Jahr 2001), die einen beträchtlichen Anteil von Oligo- und Polynukleosomen im Blut nachwiesen. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde bei den vorliegenden Untersuchungen auf eine möglicherweise irrtümlichen Quantifizierung in absoluten Maßeinheiten verzichtet und die Nukleosomenkonzentrationen in an der Standardkurve orientierten „Arbitrary Units“ ausgedrückt.

Fragmentierung der Nukleosomen und Antikörperbindung

Der Zusammenhang zwischen Fragmentierung der Nukleosomen in kleinere Einheiten und dem Ausmaß der Anti-DNA-Antikörperbindung, die mit der Stärke des Messsignals korreliert, verdient eine genauere Betrachtung:

Einerseits ist durch eine starke Fragmentierung eine Zunahme des Messsignals vorstellbar. Diese Annahme trifft besonders auf komplexe, polynukleosomale Strukturen zu. Durch endonukleatische Spaltung werden neue, vorher unzugängliche Bindungsstellen freigelegt, an die zusätzliche Antikörper fixieren können.

Bei oligonukleosomaler Fragmentierung tritt ein verstärktes Messsignal unter der Prämisse auf, dass Antikörper nur jeweils an die von den Nukleosomenkomplexen abstehenden DNA-Endigungen binden. Bei hoher endonukleatischer Aktivität nimmt durch die Generierung

vieler kleinerer mononukleosomaler Einheiten die Anzahl der frei nach außen ragenden Endigungen und somit auch die der daran bindenden Antikörper zu mit der Folge eines stärkeren Messsignals.

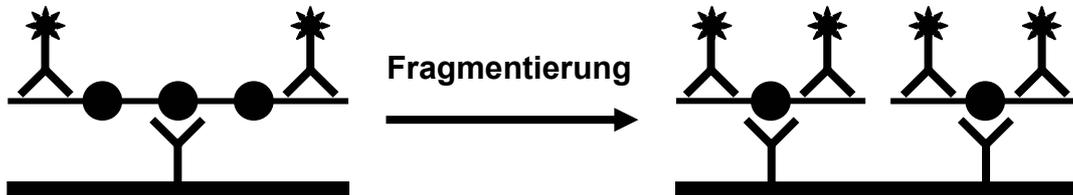


Abbildung 303: Zunahme des Messsignals durch Fragmentierung des Chromatins

Andererseits ist ebenso eine Abnahme des Messsignals durch endonukleatische Fragmentierung denkbar. Diese Vorstellung setzt die Möglichkeit voraus, dass Anti-DNA-Antikörper nicht nur an die aus den Komplexen herausstehenden DNA-Endigungen, sondern auch an die Nucleosomen-verbindende „linker DNA“ binden kann. An oligonukleosomalen Formen finden dann eine Vielzahl an Antikörper Fixationsstellen, während bei kleineren Mononucleosomen das Ausmaß der Antikörper-Bindung und somit auch des Messsignals geringer ausfallen.

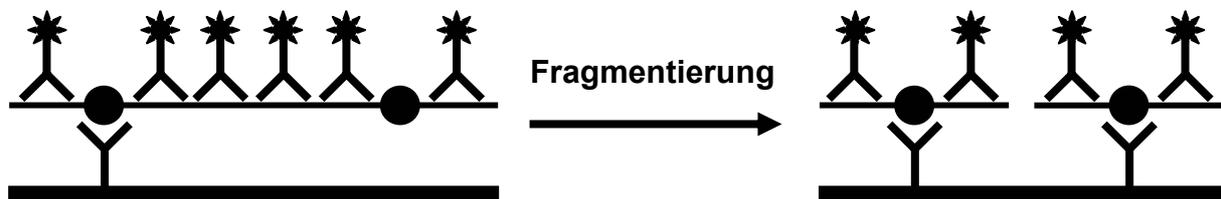


Abbildung 304: Abnahme des Messsignals durch Fragmentierung des Chromatins

Während der Inkubation der Antikörper mit dem Probenmaterial sind die Vorgänge weniger eindimensionaler und statischer, vielmehr mehrdimensionaler und höchst dynamischer Art vorzustellen. In dem zeitlich und räumlich vielseitig variierenden Ablauf des Bindens und Sich-wieder-Lösens der Anti-Histon- und Anti-DNA-Antikörper an die Nucleosomen stellt sich nach einiger Zeit ein Gleichgewicht ein, welches entscheidend von der Affinität der Antikörper zu ihren Antigenen beeinflusst wird. Möglicherweise unterliegt die Bindungsfähigkeit der Antikörper bei gleicher Nucleosomenkonzentration intra- oder interindividuell zufälligen Schwankungen oder gerichteten Einflüssen, die jedoch im Nucleosomentest nicht im einzelnen differenziert werden können.

Qualitative Merkmale des Nukleosomentests

Im Gegensatz zu voll automatisierten Assays, die auf großen Analysen Proben schnell und in großem Umfang vermessen können, ist die Herstellung von manuellen, immunchemischen Assays wesentlich kostengünstiger, weniger zeitintensiv und unterliegt keinen qualitativen Standards. Oftmals werden Assays aus wettbewerbstechnischen Gründen nach Prüfung der Spezifität der Antikörper und einiger methodischer Rahmendaten, zum Teil als „Forschungs-Assays“ deklariert, kommerziell angeboten. Zu diesem Zeitpunkt liegt weder eine methodische noch eine klinische Evaluierung vor. Deshalb ist bei manuellen Assays vor dem klinischen Einsatz die Qualität des Testsystems und die Stabilität des Probenmaterials zu untersuchen. Für die Qualitätsprüfung sind folgende Kriterien zu berücksichtigen:

- Analytische Spezifität
- Analytische Sensitivität
- Intraassay-Varianz
- Interassay-Varianz
- Aufzuwendende Arbeitszeit
- Handhabung des Tests

Analytische Spezifität

Die Verwendung von zwei monoklonalen Antikörpern im Nukleosomentest brachte Vorteile hinsichtlich der analytischen Spezifität im Vergleich zum Einsatz nur eines Antikörpers oder von polyklonalen Antikörpern. Die Definition des Anti-Histon-Antikörpers als „Fänger-Antikörper“ und des Anti-DNA-Antikörpers als „Signal-Antikörper“ wurde von der Herstellerfirma gewählt, wäre allerdings auch in umgekehrter Anordnung vorstellbar. Über die Auswirkungen auf die analytische Spezifität kann lediglich spekuliert werden. Eventuell wäre dadurch eine genauere Quantifizierung der Nukleosomen durch eine bessere Korrelation der Signal-Anti-Histon-Antikörper mit der Anzahl der Histone und damit der Nukleosomen möglich.

Testverfahren zur Bestimmung von Nukleosomen weiterer Hersteller basieren zum Teil auf einem einzigen „Anti-Nukleosomen-Antikörper“ oder sind ebenfalls mit zwei Antikörpern ausgestattet, die unterschiedliche Antigene der DNA-Histon-Komplexe erkennen (Williams 2001; <http://www.cnbi.de>; Salgame 1997).

Ein wichtiger Aspekt ist das Vorhandensein beider nukleosomaler Komponenten, DNA und Histone, für die Detektion im hier untersuchten Nukleosomentest. Damit wird gewährleistet, dass tatsächlich Nukleosomen gemessen werden, die aus Kernen eukaryotischer Zellen entstammen und keine mitochondriale, prokaryotische oder virale DNA sowie RNA erfasst werden, die jeweils nicht mit Histonen assoziiert sind und nicht in nukleosomaler Form vorliegen. Auch Histone allein können in dem Testsystem kein Messsignal erzeugen (Plattner 1997).

Bei der Prüfung der analytischen Spezifität wurden verschiedenste Alternativen untersucht: Nukleosomenreiche Proben wurden mit beiden und je nur einem der Antikörper vermessen, ebenso nukleosomenarme oder -freie Proben. Bei Verwendung nur eines der Antikörper wurde jeweils kein Messsignal erhalten, hingegen ergab die Inkubation der nukleosomenreichen Probe mit beiden Antikörpern ein starkes Signal. Damit wurde gezeigt, dass beide Antikörper für die Detektion der Nukleosomen notwendig und ausreichend sind. Ferner blieb der Test negativ bei Inkubation der nukleosomenarmen oder -freien Proben mit beiden Antikörpern – ein Indiz dafür, dass analytenfreie Proben tatsächlich als solche erkannt werden.

Dies bestätigte auch eindrucksvoll der Titrationsversuch, bei dem Biotin-freie, auswaschbare Anti-Histon-Antikörper zum Testansatz mit biotinylierten, an die Mikrotiterplatte haftenden Anti-Histon-Antikörpern zugegeben wurde. Mit zunehmender Konzentration des Biotin-freien Anti-Histon-Antikörpers, die der Probe die darin enthaltenen Nukleosomen entzogen, nahm das Messsignal dosisabhängig und fast vollständig ab. Somit sind die Anwesenheit von Nukleosomen, biotinylierten Anti-Histon-Antikörpern und Peroxidase-markierten Anti-DNA-Antikörpern für eine Auslösung des Messsignals notwendig und ausreichend.

Auch die alleinige Zugabe von synthetischen Histonen oder DNA in unterschiedlicher Dosierung zu nukleosomenfreiem Material bewirkte keine Erhöhung des Messsignals; eine Bestätigung, dass tatsächlich beide nukleosomalen Komponenten erforderlich sind.

In diesem Zusammenhang wurde die Wechselwirkung mit verschiedenen Medikamenten oder anderen Störgrößen nicht geprüft. Theoretisch könnte im Blut zirkulierendes Heparansulfat – ein Bestandteil der glomerulären Basalmembran in den Nieren, an welches Nukleosomen bei Systemischem Lupus Erythematoses (SLE) binden (Van Bruggen 1997) – oder ähnliche Moleküle mit Nukleosomen interagieren und eventuell Antikörperbindungsstellen blockieren

(Termaat 1990). Auch für Cardiolipin-Antikörper ist ein derartig störender Einfluss denkbar (Pyun 1993). Medikamentöse Interaktionen mit DNA sind vor allem für Antibiotika vorzustellen, deren Wirkmechanismus Modifikationen der DNA-Strukturen beinhalten.

Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des Nukleosomentests wurde vom Hersteller mit dem Nachweis einer Nukleosomenmenge von nur 10^3 Zellen angegeben, was im Vergleich zum gelelektrophoretischen Nachweis eine Steigerung um etwa drei Zehnerpotenzen bedeutet (Salgame 1997). Die hohe Sensitivität konnte in der klinischen Evaluierung dadurch gezeigt werden, dass im Serum von gesunden Personen mit niedrigen Nukleosomenspiegeln bereits Messsignale, wenngleich auf niedrigem Niveau, erhalten wurden. In anderen Studien wurde die bei gesunden Personen im Plasma gemessene DNA-Konzentration auf 10-30 ng/ml beziffert (Leon 1977; Shapiro 1983; Fournie 1986; Sorenson 1994). Der vorliegende Nukleosomentest ist somit ein hochempfindliches Verfahren, das auch zur Bestimmung von geringen Nukleosomen-Konzentrationen geeignet ist.

Intraassay-Varianz

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist von grundlegender Bedeutung für die Brauchbarkeit eines Assays. Sie wird durch die Variationskoeffizienten wiedergegeben, die bei mehrmaliger Vermessung eines oder mehrerer Proben-Pools in einem Testansatz oder mehreren aufeinander folgenden Testansätzen ermittelt wird. Bei manuellen Assays ist eine Intraassay-Varianz bis zu 10% noch vertretbar (Fateh-Moghadam 1993). Die Ergebnisse mit dem Nukleosomentest lagen für mittlere und hohe Wertlagen jeweils unter 5% und erfüllten somit die gesteckten Kriterien bei weitem. Dies ist umso bemerkenswerter, als das bereits verdünnte Probenvolumen von nur 20 µl für einen Handassay sehr knapp bemessen ist und leicht zu Messwertschwankungen durch Ungenauigkeiten beim Pipettieren führen könnte.

Lediglich in den niedrigen Wertlagen wurde eine höhere Varianz festgestellt; ein Phänomen, das bei vielen Testen beobachtet wird, die auf die Erfassung eines großen Messbereichs ausgerichtet sind: Während geringe Unterschiede bei absoluten Werten im hohen Messbereich allenfalls geringe prozentuale Verschiebungen hervorrufen, sind die prozentualen Veränderungen im niedrigen Messbereich dann erheblich größer.

Interassay-Varianz

Die Varianz zwischen mehreren, an verschiedenen Tagen durchgeführten Testansätzen ist für den klinischen Alltag von großer Relevanz. Bei Verlaufsbeobachtungen während oder nach einer Therapie wird das Verhältnis und die Tendenz aufeinander folgender Werte bewertet. Bei einer großen Interassay-Varianz können fälschlicherweise Anstiege oder Abfälle vorgespiegelt werden, die therapeutische Entscheidungen beeinflussen können. Ebenso kann eine therapierelevante Kinetik der Werte möglicherweise übersehen werden.

Andererseits fallen bei Bestimmungen an verschiedenen Tagen zusätzliche Störfaktoren ins Gewicht, wie die unterschiedliche Materialbeschaffenheit der Reagenzien, die Neukalibrierung der Standardkurve, Temperaturunterschiede oder geringe Verzögerungen bei der Testdurchführung. Unter Abwägung dieser Argumente wird für manuelle Assays eine Interassay-Varianz unter 15% gefordert (Fateh-Moghadam 1993).

Die Ergebnisse des Nukleosomentests befanden sich für mittlere und hohe Wertlagen in diesem Bereich. Bei sehr niedrigen Wertlagen jedoch ergab sich eine deutlich höhere Interassay-Varianz von über 40%. Mitverantwortlich für diese außergewöhnlich hohe Varianz scheint die vor jedem Test jeweils neu herzustellende Standardkurve zu sein. Besonders im niedrigen Wertebereich mit hohen Verdünnungen der Standardkurve traten geringe Unregelmäßigkeiten auf, die sich prozentual jedoch sehr stark auswirkten.

Bei der Beurteilung von Werteverläufen im Konzentrationsbereich unter 50 AU ist diese hohe Varianz zu berücksichtigen. Alternativ können diese Schwankungen vermieden werden, wenn die Proben eines Patienten im Verlauf konserviert und in einem Testansatz vermessen werden. Bei den hier vorgelegten Kinetikuntersuchungen wurde nach diesem Verfahren vorgegangen.

Aufzuwendende Arbeitszeit

Die rasche Bearbeitung von Proben setzt eine Integration der Testdurchführung in den routinemäßigen Ablauf eines Labor-Arbeitstages voraus. Die reine, für den Test aufgebrauchte Arbeitszeit wird vor allem durch die Anzahl und Dauer der Inkubationszeiten bestimmt, da nach jeder Inkubationszeit ein Wasch- und Pipettierschritt folgen. Bei zahlreichen oder sehr langen Inkubationszeiten dehnt sich die Testdauer mitunter auf zwei Arbeitstage aus.

Andererseits sind sehr kurze Inkubationszeiten für Verzögerungen bei den Pipettierschritten anfällig, besonders wenn viele Proben in einem Testansatz vermessen werden. Außerdem haben Tests mit kurzen Inkubationszeiten eine geringere Nachweisempfindlichkeit und Präzision. Im Idealfall sollte ein manueller Test in einem Arbeitstag durchzuführen sein und wenige, allerdings nicht zu kurze Inkubationszeiten enthalten. Zusammenfassend sind folgende Kriterien für einen Assay vorteilhaft:

- eine einfache Handhabung des Testes
- kurze Inkubationszeiten
- wenige Verdünnungsschritte
- wenige Waschschrte und
- eine Robustheit der Reagenzien.

Die aufzuwendende Arbeitszeit wird für die ursprüngliche Version des Cell Death Detection ELISAs mit etwa drei bis vier Stunden angegeben. Dabei sind eine längere Inkubationszeit mit dem Antikörpergemisch von zwei Stunden und eine halbstündige mit dem ABTS-Substrat berücksichtigt, zudem ein Pipettier- und ein Waschschrte sowie die Messzeit. Durch die Modifikationen wurde ein zusätzlicher Vorverdünnungsschrte notwendig, wodurch sich eine Gesamtarbeitszeit von etwa fünf Stunden ergab. Somit ist die problemlose Integration eines Testansatzes in einen Arbeitstag möglich. Da die Testbearbeitung zeitlich geschachtelt erfolgen kann, können von einer Assistentin täglich bis zu zwei Assays durchgeführt werden.

Die Handhabung des Testes erwies sich als einfach und schnell zu erlernen. Allerdings ist bei den Verdünnungen und der Standardherstellung wegen der geringen Volumina sorgfältiges Arbeiten erforderlich. Die einzelnen Reagenzien sind über mehrere Wochen haltbar; nur die ABTS-Tablette ist lichtgeschützt zu lagern. Somit eignet sich der Nukleosomentest von technischer Seite für die routinemäßige Anwendung.

Verhalten der Nukleosomen in verschiedenen Matrices

Die Wahl der Probenmatrix ist sowohl für die methodische wie auch für die klinische Evaluierung eines neuen Assays von zentraler Bedeutung. Idealerweise sollen in einem Test die *in vivo*-Verhältnisse des zu bestimmenden Parameters abgebildet werden. Die Präsenz sowie das potentielle Ausmaß von Störgrößen in der Probenmatrix selbst und während der

präanalytischen Probenbehandlung kann die Richtigkeit der gemessenen Werte und die Impräzision des Testes beeinträchtigen.

Die in einem Routinelabor am häufigsten verwendeten Matrices sind Serum für die meisten der labor-, proteinchemischen und endokrinen Parameter sowie Plasma für Parameter des hämatologischen und Gerinnungssystems. Werden Werte durch Gerinnungsvorgänge nicht beeinflusst, wird aufgrund der längeren Haltbarkeit oft Serum als Matrix bevorzugt. Dies trifft auch auf die meisten Tumor-assoziierten Antigene und allgemeine Zellzerfalls-Parameter wie die LDH oder NSE zu.

Bei der vergleichenden Austestung des Nukleosomentests wurde bei fast allen Proben ein deutlich stärkeres Messsignal im Serum als im Plasma beobachtet. Spätere ausführlichere Messungen bestätigten dieses Phänomen. Auch wurden ähnliche Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, die jedoch keine Nukleosomen sondern freie DNA im Blut quantifizierten (Steinman 1975; Fournie 1995; Lee 2001). Diese Diskrepanz zwischen den Matrices lässt sich auf mehrere mögliche Ursachen zurückführen:

- Eine Erklärung basiert auf der Stress-Situation von Blutzellen während des *in vitro* Gerinnungsvorgangs in den Serumröhrchen, aufgrund dieser zusätzliche Zellen absterben und Nukleosomen freisetzen könnten. Nach Steinman *et al* ist die gemessene DNA-Mengen deshalb im Serum etwa dreifach höher als im Plasma (Steinman 1975).
- Ein weiteres Argument ist die Anwesenheit von Chelatoren wie EDTA in den Plasmaröhrchen. Dadurch werden frühzeitig potentiell aktive Ca^{2+} - und Mg^{2+} -abhängige Endonukleasen inhibiert, die weitere Fragmentierung der Poly- und Oligonukleosomen und damit eine mögliche Freilegung von weiteren Antikörperbindungsstellen verhindert.
- Ferner können im Plasma Plasmaproteine mit den Nukleosomen interagieren und deren Präsenz maskieren, wodurch ebenfalls niedrigere Werte resultieren.

Den schwerwiegendsten Einwand gegen die Verwendung von Serum als Matrix stellen die unkalkulierbaren Vorgänge während der *in vitro*-Gerinnung dar. Allerdings ist auch das Ausmaß der Interaktionen der Nukleosomen mit Proteinen im Plasma schwer abzuschätzen. Zudem fällt bei Plasmaproben die kurze Haltbarkeit von wenigen Stunden ins Gewicht.

Trotz der Einschränkungen fiel die Entscheidung für Serum als Probenmatrix aufgrund der besseren Haltbarkeit, guten Stabilität und der potentiellen Automatisierung des Testes. Die später in der klinischen Evaluierung erzielten Ergebnisse – vor allem die reproduzierbaren und charakteristischen, kinetischen Effekte bei den Verlaufsuntersuchungen – stützten diese Wahl.

Die Gruppe von Kuroi *et. al.* führte die Bestimmung der Nukleosomenkonzentration mittels der ursprünglichen Version des Cell Death Detection – ELISAs^{plus} im Plasma durch. Bei Plasmaproben von Patientinnen mit Mammakarzinom erhielten sie ähnliche Werteverteilungen wie wir auf Serumbasis, wenngleich auf deutlich niedrigerem Niveau (Kuroi 1999, 2001).

Messbare Nukleosomenkonzentrationen wurden auch in weiteren Matrices festgestellt wie im Urin, im Liquor cerebrospinalis, in Sputum, Pleura- und Aszitesflüssigkeit. Für spezielle Fragestellungen eignen sich somit auch diese Matrices prinzipiell zur Quantifizierung von Nukleosomen.

Einfluss von Stabilisierung und Lagerungsbedingungen

Durch die Zugabe von EDTA in verschiedenen Konzentrationen zu den Serumproben wurde die Auswirkung einer Blockierung der Endonukleasenaktivität untersucht. Allerdings waren die resultierenden Messsignale bei allen Proben ungeachtet des Zusatzes ähnlich stark ausgeprägt, was auf die Abwesenheit des erwarteten dosisabhängigen wie auch eines generellen Effekts schließen ließ. Mehrere Ursachen können dieser Beobachtung zugrunde liegen: Die Inkubationszeit des EDTA könnte zu kurz gewählt sein, so dass sich keine inhibierende Wirkung entfaltete. Der Einfluss von Endonukleasen im Serum wurde überschätzt oder die Fragmentation der Nukleosomen erstreckte sich über einen längeren Zeitraum und würde erst später sichtbar. Außerdem könnte die endonukleatische Tätigkeit im Serum auch ohne wesentliche Folgen für die Messsignale sein.

Mit der Zugabe von Ca^{2+} sollte die Aktivität der Nukleasen gesteigert werden, um deren Effekte zu verstärken. Auch bei diesem Versuchsansatz änderte sich die Stärke der Messsignale bei mittleren Ca^{2+} -Konzentrationen nicht. Nur bei der höchsten Konzentration kam es zu einem rapiden Abfall der Messwerte bei allen getesteten Proben. Dies kann jedoch

weniger als eine direkte Ca^{2+} -Wirkung auf die Endonukleasen, vielmehr als eine generelle Störung des Testsystem interpretiert werden, da Ca^{2+} die Funktionsfähigkeit von Antikörpern nachhaltig beeinträchtigen kann. Die wahrscheinlichste Ursache für die geringe Beeinflussung der Messsignale ist wohl im Versuchsansatz selbst zu suchen. Bei längerer Inkubation und differenzierterer Titrierung sind die Effekte von EDTA und Ca^{2+} auf Serumendonukleasen möglicherweise darzustellen.

Bei mehrwöchiger Lagerung von Serum- und Plasmaproben können Veränderungen der Messsignale auftreten, die von *in vitro*- Einflussgrößen wie der Lagerungstemperatur und dem Zusatz von stabilisierenden Agenzien abhängen. Bei der Versuchsanordnung wurden Lagerungsbedingungen bei Raumtemperatur (25°C), Kühlschranktemperatur (4°C) und im Gefrierfach bei -20°C sowie -80°C sehr variabel, jedoch entsprechend alltäglicher Gegebenheiten gewählt; ebenso eine mittlere Konzentration (10 mM) des EDTA-Zusatzes.

Die Tatsache, dass mit einer Ausnahme in allen Plasmaproben gleichermaßen niedrige Messsignale unabhängig von der Lagerungstemperatur und dem EDTA-Zusatz vorgefunden wurden, deutet darauf hin, dass darin nur eine geringe Menge an Nukleosomen enthalten war, die sich durch ungünstige Bedingungen nicht erhöhte. Alternativ könnten auch Störfaktoren die im Plasma vorhandenen Nukleosomen effizient maskieren.

Hingegen machte sich bei den Serumproben mit erhöhten Wertlagen der Einfluss der Lagerungsbedingungen bemerkbar: Die Abschwächung der Messsignale nach ein- oder mehrwöchiger Lagerung bei Raum- oder Kühlschranktemperaturen ist mit einem Abbau der Nukleosomen, der auch bei anderen Proteinstrukturen beobachtet wird, vereinbar.

Tieffrieren bei -20°C oder -80°C wird im Routinealltag für die Aufbewahrung von Serumproben angewendet, wenn der zu überbrückende Zeitrahmen mehrere Tage übersteigt oder das zu bestimmende Antigen instabil ist. Folgerichtig trat unter diesen Bedingungen kein Abfall der Werte ein. Jedoch waren noch deutliche Schwankungen zu erkennen, die sich durch Zusatz von 10 mM EDTA beheben ließen. Mögliche Wege, auf denen EDTA zu einer Stabilisierung der Messsignale beitrug, sind eine Inhibierung von Endonukleasen oder eine direkte Interaktion mit den Nukleosomen.

Für die Annahme und Weiterleitung von Probenmaterial zur Nukleosomenbestimmung im klinischen Alltag eines Labor bedeutet dies einen zusätzlichen Aufwand durch die Aufbereitung der Proben mit EDTA, die Aliquotierung und das Tieffrieren. Wie auch für andere instabile Parameter lässt sich die Abwicklung jedoch in den Routinebetrieb integrieren.

Präanalytische Probenbehandlung

Der Einfluss der präanalytische Probenbehandlung wird im ersten Stadium der methodischen Evaluierung häufig vernachlässigt und erst aufgrund auffälliger Ergebnisse nachträglich in unterschiedlicher Intensität untersucht. Dabei können durch unsachgemäße Blutabnahme, lange Transportwege, Verzögerungen durch Postversand oder Überbrückung von Feiertagen sowie durch Sonneneinstrahlung oder starkes Schütteln der Proben starke Veränderungen der Messergebnisse verursacht werden, die deren Interpretation erschweren oder ganz unmöglich machen. Für die Bestimmung der Nukleosomen im Blut sind in diesem Zusammenhang alle präanalytischen Faktoren relevant, die eine unphysiologische *in vivo*- und *in vitro*-Freisetzung von Nukleosomen oder deren *in vitro*-Abbau fördern.

Blutabnahme

Auf die bei der Blutabnahme zu verwendende Sorgfalt wurde bereits hingewiesen. Durch längeres Stauen, Pressen oder Aspirieren provozierte Stress-Situationen können Blutzellen zugrunde gehen. Das entnommene Blut scheint durch das aus lysierten Erythrozyten freigesetzte Hämoglobin hellrot; auch nach Zentrifugation ist im Serum oder Plasma häufig eine makroskopische Rotfärbung erkennbar. Neben Erythrozyten werden jedoch auch andere, kernhaltige Zellen wie Leukozyten oder Vorstufen der Erythrozyten geschädigt und sterben ab. Somit kommt es bei unsachgemäßer Blutabnahme zu einer zusätzlichen, artifiziellen Freisetzung von Nukleosomen aus diesen Zellen. Bei Proben mit ersichtlicher intravasaler Hämolyse sind die Ergebnisse deshalb vorsichtig zu bewerten, da der Verdacht der iatrogenen Manipulation vorliegt. Des Weiteren können auch Endothelzellen an der Nukleosomenfreisetzung beteiligt sein, sofern sie durch mechanische Reizung wie „Herumstochern“ oder Verweilkanülen geschädigt werden.

Transport

Ein schonender und zügiger Transport frisch entnommener Proben ins Labor ist für viele laborchemische Routineparameter essentiell, die durch *in vitro*-Veränderungen der Blutzellen beeinflusst werden, wie die LDH, Kalium oder die NSE. Auch für Nukleosomen trifft dies zu: Lange Transportwege und unvorteilhafte Bedingungen wie Sonneneinstrahlung und Schütteln können in den Blutproben zu einer zusätzlichen Nukleosomenfreisetzung führen, wie der Versuch mit auswärts abgenommenen Proben zeigte. Vermutlich gehen in großem Ausmaß Erythrozyten wie auch kernhaltige Blutzellen unter diesen Stressbedingungen zugrunde. Auch können Lymphozyten darauf mit einer aktiven Sekretion von Nukleosomen reagieren (Anker 1975; Stroun 2000). Die Blutprobe nimmt in diesen Fällen aufgrund der Methämoglobinbildung einen braunroten Farbton an, ebenso das Serum oder Plasma nach der Zentrifugation. Derartige Proben sind verdächtig auf einen unsachgemäßen Transport und können verfälschte Ergebnisse liefern.

Allerdings hinterlassen Stress-Situationen für Blutzellen bei der Blutentnahme oder dem Transport nicht immer makroskopische Spuren. Deshalb ist die Herkunft der Proben festzuhalten, um Unregelmäßigkeiten zurückverfolgen zu können. Generell sind Blutentnahmen außerhalb einer Institution, die ein Labor oder zumindest eine Zentrifuge besitzt, abzulehnen; ebenso natürlich Verschickungen per Post oder Kurier in nicht zentrifugiertem Zustand.

Zentrifugation

Ein sensibler Punkt bei der präanalytischen Probenbehandlung ist der Zentrifugationszeitpunkt. Verzögerungen bis zur Durchführung der Zentrifugation resultieren in einer zeitabhängigen Verstärkung des Messsignals. Trotz zügigen und schonenden Transports können lange Wartezeiten somit schädigende Auswirkung auf Blutzellen haben. In Serumröhrchen werden außerdem während des Gerinnungsprozesses kernhaltige Blutzellen zur Nukleosomenfreisetzung stimuliert oder sie werden geschädigt, sterben ab und entlassen ihre Zellbestandteile, darunter auch Nukleosomen, ins Blutserum. Schließlich können auch Endonukleasen zu einer Erhöhung der Werte beitragen, indem sie die Tertiärstruktur größerer Chromatinfasern aufbrechen und bis dahin verborgene Antikörperbindungsstellen freilegen. Die vermehrte Bindung von Anti-DNA-Antikörpern zieht dann ein stärkeres Messsignal nach sich.

Generell sollte im Routinebetrieb eines Krankenhauses oder einer anderen Einrichtung mit Labor eine Zentrifugation der Proben innerhalb von ein bis zwei Stunden nach Blutentnahme möglich sein. Unter dieser realistischen Prämisse bewegen sich die durch Wartezeiten entstehenden Verfälschungen in einem vertretbarem Rahmen.

Die Zentrifugationsgeschwindigkeit von 3000 g und die Zentrifugationsdauer von 10 min, die auch bei anderen laborchemischen Serumparametern angewendet werden, scheinen auch für die Nukleosomen im Serum ausreichend zu sein. Eine höhere Drehzahl oder eine Verlängerung der Zeitspanne könnte möglicherweise zu einer noch besseren Trennung der Blutbestandteile führen, andererseits aber auch belastend für die Blutzellen selbst sein und eine artifizielle Nukleosomenfreisetzung provozieren.

Stabilisation durch EDTA-Zugabe

Ein gegensätzlicher Effekt wurde bei der Verzögerung der EDTA-Zugabe nach der Zentrifugation beobachtet. Die zeitabhängige Abschwächung des Messsignals mit zunehmender Zeitspanne zwischen Zentrifugation und EDTA-Zusatz lässt sich dadurch erklären, dass Endonukleasen die leicht zugänglichen DNA-Verbindungs- und Endstücke der bereits kleinen Nukleosomeneinheiten angreifen und abspalten. Dadurch reduzieren sich für die Signalantikörper die Bindungsstellen mit der Folge eines niedrigeren Messwertes. Weiterhin können Nukleosomen auch potentiell auf Nukleasen-unabhängigem Weg degradiert werden und entziehen sich dadurch der Messung.

Wird jedoch EDTA unmittelbar nach der Zentrifugation zugegeben, kann der Abfall der Messwerte verhindert werden. Offenbar übt EDTA in einer 10 mM Konzentration eine deutlich inhibierende Wirkung auf Endonukleasen aus. Über eine chelierende Interaktion mit Kationen stört EDTA effektiv die häufig an Abbauprozessen beteiligte Ca^{2+} - und Mg^{2+} -abhängige DNase I (Peitsch 1995). Zusätzlich neutralisiert der auf einen pH im basischen Bereich (pH 8) eingestellte Puffer die Zelltod-begleitende Azidifizierung und schafft dadurch ungünstige Arbeitsbedingungen für die DNase II, die ihr Aktivitätsmaximum bei pH 4,5 besitzt (Barry 1993). Ferner ist ein direkter Effekt der EDTA auf Nukleosomen vorstellbar.

Die weitgehende Stabilisierung der Werte durch EDTA lässt auf eine nach wie vor vorhandene Aktivität der Endonukleasen im Serum schließen, die für die Degradation der Nukleosomen bei zeitlicher Verzögerung des EDTA-Zusatzes verantwortlich sind. Für die präanalytische Behandlung im Routinebetrieb eines Labors stellt die zügige Zentrifugation und die unmittelbare Zugabe von EDTA einen begrenzten Mehraufwand dar, der gut in den alltäglichen Ablauf zu integrieren ist, zumal die Proben dann über den Tag gesammelt und am Abend gemeinsam tiegefroren werden können.

Langzeit-Stabilität

Für vergleichende Longitudinalmessungen eines Parameters wie auch für spätere, zusätzliche Bestimmungen weiterer Parameter oder die Evaluierung neuer Parameter bietet sich die Aufbewahrung von Serumproben in einem Archiv an. Die Lagerungstemperaturen sollten für eine mittelfristige Konservierung bis zu sechs Monaten mindestens -20°C , für längere Zeiträume mindestens -80°C betragen.

Die nur geringen Schwankungen der Messwerte bei über sechs Monate bei -20°C tiefgefrorenen Proben mit einem Variationskoeffizienten unter 10% unterstreichen die Reproduzierbarkeit der Messsignale über lange Zeiträume. Diese hervorragende Langzeit-Stabilität wurde mittlerweile auch bei Seren bestätigt, die über mehrere Jahre bei -80°C gelagert waren, und bildet die Voraussetzung dafür, dass Blutproben zunächst gesammelt und später vermessen werden können.

Im gegenteiligen Fall hätten sie sofort nach der Entnahme in das Testsystem eingesetzt werden müssen. Durch schlechtere Ausnutzung der Mikrotiterplatten und erheblich höheren Verbrauch von Standardmaterialien wäre dann die Kosten-Nutzen-Bilanz deutlich negativer ausgefallen. Außerdem hätten dann Longitudinalverläufe von Patienten unter Therapie nicht in einem Testansatz vermessen werden können, wodurch die Interpretation durch die zusätzlich zu berücksichtigende Interassay-Varianz erschwert gewesen wäre.

Verdünnung der Serumproben

Bei längerer Lagerung spielt das Volumen der eingefrorenen Probe wie auch die Verdünnung der Probe mit einem Diluens eine Rolle. Bei zu kleinen Volumina verschiebt sich einerseits

das Verhältnis von Oberfläche zu Volumen der Probe, andererseits gelingt die Mischung und Homogenisierung nach dem Auftauen mitunter nur unzureichend. Deshalb ist auf eine Mindestfüllmenge der Röhren von mindestens 200 bis 300 µl zu achten, um Ungenauigkeiten bei der Testdurchführung vorzubeugen.

Eine generelle Vorverdünnung der Serumproben wie auch der Standards vor dem Tieffrieren hätte ökonomische Vorteile, da dadurch Proben- und Standardmaterial eingespart werden könnten. Aufgrund der Abschwächung des Messsignals, die möglicherweise auf einer Wechselwirkung des Puffers mit den Nukleosomen beruht, kommt sie allerdings nicht in Betracht.

Mehrmaliges Einfrieren

Sowohl beim Tieffrieren wie auch beim Auftauen werden innerhalb kurzer Zeit große Temperaturdifferenzen überwunden. Dieser Vorgang kann zu Brüchen der Proteinbindungen oder auch zur Degradation von Proteinen führen, vor allem wenn die Abfolge „Einfrieren-Auftauen“ mehrmals wiederholt wird oder wenn die Gefriertemperatur schrittweise von beispielsweise -20°C auf -70°C gesenkt wird.

Zwar wurde bei der Nukleosomenbestimmung durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen in engen Zeitabständen zunächst keine wesentliche Änderung verzeichnet, allerdings kam es bei mehrtägigen Abständen zu einem Abfall der Messwerte. Da der letztere Versuchsansatz eher den realen Bedingungen bei der Testdurchführung entsprach, sind Ergebnisse von bereits früher aufgetauten Proben mit Vorbehalt zu interpretieren.

Homogenisierung der Proben nach dem Auftauen

Die Art der Homogenisierung von Proben als mögliche Störgröße trat erst in jüngster Zeit ins Blickfeld, als für einige Tumor-assoziierte Antigene unterschiedliche Messergebnisse je nach Dauer und Intensität der Vortexbehandlung, der Zentrifugation, des Schüttelns oder Rollens erzielt wurden (Hasholzner 1999). Ursächlich können dafür eine Aggregatbildung der Antigene sowie Adhärenzphänomene mit der Röhrenwand während des Einfriervorgangs verantwortlich sein, die sich beim Wiederauftauen nur teilweise aufheben.

Für Nukleosomen wurde kein Einfluss unterschiedlicher Homogenisierungsmodalitäten festgestellt. Jedoch ist auf eine ausreichend lange Auftauphase und eine Anpassung der Probe an die Raumtemperatur zu achten sowie die Homogenisierung für alle Proben einheitlich zu handhaben.

Berücksichtigung von Störgrößen

Neben einer standardisierten präanalytischen Probenbehandlung ist der Ausschluss von intra- und postvitaler Störfaktoren sowie von Einflussfaktoren bei der Testdurchführung Voraussetzungen für die Validität von Testresultaten.

Schwankungen im Tagesverlauf

Die zirkadiane Biorhythmik äußert sich durch zyklische Freisetzung von Hormonen und wird rückwirkend von diesen getriggert. Ähnliche tageszeitliche Schwankungen ihrer Serumkonzentration sind auch für weitere Parameter wie Nukleosomen vorstellbar, haben sich jedoch nicht bestätigt. Somit ist von keiner tageszeitlichen Akkumulation von Zelluntergangsphänomenen oder einer gepulsten Nukleosomenfreisetzung auszugehen. Die Wahl der Blutabnahmezeit ist ohne Einfluss auf die gemessene Nukleosomenkonzentration. Ebenso ist bei der Vergleichbarkeit an verschiedenen Tagen abgenommener Proben unabhängig von der Abnahmezeit gewährleistet.

Hyperlipidämie

Hyperlipidämien, wie sie passager nach fettreichen Mahlzeiten auftreten, können die Bestimmung verschiedener Blutparametern stören. Aufgrund der Trübung der Serumprobe sind vor allem Parameter, die durch eine nephelometrische oder turbidimetrische Messung quantifiziert werden, davon betroffen. Auch bezüglich der Nukleosomen wurde nach einer extrem fetthaltigen Mahlzeit ein signifikanter Anstieg beobachtet. Allerdings war keine Korrelation zu den ebenfalls erhöhten Triglyceridwerten oder einer Lipoproteinfraktion zu ermitteln. Dieser Effekt trat bei der Untersuchung der zirkadianen Rhythmik unter gemäßigten, fettarmen Ernährungsbedingungen nicht auf.

Hämolyse

Die systematische Untersuchung der Störgröße *in vitro*-Hämolyse durch Spike-Experimente zeigte die von der Konzentration des titrierten Hämolysats abhängige Zunahme des Messsignals. Vermutlich war die lytische Degradation von Erythrozyten jedoch nur ein Gradmesser der auf alle Blutzellen einwirkenden Stressfaktoren in Form von Wärme und Schüttel- Exposition oder mehrmaliges Einfrieren und Auftauen. Die zusätzlich ins Blutserum freigesetzten Nukleosomen stammen letztlich von anderen kernhaltigen Blutzellen wie Leukozyten-Subtypen oder Vorstufen der Erythrozyten.

Bei jenem Hämolysat, welches durch mehrere Zyklen von Tieffrieren und Auftauen einer Vollblutprobe gewonnen wurde, blieben die Werte auf niedrigem Niveau und stiegen nicht konzentrationsabhängig an. Möglicherweise liegt diesem Phänomen ein High-Dose-Hook Effekt zugrunde, bei dem bekanntlich trotz sehr hoher Konzentrationen eines zu bestimmenden Antigens, eine Störung des Testsystems auftritt mit der Folge einer Umkehrung der Messsignale und falsch-negativen Wertlagen (Thomas 1998).

Bakterielle DNA und Detritus

Der negative Nachweis von bakterieller DNA in einem neutralen Medium durch den Nukleosomentest kann als Bestätigung der analytischen Spezifität gewertet werden. Da mitunter bei Patienten mit Sepsis hohe Messsignale erhalten wurden, sind diese nicht durch die zugrunde liegende Bakteriämie zu erklären, sondern beruhen vermutlich auf einer Stimulation von humanen phagozytären oder polymorphnukleären Zellen oder deren bakteriell induzierten Degradation (Deacheux 2000). Diese Hypothese wird zum einen durch ein Experiment von Fournie *et. al.* unterstützt, die nach Injektion von bakteriellen Polysacchariden in Mäuse einen sehr starken Anstieg der DNA-Konzentration im Plasma binnen weniger Stunden berichteten (Fournie 1986), und ferner durch die Beobachtung in unseren Untersuchungen, dass nach der Inkubation von Bakterien in Vollblutproben in allen Fällen hohe Nukleosomenwerte resultierten. Dabei waren die für die Bakterienstämme *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* beobachteten Ergebnisse trotz der unterschiedlichen, eingesetzten Konzentrationen weitgehend identisch.

Durch die Zugabe von Antibiotika in ansteigender Dosierung sollte geprüft werden, ob sich der bakterizide Effekt auch in der Nukleosomenkonzentration niederschlug. Allerdings

konnte in der neutralen Lösung keine Erhöhung der Werte auch bei maximaler Antibiotika- und Bakterienkonzentration erzielt werden. Somit scheint es auch wenig wahrscheinlich, dass für die Erhöhung der Nukleosomenwerte im Vollblutmedium der Einfluss der Antibiotika auf die Bakterien entscheidend war, vielmehr jedoch, dass diese auf der direkten Interaktion von Bakterien und humanen Blutzellen beruhte.

Hingegen ist das Testsystem selbst wenig störanfällig gegenüber Kontaminationen, wie der Hustenversuch zeigte. Auf besondere Vorsichtsmaßnahmen wie das Tragen eines Mundschutzes kann somit verzichtet werden.

Empfehlung für die präanalytische Vorgehensweise

Um eine hohe Vergleichbarkeit und Verlässlichkeit der Testergebnisse zu erreichen, wird zusammenfassend folgendes Procedere der präanalytischen Probenbehandlung als Grundlage für die klinische Evaluierung des Nukleosomentests vorausgesetzt:

1. Sachgemäße Blutabnahme mittels eines Einmalabnahmebestecks in einer Einrichtung mit direktem Laborzugang.
2. Schonender und zügiger Transport der Blutproben (innerhalb von 30 bis 60 Minuten) ins Labor.
3. Zentrifugation der Blutprobe innerhalb von zwei Stunden nach Entnahme bei 3000 g über 10 Minuten.
4. Zugabe von 10 mM EDTA (pH 8) unmittelbar nach Zentrifugation und Abseren der Proben. Zwischenlagerung bei 4°C.
5. Aliquotierung und Tieffrieren der Proben bei -20°C oder -80°C am Tag der Blutabnahme.
6. Homogenisierung durch Vortex über drei Sekunden nach dem Auftauen.
7. Verdünnung der Proben unmittelbar vor Testbeginn.
8. Berücksichtigung von potentiellen Störgrößen wie Hämolyse und Hyperlipidämie bei der Interpretation der Messwerte.

Klinische Wertigkeit der Nukleosomen bei Querschnittsuntersuchungen

Anhand der spontanen Nukleosomenkonzentration im Serum wurde das Ausmaß der Nukleosomenfreisetzung ohne therapeutische Einwirkung bei verschiedenen Personengruppen untersucht. Da ein Zusammenhang mit dem generellen Zelltodvorkommen anzunehmen war, wurden die Nukleosomenwerte von Personen mit vermutlich höherem Zellumsatz wie Personen mit malignen Tumoren denen gesunder Personen gegenübergestellt. Als weitere Vergleichsgruppe wurden Personen mit benignen, differentialdiagnostisch relevanten Erkrankungen herangezogen.

Bereits in früheren Studien anderer Arbeitsgruppen wurden zirkulierende DNA oder Nukleosomen im Serum und Plasma mit verschiedenen, teils aufwendigen oder komplizierten Methoden quantifiziert (Tan 1966; Stroun 1975; Leon 1977; Shapiro 1983; Maebo 1990; Sorenson 1994; Fournie 1995). Aufgrund der unterschiedlichen, technischen Hintergründe war nicht unbedingt zu erwarten, dass deren Ergebnisse mit den hier vorgestellten Nukleosomenuntersuchungen übereinstimmten. Gegenüber den herkömmlichen Methoden sei nochmals auf den Vorteil der einfachen, schnellen und reproduzierbaren Quantifizierung der Nukleosomen durch den hier evaluierten Test hingewiesen.

Verteilung der Nukleosomenwerte bei gesunden Personen

In unseren Untersuchungen bildeten gesunde Personen eine homogene Gruppe mit sehr niedrigen Nukleosomenwerten bei einem Median von 24 AU. Diese Beobachtung zeigte sich bemerkenswerterweise auch in den oben erwähnten, vorangegangenen Studien:

Leon *et. al.* berichteten von einer mittleren Konzentration freier DNA im Serum von 13 ng/ml (Leon 1977), Shapiro *et. al.* berechneten 14 ng/ml (Shapiro 1983); Sorenson *et. al.* beschrieben 10 ng/ml als mittleren DNA-Wert im Plasma gesunder Personen (Sorenson 1994), was in etwa dem DNA-Gehalt von 1600 diploiden Zellen entspricht.

Bei differenzierter Betrachtung der Gruppe gesunder Personen fanden sich bei unserer Evaluation keine Unterschiede hinsichtlich des Geschlechts oder der Altersverteilung. Auch bei Personen mit benignen oder malignen Erkrankungen, bei denen die Häufigkeitsverteilung zu höheren Lebensaltern hin verschoben war, konnte keine Abhängigkeit der Nukleosomenwerte vom Alter oder dem Geschlecht festgestellt werden. Diese Ergebnisse sind insofern interessant, als theoretisch mit zunehmendem Lebensalter auf zellulärer Ebene

mit einer abnehmenden Regenerationsfähigkeit, jedoch einer Zunahme degenerativer Prozesse sowie allgemein mit einer Zunahme der Morbidität zu rechnen ist. Allerdings ist – wie unsere Ergebnisse zeigen – eine Erhöhung der Nukleosomenmenge im Serum somit keine generelle Alterserscheinung. Auch allgemeine Lebensgewohnheiten bezüglich des Alkohol- oder Nikotinkonsums und die subjektive Stressbewertung hatte bei gesunden Personen keinerlei Einfluss auf die spontanen Nukleosomenkonzentrationen im Serum.

Hinsichtlich der Altersabhängigkeit von zirkulierenden Nukleosomen liegen in der Literatur nur schwer zu interpretierende Daten von Kuroi *et. al.* vor: Diese Arbeitsgruppe hatte bei Männern etwas höhere Nukleosomenwerte als bei Frauen und bei einer Untergruppe von Frauen über 60 Jahre höhere Werte als bei jüngeren festgestellt. Allerdings hatten in dieser Studie über 70-jährige Frauen wieder niedrigere Werte und der altersabhängigen Unterschiede ließ sich bei Männern nicht nachweisen (Kuroi 2001).

Verteilung der Nukleosomenwerte bei Personen mit benignen Erkrankungen

Personen mit benignen Erkrankungen wiesen in unseren Untersuchungen ein breites Spektrum an Wertlagen auf mit einem signifikant höheren Median von 146 AU als gesunde Personen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch in früheren Studien über benigne gastrointestinale Erkrankungen (Shapiro 1983; Sorenson 1994) und Systemischen Lupus Erythematoses (Amoura 1997) berichtet. Dabei hob Amoura hervor, dass die Nukleosomenwerte nicht im Zusammenhang mit dem Krankheitsstadium stehen.

Bei differenzierter Analyse unserer Daten zeigte sich bei Personen mit akuten Infekten eine deutliche Korrelation der Nukleosomen mit dem C-reaktiven Protein – einem Parameter, der die Akuität und Ausmaß einer bakteriellen Infektion anzeigt. Wie schon erwähnt, werden bei einer Bakteriämie humane phagozytäre und polymorphkernige Zellen sowohl stimuliert wie auch angegriffen und sterben ab (Dacheux 2000). Zusätzlich bindet das C-reaktive Protein an die Histon-Komponente von Nukleosomen und verzögert deren Elimination aus der Blutbahn (Du Clos 1996; Burlingame 1996). Beide Vorgänge bewirken eine Erhöhung der spontanen Nukleosomenkonzentration im Serum. Jedoch traten interindividuell auch Abweichungen auf, weshalb nicht in jedem Fall eine eindeutige Korrelation festzustellen war.

Verteilung der Nukleosomenwerte bei Personen mit malignen Erkrankungen

Auch bei Personen mit verschiedenen malignen Tumoren wurde eine große Bandbreite an Nukleosomenwerten beobachtet, wobei der Median mit 190 AU nochmals höher als bei Personen mit benignen Erkrankungen lag. Deutlich erhöhte Werte bei Personen mit Karzinomen fanden in der Literatur auch die Arbeitsgruppen von Shapiro *et. al.* und Sorenson *et. al.* bei gastrointestinalen Karzinomen (Shapiro 1983; Sorenson 1994), Maebo *et. al.* und Fournie *et. al.* beim Lungenkarzinom (Maebo 1990; Fournie 1995), Kuroi *et. al.* beim Mammakarzinom (Kuroi 1999; 2001) sowie Leon *et. al.* und Jahr *et. al.* bei multiplen Karzinomen (Leon 1977; Jahr 2001).

Bei näherer Differenzierung der einzelnen Tumorarten fielen in unseren Untersuchungen besonders Personen mit Lungenkarzinomen – einer oft sehr rasch progredienten Tumorart – mit sehr hohen Werten auf. Im Gegensatz dazu waren bei Personen mit Prostata-Karzinom, welches häufig langsam wächst und in frühen Stadien diagnostiziert wird, fast ausschließlich niedrige Wertlagen vorzufinden.

Die anderen Tumorarten wiesen zueinander ähnliche Werteverteilungsmuster auf und unterschieden sich nur graduell. Die Heterogenität des spontanen Zelltodvorkommens innerhalb eines Tumors, zwischen verschiedenen Individuen mit einer Tumorart und zwischen verschiedenen Tumorarten erklärt die breite Streuung der Werte (Meyn 1993a). Daneben spielen der Perfusionsgrad, die Invasivität sowie die Aggressivität eines Tumors auf das umliegende Gewebe eine Rolle für das Erscheinen der Nukleosomen in der Zirkulation. Außerdem kann es auch interindividuelle Unterschiede im Verhältnis von freier zu Nukleosomen-gebundener DNA geben.

Diagnostische Wertigkeit der Nukleosomen im Serum

Für die Ermittlung der diagnostischen Wertigkeit eines Tests ist die Wahl der untersuchten Personengruppen von entscheidender Bedeutung: Beim Vergleich deutlich unterscheidbarer Gruppen – beispielsweise gesunde Personen und Personen mit bereits fortgeschrittenen Tumorerkrankungen – werden sich vermutlich viele Parameter finden, die mit hoher Sensitivität und Spezifität diskriminieren können. Ihre Tauglichkeit im klinischen Alltag jedoch können sie nur beweisen, wenn zusätzlich das diagnostisch relevante Kollektiv der

Personen mit benignen Erkrankungen gegenüber Tumorpatienten – am besten in frühen Stadien – untersucht wird (Stieber 2001).

Auch bei ausschließlicher Betrachtung der Mediane oder Mittelwerte mag sich leicht ein signifikanter Unterschied ergeben. Die Verteilung der Wertlagen allerdings gewährt erst Einblick, ob große Überlappungen bei den betreffenden Kollektiven vorliegen, wodurch sich im Einzelfall die diagnostische Aussage stark relativieren würde. Das gesamte Sensitivitäts- / Spezifitäts-Spektrum wird durch ROC-Kurven dargestellt, wodurch die tatsächliche Diskriminierungsfähigkeit eines Parameters leicht erkennbar ist.

In unseren Untersuchungen wurde die Anzahl der Personen in den einzelnen Kollektiven so bemessen, dass in jeder Gruppe eine möglichst repräsentative Aussage getroffen werden konnte. Da innerhalb der Gruppe der Personen mit malignen Erkrankungen nach einzelnen Tumorarten differenziert wurde, ergab sich dort in der Summe eine deutlich größere Gesamtzahl an Personen. Dennoch scheint die Anzahl auch in den Vergleichsgruppen ausreichend, um eine mögliche Heterogenität innerhalb der Gruppe wiederzugeben und eine Gegenüberstellung der Gruppen als ganze zu erlauben.

In Übereinstimmung mit anderen Studien (Leon 1977; Shapiro 1983; Maebo 1990; Sorenson 1994; Fournie 1995; Kuroi 1999) hoben sich in unseren Untersuchungen die Nukleosomenwerte bei Personen mit malignen Erkrankungen hochsignifikant von denen gesunder Personen ab. Auch bei differenzierter Betrachtung nach Lokalisation des Tumors zeigte sich mit Ausnahme der Prostata-Karzinome ein ähnliches Verhältnis. Dies unterstreicht die anfängliche Hypothese, dass Personen mit erhöhtem Zellumsatz in stärkerem Ausmaß Nukleosomen freisetzen. Signifikant höhere DNA- bzw. Nukleosomenwerte fanden mit unterschiedlichen Methoden auch Shapiro *et. al.* und Sorenson *et. al.* bei gastrointestinalen Karzinomen (Shapiro 1983; Sorenson 1994), Maebo *et. al.* und Fournie *et. al.* beim Lungenkarzinom (Maebo 1990; Fournie 1995), Kuroi *et. al.* beim Mammakarzinom (Kuroi 1999; 2001) sowie Leon *et. al.* und Jahr *et. al.* bei mehreren Tumorarten (Leon 1977; Jahr 2001) im Vergleich mit gesunden Personen.

In den entsprechenden ROC-Kurven ist am Verlauf im hohen Spezifitätsbereich ein gutes Diskriminationsvermögen zwischen den beiden Gruppen abzulesen. Wie die Werteverteilung illustriert, gibt es allerdings im niedrigen Wertebereich Überlappungen: Neben gesunden Personen weist auch eine beachtliche Zahl an Tumorpatienten nur geringe Nukleosomenkonzentrationen im Serum auf, so dass in diesem Bereich eine diagnostische Entscheidung nicht möglich ist. Auch in den oben genannten Studien wird diese Beobachtung bestätigt.

Bei der Gegenüberstellung der klinisch relevanten Patientengruppen mit benignen und malignen Erkrankungen sind bei unserer Evaluation im Mittel zwar bei Tumorpatienten höhere Nukleosomenwerte erkennbar, jedoch erreicht der Unterschied kein Signifikanzniveau von $p < 0,05$. In der Differenzierung nach Organsystemen trifft diese Beobachtung auch für gynäkologische und gastrointestinale Erkrankungen zu; lediglich bei pulmonalen Erkrankungen wird der Unterschied aufgrund der überdurchschnittlich hohen Wertelagen bei den Karzinomen signifikant.

In anderen Studien wird der Vergleich mit benignen Erkrankungen häufig nicht durchgeführt; lediglich Shapiro *et. al.* (Shapiro 1983) gaben einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Gruppen an. Dabei war in ihrer Untersuchung jedoch der große Anteil von Patienten mit fortgeschrittenem Pankreas-Karzinom, die mit sehr hohen Werten assoziiert waren, verantwortlich. Allerdings war auch dort eine eindeutige Trennung der Gruppen aufgrund großer Überschneidungen der Wertelagen nicht möglich. Vor allem fielen Pankreas-Pseudozysten mit ähnlich hohen Werten wie Pankreaskarzinome auf, aber auch Cholecystitiden und Gastritiden.

Bei unseren Ergebnissen waren neben Pankreatitiden, septischen Krankheitsbildern und Cholecystitiden auch Ovarialzysten mit hohen Wertelagen vertreten. Da sich die Bandbreiten der Wertelagen bei Personen mit benignen und malignen Erkrankungen fast vollständig überlappten, war im Einzelfall anhand der Werte keine diagnostische Aussage zu treffen. Dieser Sachverhalt stellt sich visuell in der nahezu Winkelhalbierenden ROC-Kurve dar und wird auch durch die geringe Sensitivität bei 95%iger Spezifität gegenüber Patienten mit benignen Erkrankungen objektiviert.

Aufgrund der unzureichenden Trennschärfe besonders zwischen Personen mit benignen und malignen Erkrankungen ist eine diagnostische Tauglichkeit des Parameters im klinischen Alltag nicht gegeben. Während hohe Werte allenfalls als allgemeiner Krankheitsindikator anzusehen sind, können aus niedrigen Werten überhaupt keine diagnostischen Schlüsse gezogen werden.

Abhängigkeit der Nukleosomenwerte von der Tumorlokalisation, Stagingkriterien und weiteren Charakteristika

Die Gruppe der Tumorpatienten wurde nach verschiedenen Gesichtspunkten weiter differenziert, um eventuell Subgruppen zu identifizieren, die ein typisches Wertemuster aufweisen. Dabei wurde die Lokalisation des Tumors sowie die bei Staginguntersuchungen relevanten Kriterien des Tumorstadiums, der Tumorgröße, des Lymphknotenbefalls, des Metastasierungsgrads, des Differenzierungsgrads der Tumorzellen und der histologischen Einordnung des Tumors berücksichtigt.

Die mit Ausnahme des Prostata-Karzinoms ähnlichen Werteverteilungen der verschiedenen Tumorarten bzw. -lokalisationen bestätigte die Unspezifität der Nukleosomenfreisetzung; die große Bandbreite der Werte spiegelte die Heterogenität innerhalb einer Tumorart wider. Rasch progrediente Tumoren mit häufig guter Perfusion wie das Bronchialkarzinom, aber auch das oft erst in fortgeschrittenem Stadium diagnostizierte Ovarialkarzinom fielen dabei durch höhere Werte, langsam und lokal wachsende Tumoren mit einem zum Diagnosezeitpunkt häufig kleinen Volumen hingegen mit niedrigen Wertlagen auf. Eine tendenziell ähnliche Beobachtung mit kleineren Personenzahlen wurde auch von Leon *et. al.* (Leon 1977) berichtet.

Hinsichtlich des Tumorstadiums, der Tumorgröße, des Lymphknotenbefalls, Metastasierungs- und Differenzierungsgrads konnten bei fast allen Tumorarten in unserer Untersuchung keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Diese Ergebnisse überraschten zunächst; waren doch bei größeren Tumoren in fortgeschrittenen Stadien höhere Nukleosomenwerte aufgrund des gesteigerten Zellumsatzes angenommen worden. Allerdings ist auch ein Szenario vorstellbar, das die hohen Werte bei kleinen Tumoren in frühen Stadien erklärt:

Eine hohe Zelltodrate ist zunächst noch in der Lage, die Zellzahl trotz einer bereits massiv erhöhten Proliferationsrate annähernd konstant zu halten. In der weiteren Tumorentwicklung gewinnt der proliferative Aspekt jedoch ein Übergewicht, da durch genetische Mutationen, beispielsweise von Bcl 2 oder p53, Resistenzmechanismen gegen die Zelltodinduktion oder –ausführung entstehen. Somit kommt es auch zu einem relativen Rückgang der Freisetzung von Zellbestandteilen. Mit zunehmender Invasivität wird umgebendes Gewebe durch Tumor-induzierten Zelltod zerstört, wodurch wieder vermehrt Zellbestandteile wie Nukleosomen ausgeschüttet werden. Bei einer anzunehmenden, ausgeprägten intra- und interindividuellen Heterogenität der ablaufenden Prozesse ist die mangelnde Einordnung der Tumorstadien und damit in Verbindung stehender Kriterien durch die Konzentration zirkulierender Nukleosomen im Serum verständlich.

Nichtsdestotrotz grenzte sich die Gruppe gastrointestinaler Tumoren als ganze davon ab. Bei ihnen zeigte sich eine Abhängigkeit der Nukleosomenwerte hinsichtlich des Tumorstadiums, der Tumorgröße und des Metastasierungsgrads in dem ursprünglich erwarteten Sinne von ansteigenden Wertlagen bei zunehmender Progredienz und Ausdehnung der Erkrankung. Von diesen drei Kriterien hatte der Metastasierungsgrad dabei den stärksten Einfluss auf die Nukleosomenwerte. Da bei unserer Evaluation der Anteil von Personen mit gastrointestinalen Tumoren an der Gesamtgruppe aller Tumorpatienten hoch war, fand sich auch dort eine Korrelation der Nukleosomenwerte mit Tumorstadium, -größe und Metastasierungsgrad; bei der Betrachtung ohne Berücksichtigung der gastrointestinalen Tumore verschwand dieser Zusammenhang. Möglicherweise findet bei dieser Subgruppe von Tumoren der Rückgang der ausgleichenden Zelltodrate schon in einem präkanzerösen Stadium statt, so dass der Zellumsatz als ganzes entscheidende Bedeutung erhält. Alternativ könnte gastrointestinalen Tumoren ein abweichendes Entwicklungsmodell zugrunde liegen.

Die Auswertung der Nukleosomenwerte nach dem histologischen Subtyp konnte nur unvollständig vorgenommen werden, da nicht bei allen Patienten feingewebliche Befunde vorlagen und bei einigen Tumorentitäten wie dem Ovarial-, Uterus- oder Nierenkarzinom vielfältige Einzelbefunde schwer zu kategorisieren waren. Bei Vergleich der zahlenmäßig am stärksten vertretenen Gruppen kristallisierte sich das Plattenepithelkarzinom mit deutlich höheren Werten gegenüber Adeno- und anderen Karzinomen heraus. In der Analyse einzelner Tumore konnte dieser Unterschied jedoch nicht nachvollzogen werden.

Leon *et. al.* (Leon 1977) konnten bei multiplen Tumoren ebenfalls keine Beziehung zwischen den DNA-Wertlagen und der Lokalisation oder Größe eines Tumors herstellen. Jedoch hatten Patienten mit metastasierten Tumoren signifikant höhere Werte als Patienten im nicht metastasierten Stadium. Auch Fournie *et. al.* (Fournie 1995) und Maebo *et. al.* Maebo (1990) wiesen bei Patienten mit metastasiertem Lungenkarzinom ebenfalls signifikant höhere Werte im Vergleich zum lokal begrenzten Lungenkarzinom nach. Hingegen fanden Kuroi *et. al.* (Kuroi 1999, 2001) bei Patientinnen mit Mammakarzinom weder eine Korrelation der Nukleosomenwerte mit dem Metastasierungsgrad, noch mit der Tumorgröße, dem Lymphknotenbefall, dem histologischen Subtyp, dem Hormonrezeptorstatus oder dem Menopausenstatus.

Bei allen genannten Studien wie auch bei unseren Untersuchungen zeigten sich große Überschneidungsbereiche der Wertlagen verschiedener Tumorstadien, wodurch die Trennschärfe limitiert wurde. Im individuellen Fall ist ein Einsatz der spontanen Nukleosomen-konzentration im Serum zu Stagingzwecken somit nicht sinnvoll.

Ursprung der Nukleosomen im Serum

Aus der im Serum quantifizierten Konzentration an Nukleosomen allein kann nicht unmittelbar auf deren Ursprung geschlossen werden. Sie können von Tumorzellen stammen, sofern diese Anschluss an das Gefäßsystem gefunden haben, außerdem von Zellen des den Tumor umgebenden Gewebes, aber auch allgemein von zirkulierenden Leukozyten, insbesondere von stimulierten oder apoptotischen Lymphozyten sowie von abgeschilferten Endothelzellen (Anker 1975; Stroun 2000; Jahr 2001; Lichtenstein 2001).

Qualitative Untersuchungen an zirkulierender DNA, die zumeist in nukleosomaler Form vorliegt, mittels Stabilitätsprüfung der Doppelstrangstrukturen zeigte, dass ein großer Anteil neoplastische Charakteristika aufweist (Stroun 1989). Auch wurden Mutationen an Onkogenen oder Tumor-Suppressor-Genen in tumoröser und plasmatischer DNA festgestellt, so zum Beispiel K-ras Mutationen beim Pankreas- (Sorenson 1994; Yamada 1998; Mulcahy 1998; Castells 1999), bei kolorektalen (Anker 1997), gastrointestinalen (Mulcahy 2000; Sorenson 2000), und Bronchial-Karzinomen (Cooper 1997; Schneider 2000) sowie bei der chronisch myeloischen Leukämie (Vasioukhin 1994). Ebenso wurden bei verschiedenen

Tumorarten Mikrosatellitenveränderungen in der DNA aus Tumorzellen wie auch im Plasma oder Serum nachgewiesen, so Bronchial- (Chen 1996; Sozzi 1999; Bruhn 2000; Gonzales 2000), HNO- (Nawroz 1996), Nierenzell- (Goessl 1998) und Mammakarzinom (Mayall 1999; Shaw 2000) sowie beim Melanom (Nakayama 2000). Des Weiteren konnten tumorspezifische, epigenetische Phänomene wie Hypermethylierungen von CpG-Inseln in Promotoren von Tumor-Suppressor-Genen häufig in Plasma-DNA von Tumorpatienten identifiziert werden (Baylin 1998, 2000; Esteller 1999, 2001; Herman 2000a,b).

Obwohl auf vielfältige Weise gezeigt werden konnte, dass plasmatische DNA tumorösen Ursprungs sein kann, gibt es unterschiedliche Angaben, wie groß deren Anteil an der gesamten im Serum oder Plasma zirkulierenden DNA ist. Während Studien, die ein häufig paralleles Vorkommen von tumor-spezifischen Veränderungen an DNA aus dem Tumorgewebe und dem Plasma konstatierten, von einem hohen Prozentsatz tumoröser DNA im Plasma ausgehen (Chen 1996, Nawroz 1996, Goessl 1998), schätzen Studien, bei denen jene Veränderungen seltener in Plasma-DNA vorzufinden waren, den Anteil von tumoröser DNA geringer ein (Anker 1997).

Jahr *et. al.* untersuchten plasmatische DNA von Personen mit verschiedenen Tumoren nach mehreren genetischen, tumor-spezifischen Merkmalen und identifizierten damit zwischen 3% und 93% als DNA tumorösen Ursprungs. Dabei wurde ein hoher prozentualer Anteil von Tumor-DNA bei Personen beobachtet, die geringere Absolutwerte an Plasma-DNA aufwiesen, hingegen kleinere Anteile von Tumor-DNA bei Personen, die sehr viel höhere Absolutwerte hatten (Jahr 2001). Als weitere DNA-Quelle kam das Tumor-umgebende Gewebe in Frage, das jedoch qualitativ schwer zu charakterisieren ist. T-Lymphozyten und Endothelzellen wurden von Jahr *et al.* durch spezifische Marker als Ursprung zirkulierender DNA nahezu ausgeschlossen (Jahr 2001).

Eine einfache Methode, den Anteil tumoröser DNA abzuschätzen, bietet sich mit der parallelen Bestimmung von Tumor-assoziierten Antigenen an, die von Tumorzellen sezerniert werden (wie NSE oder PSA) oder die von Zugrundegehenden Zellen freigesetzt werden (wie Cytokeratine). Korrelationen der DNA-Plasma-Konzentration wurden bereits mit der NSE und LDH beim Bronchialkarzinom gefunden (Fournie 1995).

Freisetzung und Migration der Nukleosomen in die Blutbahn

Auf welche Art die entsprechenden Tumor- oder Gewebezellen zugrunde gehen und DNA beziehungsweise Nukleosomen freisetzen, ist anhand der im Serum oder Plasma vorgefundenen nukleosomalen DNA nicht einfach nachzuvollziehen, zumal Endonukleasen im Blut eine weitere Fragmentierung und Degradierung der Nukleosomen bewirken. Auch wird mit zunehmender Kenntnis der vielfältigen Zelltodformen, die gewebe-spezifischen Eigenheiten unterliegen können, die Zuordnung komplexer und unübersichtlicher (Leist 2001).

In der vereinfachenden Dichotomie zwischen Apoptose und Nekrose machten Jahr *et. al.* Aufgrund der überwiegend mono- und oligonukleosomalen Grundstruktur plasmatischer DNA, die sie auch in einem Zellkulturexperiment durch artifizielle Apoptose-Induktion erhielten, vor allem apoptotischen Zelltod für die Freisetzung plasmatischer DNA verantwortlich. Artifizielle Nekrose-Induktion führte im Zellkulturexperiment zur Ausschüttung größerer polynukleosomaler Fragmente, die sie im Plasma von Tumorpatienten nur in geringem Maß vorfanden (Jahr 2001). Auch wenn mit diesem Versuch nur eine Annäherung an die realen, komplexen Gegebenheiten gelingt, wird dabei doch der Einfluss von apoptotischen oder Apoptose-ähnlichen Zelltodformen für die Freisetzung von Nukleosomen ins Serum oder Plasma deutlich.

Nur wenig ist derzeit darüber bekannt, auf welche Weise Nukleosomen nach ihrer Freisetzung schließlich in die Blutbahn gelangen. Aufgrund der effektiven Phagozytose apoptotischer Zellbestandteile durch Nachbarzellen und Makrophagen müssten sie während oder kurz nach Absterben der Zelle inkorporiert und abgebaut werden (Wyllie 1980a; Kerr 1994).

Möglicherweise kommt es bei einem Tumor mit zunehmendem Wachstum zu einem Sauerstoff-Engpass aufgrund einer unzureichenden Vaskularisation. Dabei sterben im und um den Tumor ein Vielzahl von Zellen ab. Durch dieses ausgeprägte Zelltodvorkommen sind die Eliminationsmechanismen möglicherweise überfordert oder sie sind in ihrer Effizienz im Tumor-nahen Bereich eingeschränkt. Außerdem können die außerhalb der apoptotischen Körperchen freigesetzten Fragmente nicht mit einem Phagozytose-Signal opsoniert und somit schwerer zu erkennen sein. Sofern die Nukleosomen den Entsorgungsmechanismen entkommen, können sie einen Zugang in die Blutbahn finden. Auf welche Weise sie dorthin gelangen, wie sie sich vor einer späteren Beseitigung schützen und ob sie eine physiologische Aufgabe besitzen, wird sich erst noch zeigen müssen.

Klinische Wertigkeit der Nukleosomen bei Longitudinaluntersuchungen

Durch die unspezifische und interindividuell heterogene Freisetzung der Nukleosomen eignet sich die Nukleosomenkonzentration im Serum erwartungsgemäß nicht für diagnostische oder differentialdiagnostische Zwecke. Ähnlich wie bei anderen generellen Zelltodmarkern wie der Laktatdehydrogenase (LDH) könnte jedoch der intraindividuelle Longitudinalverlauf wichtige Informationen über den Verlauf einer Krankheit, das Ansprechen einer Therapie oder die Entwicklung eines Rezidivs bieten. Die Voraussetzung dafür wurde durch die Stabilität der Werte bei gesunden Personen im Tages- und Wochenverlauf geschaffen.

Kinetik bei Patienten mit akuten Infekten während Antibiose

Im Verlauf von bakteriell entzündlichen Erkrankungen stiegen in der Akutphase die Nukleosomenwerte – oft parallel oder leicht verzögert zum C-reaktiven Protein – stark an. Auslöser dieser enormen Nukleosomenfreisetzung sind vermutlich die Bakterien selbst, die in neutrophilen Granulozyten Zellen des Retikulo-Endothelialen Systems (RES) oder Gewebzellen Zelltod induzieren: Während im Zusammenhang mit *Escherichia coli*-, *Staphylokokkus aureus*- und *Shigella flexneri*-Infektionen apoptotische Prozesse beschrieben wurden, verursachten *Pseudomonas aeruginosa* auch onkotischen Zelltod in RES-Zellen (Kim 1998; Watson 1996; Hofer 1996; Zychlinsky 1992; Dacheux 2000).

Auf diese Angriffe der Bakterien reagiert der Organismus mit einer Erhöhung der Akut-Phase Proteine, unter anderem dem C-reaktiven Protein (CRP), und mobilisiert das unspezifische und spezifische Immunsystem. Eine erfolgreiche Abwehr der infektiösen Antigene wie auch der effiziente Einsatz antibiotischer Medikamente zeigt sich an der Reduzierung der Bakterienzahl; in der Folge gehen weniger humane Zellen zugrunde, wodurch auch die Freisetzung von Nukleosomen abnimmt. Die Abwehrreaktion einschließlich der Erhöhung der Akut-Phase Proteine wird rückläufig und eine Besserung des Befindens tritt ein. Mit diesem Szenario geht der Verlauf der Nukleosomenkonzentration im Serum bei den meisten der untersuchten Verläufe in Einklang. Ebenso ist die häufig anzutreffende Parallelität zum CRP einsichtig.

Ein Ausbleiben des Anstiegs der Nukleosomenwerte wurde bei einem Patienten mit massiver Panzytopenie beobachtet. In diesem Fall fehlte den Bakterien der Angriffspunkt oder die Aktivierung des Immunsystems erfolgte nur eingeschränkt.

Bei Patienten mit bakteriellen Infekten kann die Verlaufsbestimmung der Nukleosomen im Serum als zusätzlicher Parameter zur Abschätzung der Akuität der Erkrankung herangezogen werden. Allerdings ist dabei auf den Zusammenhang mit dem CRP und den Leukozyten zu achten. Einem eventuellen klinischen Einsatz sollten unbedingt Studien mit definierten Erkrankungen und Therapieschemata vorangehen, bei denen besonderes Augenmerk auf den Vergleich mit anderen laborchemischen Parametern – insbesondere mit Zytokinen – gelegt wird. Bisher ist lediglich eine vorläufige Studie zur Bestimmung von DNA im Plasma von wenigen Patienten mit Sepsis veröffentlicht, die jedoch keine Verlaufsbeobachtungen beinhaltet (Martins 2000). Jedoch ist der Effekt der Nukleosomenfreisetzung nach Exposition gegenüber bakteriellen Lipopolysacchariden, Hepatitis-A Viren bzw. zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen aus Experimenten am Tiermodell sowie in Zellkulturen bereits länger bekannt (Bret 1990; Boender 1989). Die Nukleosomen- bzw. DNA-Konzentration im Plasma und Serum wurde von Bret *et. al.* und Boender *et. al.* deshalb als Index für die *in vivo* Zytotoxizität beschrieben.

Kinetik bei Patienten mit malignen Tumoren nach operativer Therapie

Bei operativen Eingriffen sind die Einflüsse mehrerer Faktoren auf die Nukleosomenfreisetzung ins Serum zu beachten: Da durch die Tumorektomie die vermutlich ursprüngliche Quelle der Nukleosomen entfernt wird, sollte die postoperative Nukleosomenkonzentration im Serum unter den prätherapeutischen Werten liegen. Allerdings sanken die Werte nur selten in Wochenfrist unter das prätherapeutische Niveau ab. Dies deutet darauf hin, dass intraoperative Prozesse zu einer nachhaltigen Nukleosomenfreisetzung führten oder die Elimination der Nukleosomen aus dem Blut reduzierten.

Besonders durch chirurgische Interventionen großen Ausmaßes wie intraabdominale oder – thorakale Eingriffe werden erhebliche Gewebeschäden verursacht, die eine perioperative Erhöhung der Nukleosomenwerte erklären. In unseren Untersuchungen war tatsächlich bei vielen Patienten während oder nach der Operation ein Anstieg der Werte zu beobachten, der von interindividuell unterschiedlicher Ausprägung und Dauer war. Allerdings zeichnete sich keine Korrelation eines typischen Werteverlaufs mit bestimmten Operationsvarianten ab.

Als zusätzliche Einflussgröße spielt die ebenfalls interindividuell sehr heterogene Akutreaktion des Organismus auf die Operation eine wesentliche Rolle: Das Alter des Patienten, Begleiterkrankungen, Vortherapien, die Dringlichkeit des Eingriffs sowie die aktuelle körperliche Verfassung des Patienten sind dafür von Bedeutung.

Komplikation infektiöser Art können bereits intraoperativ, bevorzugt jedoch etwa eine Woche nach der Intervention auftreten. Wie bei Patienten mit akut infektiösen Erkrankungen bereits geschildert, können dadurch große Mengen an Nukleosomen freigesetzt werden, die dann – wie bei mehreren Patienten ersichtlich ist – eine postoperative Erhöhung der Serumwerte mit einer etwa einwöchigen Verzögerung zur Folge haben. In mehreren Fällen entwickelten sich die CRP- oder Leukozytenwerte parallel zu den Nukleosomenwerten.

Neben den typischen Verläufen mit postoperativem Anstieg und langsamem Abfall fielen die Werte bei einigen Patienten, durchaus mit ausgedehnten Eingriffen, primär ab. Abgesehen von der individuellen Komponente eines jeden Falles, könnte der Anstieg zeitlich übersprungen, das Eliminationssystem der Nukleosomen durch die Operation weniger beeinträchtigt, die Akutreaktion weniger stark ausgeprägt oder keine Komplikationen aufgetreten sein.

Die Bedeutung und Relevanz der Nukleosomenkinetik für den Einsatz im klinischen Alltag ist durch die vielen Einfluss nehmenden Faktoren vor, während und nach dem operativen Eingriff sicher nur begrenzt. Möglicherweise können in der Frühphase Patienten identifiziert werden, die im weiteren Verlauf Komplikationen entwickeln. Dafür bedarf es jedoch größerer Studien, die Patienten mit definierten Erkrankungen und vergleichbaren Interventionen sowie einen Vergleich mit anderen laborchemischen Entzündungsparametern einschließen.

Ostermeier *et. al.* untersuchten bereits die Nukleosomenkonzentration im Plasma von 20 Patienten 24 Stunden nach einem größeren chirurgischen, gastrointestinalen Eingriff. Sie fanden deutlich höhere Werte als bei gesunden Kontrollpersonen, ebenso eine vermehrte Expression des CD95-Antigens. Allerdings führten sie keine Korrelationen mit den weiteren klinischen Verläufen oder eventuellen Komplikationen durch (Ostermeier 1999).

Kinetik bei Patienten mit malignen Tumoren während Chemotherapie

Die bei systemischen und metastasierten, soliden Tumorerkrankungen zur Anwendung kommenden chemotherapeutischen Strategien haben die gezielte Induktion von Zelltod in Tumorzellen zum Ziel. Aufgrund der systemischen Wirkung auf alle schnell proliferierenden Zellen werden jedoch auch Lymphozyten, hämatopoetische Vorläuferzellen, Darmepithelien und Zellen der Spermatogenese lethal geschädigt (Hendry 1997).

Der häufig nur wenige Tage nach der Applikation chemotherapeutischer Medikamente festgestellte steile Anstieg der Nukleosomenkonzentration im Serum ist somit auf die enorme Freisetzung aus zugrunde gehenden Tumorzellen wie auch aus normalen Blut- und Gewebezellen zurückzuführen.

Zelltodinduktion durch Zytostatika

In physiologischer Dosierung induzieren viele Zytostatika in den Zielzellen apoptotischen Zelltod (Mesner 1997b; Hannun 1997; Savitz 1998; Seiter 1998; Tolis 1999; Mani 2000; Pace 2000; Eichhorst 2001; Stahnke 2001). Während einige Chemotherapeutika direkt über eine Interaktion mit DNA, RNA oder Proteinen sowie über einen Eingriff in den Zellzyklus ihre Wirkung entfalten, wurde bei mehreren eine Einbeziehung des Fas/APO-1/CD95 System nachgewiesen, welches die Vermittlung des Zelltodsignals übernimmt (Fulda 1998b; Friesen 1999, Debatin 1999). Je nach Zelltypus sowie Art und Dosierung der Medikamente werden jedoch auch eine Fas/APO-1/CD95-unabhängige Zelltodinduktion wie auch gänzlich andere Zelltodformen mit onkotischen oder gemischten Anteilen beobachtet (Hannun 1997; Granville 1998; Fulda 2001b; Herr 2001; Leist 2001).

Das zeitliche Auftreten wie auch die Ausprägung der maximalen Zelltodinduktion variierte sowohl bei Verwendung verschiedener Medikamente in einem definierten Tumor wie auch bei Verwendung eines definierten Präparats bei verschiedenen Tumoren und der Verwendung unterschiedlicher Dosierungen eines definierten Zytostatikums: Für Cisplatin wurden ein Maximum 12 bis 48 Stunden nach der *in vivo*-Verabreichung an Mäuse mit Mamma- und Ovarialkarzinomen beschrieben. Dabei stieg die Zelltodrate in den ersten 12 bis 18 Stunden steil an, blieb dann auf hohem Niveau und fiel nach 48 Stunden langsam ab. Nach 72 Stunden waren wieder die ursprünglichen Werte erreicht. Eine Steigerung der Dosierung führte zu höheren Zelltodraten und einer größeren Latenz bis zum Eintreten des Maximums (Meyn 1995).

Ähnliche Verhältnisse ergaben sich für Taxol bei Mäusen mit Mamma- und Ovarialkarzinomen: Während die Apoptoserate nach der ersten Taxolgabe um mehr als das Vierfache anstieg, war sie nach der zweiten Gabe nur geringfügig erhöht (Milas 1995). Bei der Anwendung von Cyclophosphamid bei den oben genannten Mausmodellen trat das Maximum bereits nach 12 bis 24 Stunden auf (Meyn 1994a).

Auftreten und Elimination von Nukleosomen im Serum

Wird zu den Maxima dieser anhand histologischer Kriterien quantifizierten Apoptoseraten eine zusätzliche Frist für die Desintegration der Zellmembran, die Freisetzung der Nukleosomen in den extrazellulären Raum und die Migration in Blutgefäße eingerechnet, stimmt das in unseren Untersuchungen bei vielen Patienten beobachtete Maximum der Nukleosomenkonzentration im Serum nach 24 bis 72 Stunden mit diesen experimentellen Daten überein. Auch erklären sich dadurch interindividuelle Unterschiede aufgrund unterschiedlicher Tumorarten sowie Art und Dosierung der eingesetzten Zytostatika. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, müssten somit Patienten mit definierten Tumorerkrankungen und Therapieschemata untersucht werden.

In der Literatur finden sich nur wenige Verlaufsuntersuchungen mit zirkulierenden Nukleosomen oder DNA, dazu an geringen Patientenzahlen: Kuroi *et. al.* bestimmten die Nukleosomenkonzentrationen im Plasma von vier Patientinnen mit rezidivierendem Mammakarzinom, die mit Taxol behandelt wurden, und konnten einen Anstieg 24 Stunden nach Therapiebeginn feststellen. Nach 72 Stunden waren wieder die ursprünglichen Ausgangswerte erreicht (Kuroi 2001).

Auch in unseren Untersuchungen sanken die Nukleosomenwerte schon bald nach Beendigung des jeweiligen Behandlungszyklus mehr oder weniger schnell auf ein niedriges Niveau ab, das vermutlich die spontane Nukleosomenfreisetzung widerspiegelte. Für die Geschwindigkeit und den Grad des Werterückgangs ist neben dem Nachlassen der Zelltod-induzierenden Wirkung der Zytostatika die Intaktheit und Effizienz der Eliminationsmechanismen von Nukleosomen aus dem Blut von wesentlicher Bedeutung.

Gelegentlich beobachtete protrahierte Anstiege mit späten, langsamen Abfällen konnten neben einer verzögerten Zelltodinduktion auch durch eine insuffiziente Elimination oder

infektiöse Überlagerungen hervorgerufen werden. Da jedoch myelosuppressive Nebenwirkungen, die infektiöse Komplikationen begünstigen, meist erst nach zehn bis 14 Tagen in Erscheinung traten, konnte der Therapie-induzierte Effekt von Infektions-bedingten Unregelmäßigkeiten der Nukleosomenwerte in der Regel gut abgegrenzt werden.

Der klassische Verlauf mit einem schnellen Anstieg und darauf folgenden Abfall der Werte war in ähnlicher Form oft auch in den folgenden Zyklen zu beobachten. Häufig waren die Veränderungen der Nukleosomenkonzentration im Serum geringer ausgeprägt. Besonders bei Patienten mit einer Rückbildung des Tumors nahmen sowohl die präzyklischen Ausgangswerte wie auch die durch die Therapie induzierten Anstiege im weiteren Therapieverlauf ab. Dies kann als Rückgang der spontanen Freisetzung von Nukleosomen sowie der Anzahl Zytostatika-sensibler Zellen bei abnehmender Tumormasse gewertet werden. Bei Patienten mit progredienter Erkrankung hingegen waren die präzyklischen Ausgangswerte häufig nicht rückläufig als Ausdruck einer verbleibenden oder zunehmenden Aktivität des Tumors. Ebenso zeigten sich auch im weiteren Verlauf oft starke Wertanstiege, die auf die Zahl nachgebildeter sensibler Tumorzellen schließen ließen.

Allerdings konnten die Therapie-induzierten Nukleosomenerhöhungen auch auf den Verlust von Lymphozyten oder anderen chemosensiblen Zellen zurückgehen: So wurde bei einigen Patienten während postoperativ adjuvanter Chemotherapie, bei denen allenfalls noch geringe Tumorreste vorhanden waren, hohe Wertlagen nach Applikation der Therapie erreicht. Da dieses Phänomen nur bei einem Teil der postoperativ chemotherapierten Patienten auftrat, könnte die hohe Sensibilität von physiologischen Blut- oder Gewebezellen für den weiteren Krankheitsverlauf von Bedeutung sein (Hendry 1997).

Andererseits zeigten einige Patienten mit progredienter Tumorerkrankung einen Abfall der spontanen wie auch ein Ausbleiben der Therapie-induzierten Zelltodrate und Nukleosomen-freisetzung. Während der Tumorigenese, der weiteren Progression und besonders während antitumoröser Therapie finden eine Vielzahl von Mutationen – auch in Zelltod-regulierenden Gensequenzen – statt. So entwickelte Resistenzen gegenüber der Apoptose-Induktion bieten Tumorzellen Überlebensvorteile und gewähren ihnen Immunität gegenüber chemotherapeutischen Attacken (Sinicrope 1995; Reeve 1996; Weller 1998; Eliopoulos 1998; Müller 1998; Ferreira 1999; Sigal 2000; Sierra 2000; Shi 2002).

Am bekanntesten sind p53- und Bcl-2 Mutationen. Mutante p53 Zellen besitzen eine erhöhte Chemoresistenz beim Ovarial- (Buttista 1997), Rektum- (Sakakura 1998) und Bronchialkarzinom (Hashimoto 1999; Mitsudomi 2000) ferner beim Mammakarzinom (Clahsen 1998), Sarkom (Goto 1998) und gastrointestinalen Karzinomen (Lenz 1998). Andere Autoren fanden keine direkte Korrelation zwischen p53-Mutationsstatus und Resistenz gegenüber Zytostatika (reviewed in Ferreira 1999). In vielen Tumorarten wurde auch der Einfluss der Bcl-2 Familie auf die Chemosensitivität untersucht. Bei lymphatischen Erkrankungen kam dem Verhältnis von proapoptotischem Bax zu antiapoptotischem Bcl-2 große Bedeutung zu. Bei Überwiegen von Bax wurde ein deutlich besseres Ansprechen der Chemotherapie berichtet als bei einer vornehmlichen Präsenz von Bcl-2 (Stoetzer 1996). Auch wurde mehrfach eine prognostische günstige Bedeutung von Bax, hingegen eine ungünstige für Bcl-2 beschrieben (reviewed in Konstantinidou 2002). Eine direkte Korrelation wurde zwischen der Expression von Bcl-2 und der Chemosensitivität bei verschiedenen Tumorarten hergestellt, so beim Bronchial- (Pezzala 1993), Ovarial- (Herod 1996), Mamma-Karzinom (Silvestrini 1994), Non-Hodgkin's Lymphom (Hermine 1996), und bei weiteren Tumoren unterschiedlichen Ursprungs (reviewed in Decaudin 1997 und Reed 1997). Daneben wurden auch Mutationen des Fas/APO-1/CD95-Rezeptorsystems, der am DISC beteiligten Komponenten sowie der Caspasen-Kaskade bei chemoresistenten Zelllinien nachgewiesen (Los 1997; Fulda 1998a; Zheng 1999; Igney 2002).

Bei einer derartigen Resistenzentwicklung vor oder während der durchgeführten Chemotherapie sind keine starken Erhöhungen der bei Apoptose freigesetzten Zellbestandteile, wie den Nukleosomen, im Blut zu erwarten. Dementsprechend können die spontanen Werte trotz progredienter Erkrankung abfallen. Ebenso resultieren dann während der Zyklen nur geringe Veränderungen der Nukleosomenmenge im Serum.

Abweichend vom klassischen Verlauf wurden darüber hinaus bei unseren Untersuchungen in einigen Fällen schon während des ersten Zyklus primär abfallende Nukleosomenwerte ohne den charakteristischen Anstieg vorgefunden. Besonders einige Patienten mit einer lymphatischen Neoplasie hatten bereits prätherapeutisch stark erhöhte Werte, die während der Therapie steil abfielen. Hier überdeckte die initial hohe, spontane Zelltoderate den Therapie-induzierten Effekt; der Abfall spiegelte den Rückgang der in der Zirkulation befindlichen Zellpopulation mit hohem Zellumsatz wider.

Korrelation der Nukleosomenkinetik mit dem klinischen Ansprechen auf Chemotherapie

Das Ansprechen der Chemotherapie bei den untersuchten Patientengruppen entsprach weitgehend den Erwartungen: In der Gruppe der Patienten mit Bronchialkarzinom befand sich ein großer Anteil von Patienten mit bereits fortgeschrittener, metastasierter Erkrankung, bei denen *per se* eine palliative Therapiesituation vorliegt. Somit sind die Ansprechraten beim nicht-kleinzelligen Karzinom von 50% als überdurchschnittlich zu werten. Hingegen wäre beim kleinzelligen Karzinom eine höhere Therapieerfolgsquote als 30% zu erwarten, zumal es sich meist um Primärtherapien handelte, die in der Regel eine deutliche Tumorreduktion bewirken.

Auch bei Patienten mit kolorektalen Karzinom zeigten sich erhebliche Unterschiede der Ansprechraten zwischen lokal begrenzten und metastasierten Tumorerkrankungen. Im Gegensatz zum Bronchialkarzinom hatten primäre Therapien weniger Erfolg als Rezidivtherapien. Jedoch waren die Patientenzahlen in den Vergleichsgruppen ungleich und gering. Am besten sprachen Patienten auf eine adjuvante Therapie an, wobei auffällt, dass alle Patienten mit einem Tumor im Dukes C-Stadium rezidivfrei blieben, während Tumore im Dukes D-Stadium auch unter Therapie progredient waren.

Bei Patienten mit Lymphomen wurde erwartungsgemäß eine hohe Therapieansprechraten beobachtet. Davon hoben sich lediglich Patienten mit Rezidivtherapie mit einer niedrigeren Erfolgsquote ab. Hinsichtlich der Stadieneinteilung ergaben sich nur geringe Unterschiede.

In der Gruppe der sonstigen Karzinomen sammelten sich mit dem Pankreas-, Ösophaguskarzinom sowie dem Sarkom Tumorarten mit ohnehin schlechter Chemotherapie-Ansprechraten, die sich dazu alle in metastasierten Stadien befanden und zumeist schon eine Rezidivtherapie erhielten. Somit ist die schlechte Erfolgsquote nicht erstaunlich.

Auswahl der Blutabnahme-Zeitpunkte und der Parameter für die spontane und Therapie-induzierte Nukleosomenfreisetzung

Die Zeitpunkte der Blutentnahme wurden so gewählt, dass einerseits anhand der Basiswerte vor jedem neuen Therapiezyklus der Verlauf der spontanen Nukleosomenfreisetzung kontrolliert werden konnte. Andererseits wurden während des ersten Zyklus und nach

Möglichkeit auch bei den weiteren Zyklen zumindest der vortherapeutische Werte sowie die Werte an den Therapietagen zwei und vier erhoben, da initial engmaschigere Blutabnahmen gezeigt hatten, dass sich der Therapie-induzierte Effekt dadurch abbilden ließe.

Als limitierend für den Vergleich der Therapie-induzierten Nukleosomenfreisetzung zwischen Patienten einer Tumorgruppe wie auch verschiedener Tumorgruppen erwies sich die Verwendung unterschiedlicher Therapieschemata. Da die maximale Zelltodinduktion für verschiedene Substanzen zeitlich variiert (Meyn 1994a, 1995; Kanduc 2002), konnte nicht gewährleistet werden, dass mit diesem Blutabnahmeschema auch die maximale Nukleosomenfreisetzung erfasst wurde. Auch erstreckten sich die Therapieprotokolle über unterschiedlich lange Zeiträume, so dass die Beobachtungsdauer nicht einheitlich war. Für zukünftige, vergleichende Untersuchungen sollte deshalb unbedingt auf eine genaue Definition der Tumorerkrankungen und –stadien sowie der Therapieschemata und Abnahmemodalitäten geachtet werden.

Die spontane Nukleosomenfreisetzung als Ausdruck der Aktivität des Tumors kann bestimmt werden, wenn kein Einfluss einer Therapie oder eines akut entzündlichen Prozesses vorliegt. Da aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit die durch die Therapie freigesetzten Nukleosomen in den mehrwöchigen Therapiepausen mit hoher Wahrscheinlichkeit entfernt werden, geben die Basiswerte vor jedem therapeutischen Zyklus die momentane spontane Nukleosomenkonzentration im Serum wider, die auf dem Zellumsatz des Tumors basiert.

Zur vergleichenden Bewertung eignen sich außerdem die Quotienten der Basiswerte mit dem Ausgangswert. Für die vorliegende Auswertung wurden die Basiswerte der ersten drei Zyklen sowie die Quotienten der Basiswerte des zweiten und dritten Zyklus‘ mit dem ersten herangezogen. Da bei Beginn einer Therapie die stärkste Reduzierung der Tumorzellzahl vermutet wurde, sollten sich in diesen Indikatoren die größten und aussagekräftigsten Veränderungen zeigen. Zusätzlich wurde der Basiswert zum Zeitpunkt der Staginguntersuchungen als Endpunkt in die Auswertung aufgenommen. Um die Dauer und Geschwindigkeit des Werteabfalls zu berücksichtigen wurde der absolute und prozentuale tägliche Abfall sowie die Halbwertszeit rechnerisch ermittelt.

Akute infektiöse Komplikationen führten meist zu einer Verschiebung des geplanten Therapiezyklus, so dass bei der Weiterbehandlung – bis auf wenige Fälle – keine Verfälschung der Nukleosomenwerte dadurch zu erwarten waren. Selten wurde die Therapie trotz eines Infektes durchgeführt. Dann wurden die Werte nicht in die Auswertungen eingeschlossen.

Für die Beurteilung der Therapie-induzierten Nukleosomenfreisetzung kamen eine Reihe von Parametern wie die Latenz, Höhe und Steilheit des Anstieges, die Verzögerung und Geschwindigkeit des Abfalls und die erreichten Minimalwerte in Frage. Um eine Vergleichbarkeit der Verläufe trotz der unterschiedlichen Therapieschemata und Therapiedauer zu erhalten, wurde die Auswertung der Therapie-bedingten Veränderungen der Nukleosomenkonzentration im Serum auf das während der Behandlung erreichte Maximum und dessen Verhältnis zum Ausgangswert beschränkt. Für weitere Studien empfiehlt sich die Einhaltung eines strikten Blutabnahme-Programms um die Vergleichbarkeit zu erhöhen und die Anstiegssteilheit und Abfallsgeschwindigkeit direkt bestimmen zu können.

Korrelation der Parameter für die spontane und Therapie-induzierte Nukleosomenfreisetzung mit dem Therapieverlauf während Chemotherapie

Wie schon nach den Ergebnissen der Querschnittsuntersuchung mit der großen Bandbreite an prätherapeutischen Nukleosomenkonzentrationen im Serum zu vermuten war, konnte anhand der Basiswerte vor dem ersten Zyklus weder bei der Gesamtbetrachtung aller Tumore noch einzelner Untergruppen das Ansprechen der Therapie vorhergesagt werden. Auch hinsichtlich der Maximalwerte fand sich bei Patienten mit Remission wie auch mit Progression ein breites Spektrum an Wertlagen. Weder anhand der absoluten Maximalwerte noch der prozentualen Anstiege bezüglich des prätherapeutischen Basiswertes konnte die Therapieeffizienz eingeschätzt werden.

Die Wirkung der Therapie zeigte sich angedeutet bei den Basiswerten vor dem zweiten und stärker dann vor dem dritten Zyklus und zum Zeitpunkt der Staginguntersuchungen. Hier hatten Patienten mit einer Remission deutlich niedrigere Nukleosomenwerte. Dies ist durch eine effiziente Reduktion der Tumormasse und/oder -aktivität – einhergehend mit einer verminderten Nukleosomenfreisetzung – erklärbar.

Die Abnahme der Basiswerte drückt sich auch in den Quotienten der Basiswerte vor dem zweiten, dritten Zyklus und zum Zeitpunkt der Staginguntersuchungen jeweils mit dem prätherapeutischen Basiswert aus. Besonders eindrucksvoll sind die Ergebnisse zum Zeitpunkt der Staginguntersuchungen, bei denen ca. 90% der Patienten mit einer Remission Nukleosomenwerte unterhalb der 95% Perzentile von gesunden Personen (<100 AU) und einen Abfall von mehr als 50% bezüglich des Ausgangswertes aufwiesen im Vergleich zu nur je 25% der Patienten mit progredienter Erkrankung. Nukleosomenwerte über 200 AU zum Zeitpunkt der Staginguntersuchungen wurde bei keinem, ein Anstieg der Werte im Vergleich zum prätherapeutischen Basiswert nur bei einem Patienten mit Remission vorgefunden. Anhand dieser Kriterien der spontanen Nukleosomenfreisetzung ließ sich somit mit großer Treffsicherheit das Vorliegen einer Progression erkennen.

Allerdings wurden niedrige Werte zum Zeitpunkt der Staginguntersuchungen und starke Abfälle der Basiswerte in mehreren Fällen auch bei Patienten mit progredienten Erkrankungen beobachtet, so dass eine positive Bestätigung einer Remission mittels der Nukleosomenkinetik nicht möglich war. Die unterschiedlichen Nukleosomenverläufe bei progredienten Tumorerkrankungen konnten einerseits durch die Zunahme der Aktivität und des Zellumsatzes, andererseits durch neu auftretende Resistenzen gegen endogene oder Therapie-bedingte Zelltodinduktion erklärt werden.

Da die Staginguntersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten im Therapieverlauf durchgeführt wurden, war für die Bewertung der Therapieeffizienz die Beurteilung des gesamten Nukleosomenverlaufs sinnvoll und notwendig. Bei einer Remission sanken die Werte nach eventuell temporärem Anstieg in niedrige Wertebereiche ab und stiegen mit Ausnahme von infektiösen Komplikationen nicht mehr an. Bei einer Progression sanken die Werte meist nicht so deutlich ab, stiegen primär oder sekundär nach einem temporären Abfall an oder zeigten einen Verlauf mit stark schwankenden Werten. In Einzelfällen traten jedoch bei progredienten Patienten auch falsch-negative Befunde auf.

Etwas detaillierter ließ sich die Nukleosomenkinetik durch den absoluten und prozentualen täglichen Abfall der Werte sowie durch die Halbwertszeit beschreiben. Dabei wurde insbesondere die Geschwindigkeit des Werteabfalls berücksichtigt, die für Patienten mit Remission

deutlich größer war als für Patienten mit Progression. Für letztere wurde für alle drei Variablen im Median ein negativer Abfall verzeichnet, was *de facto* einem Anstieg entspricht.

Da aus einer Analyse der klinischen Daten hervorging, dass Patienten mit soliden Tumoren ohne Fernmetastasen oder Lymphomen signifikant besser auf die Chemotherapie ansprechen als Patienten mit bereits metastasierten, soliden Tumoren, wurden die Parameter der Nukleosomenkinetik zusätzlich innerhalb dieser Subgruppen untersucht. Dabei zeigte sich, dass mehrere Variable – darunter der Basiswert bei Therapieende, das Verhältnis der Basiswerte bei Therapieende und -anfang, der absolute und prozentuale tägliche Abfall der Werte sowie die Halbwertszeit – auch in der klinisch günstigen und ungünstigen Gruppe zwischen Patienten mit Remission und Progression zu unterscheiden vermochten. Somit eröffnet die Nukleosomen-kinetik neben den klinischen Daten neue Informationsquellen, die zur Beurteilung der Therapieeffizienz geeignet sind. Diese Ergebnisse gewinnen insbesondere weiter an praktischer Relevanz, da die Parameter ungeachtet der klinischen Gruppierung einen wechselseitigen, additiven Einfluss auf das Therapieansprechen aufweisen. Um die Sicherheit der Bewertung der Therapieeffizienz zu erhöhen, können deshalb zu den klinischen Rahmendaten gleichzeitig mehrere voneinander unabhängige Variablen der Nukleosomenkinetik herangezogen werden. Besonders viel versprechend ist dabei die Kombination der Kinetik vom Therapieanfang bis zum -ende sowie dem absoluten Wert zum Zeitpunkt der Staginguntersuchungen bzw. des Therapierendes, die die besten prädiktiven Ergebnisse erzielten.

Ähnliche Studien, die eine systematische Bewertung der Therapieeffizienz anhand der Kinetik der DNA- oder Nukleosomenkonzentration im Blut bei Chemotherapie vornehmen, sind bislang in der Literatur nicht beschrieben.

Kinetik Tumor-assoziiertes Antigen bei Patienten mit malignen Tumoren während Chemotherapie

Bei der Bewertung der Verläufe Tumor-assoziiertes Antigen wurden einige Prämissen gewählt, welche die komplexe, individuelle Beurteilung der Verläufe im klinischen Alltag vereinfacht und vergleichbar macht. Allerdings sind der Schematisierung Grenzen gesetzt, die zum einen auf der Unterschiedlichkeit der Tumor-assoziierten Antigen in ihrer

Beschaffenheit, Freisetzung, Metabolisierung und Elimination beruhen, zum anderen auf die Verschiedenartigkeit der verglichenen Tumorentitäten in Aggressivität, Proliferation, Invasivität und Therapierbarkeit zurückzuführen sind.

Eine inzwischen auch im Routinealltag übliche Vorgehensweise ist die Identifizierung eines „führenden Parameters“, der für die Therapieeffizienzkontrolle oder die Erkennung eines Rezidivs in der Nachsorgesituation herangezogen wird. Allerdings besitzen bei einigen Tumoren verschiedene Parameter additive Information, wie die NSE und ProGRP beim kleinzelligen Bronchialkarzinom, so dass dann in der Regel beide Marker im Verlauf verfolgt werden (Stieber 1999).

Auch die Normierung der Tumor-assoziierten Antigene, die durch die Division durch ihren jeweiligen Grenzwert vorgenommen wurde, ist gängige Praxis zum Vergleich mehrerer verschiedener Parameter. Jedoch kommen dadurch auch ungewollt Verzerrungen zustande, die sich bei den Auswertungen dann zeigten, wenn Median und Mittelwert deutlich auseinanderklafften. In solchen Fällen nahmen einige extremen Werte starken Einfluss auf die Masse der sich in einem gemäßigten Rahmen bewegenden Werte. Große Diskrepanzen traten beispielsweise zwischen dem CEA bei kolorektalem Karzinom, welches in mehreren Fällen nicht oder nur schwach exprimiert wurde, und dem ProGRP beim kleinzelligen Bronchialkarzinom zu Tage, welches auch bei Patienten mit späterer Remission initial häufig extrem hohe Werte aufwies.

Trotz dieser Einschränkungen ließen sich Unterschiede in der Ausprägung der Werte vor dem ersten, zweiten, dritten Zyklus und zum Zeitpunkt der Staginguntersuchungen zwischen Patienten mit Remission und Progression ausmachen. Bei ersteren wurden zum Teil erheblich niedrigere Wertelagen angetroffen, was auf eine geringere Tumormasse oder –aktivität und mit zunehmendem Verlauf auf ein Ansprechen der Therapie schließen lässt. Die Kinetik der Tumor-assoziierten Antigene während der Therapie zeigt eine Abnahme der Werte bei Patienten mit Remission und eine begrenzte Abnahme beziehungsweise eine Zunahme der Werte bei Patienten mit Progression am besten innerhalb der einzelnen Tumorentitäten.

Vergleich der Nukleosomen-Kinetik mit der Kinetik Tumor-assoziiertes Antigens bei Patienten mit soliden Tumoren während Chemotherapie

Die häufig gleichsinnige Veränderungen der Nukleosomen- und Tumormarkerwerte während der Chemotherapie bei Patienten mit Remission wie auch mit Progression waren nach den guten Korrelationen der Kinetiken der einzelnen Parametern mit dem Therapieerfolg zu erwarten. Nur bei wenigen Patienten wurden völlig diskrepante Werteverläufe mit einem zeitgleichen Anstieg und Abfall je eines Parameters beobachtet.

Im direkten Vergleich schnitt die Kinetik der Nukleosomen bei der Vorhersage des Therapieerfolgs – vor allem bei Patienten mit Remission – etwas besser ab als die Kinetik der Tumormarkerwerte. Allerdings traten gerade in dieser Patientengruppe Verzerrungen dadurch auf, dass in mehreren Fällen bereits initial die Tumormarkerwerte auf niedrigem Niveau waren und dann nicht weiter abfielen. Die Anzahl falsch-positiver Ergebnisse hielt sich für beide Parameter bei Patienten mit Remission in engen Grenzen. Somit konnte aus dem Ansteigen der einzelnen und im besonderen Maß beider Werte mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine Progredienz der Tumorerkrankung geschlossen werden.

Bei Patienten mit Progression war die Korrelation der Werte mit dem Therapieerfolg weniger eindrucksvoll, da offenbar bei mehreren Patienten ein Rückgang eines oder beider Parameter zu verzeichnen war. Obgleich das Zusammentreffen zweier fälschlicherweise negativen Resultate sehr selten war, konnte aus dem Werteabfall eines Parameters das Vorliegen einer Progression nicht ohne weiteres ausgeschlossen werden.

Bei allgemeiner Betrachtung der Kombination von Nukleosomen und Tumormarkern zeigte sich zunächst zudem eine Steigerung der prädiktiven Aussagekraft der Nukleosomenkinetik durch die Hinzunahme von Tumormarkern. Umgekehrt konnten die Verläufe der Patienten mit stagnierenden Wertlagen Tumor-assoziiertes Antigens durch die zusätzliche Information der Nukleosomenkinetik erst interpretiert werden.

Bei multivariater Analyse der Nukleosomen- und Tumormarkerkinetik konnte die Unabhängigkeit der beiden Parameter objektiviert werden: Es zeigte sich ein wechselseitiger, additiver Einfluss von Nukleosomen und Tumormarkern auf das Ansprechen der Therapie, der auch bei

getrennter Betrachtung der klinisch günstigen und ungünstigen Gruppe erhalten blieb. Somit lässt sich die Therapieeffizienz am sichersten durch die kombinierte Berücksichtigung des klinischen Stadiums, der Nukleosomen- sowie der Tumormarkerkinetik vorhersagen.

Da die Anflutung und Elimination der Nukleosomen im Blut schneller erfolgt als bei vielen Tumor-assoziierten Antigenen, ist in folgenden Studien das Augenmerk insbesondere auf die initiale Therapiephase zu richten: Durch engmaschige Nukleosomenbestimmungen bei Patienten mit definierten Erkrankungen und Behandlungsschemata lässt sich der Therapie-induzierte Effekt auf die Nukleosomenfreisetzung erfassen, der für das Ansprechen der Therapie von Bedeutung sein kann. Dadurch kann der potentielle, zeitliche Vorteil der Nukleosomen für die Prädiktion der Therapieeffizienz beurteilt werden.

Kinetik der Nukleosomen bei Patienten mit malignen Tumoren während Radiotherapie

Ähnlich wie bei der Chemotherapie sollen auch bei der radiotherapeutischen Behandlung gezielt schnell proliferierenden Tumorzellen inaktiviert oder abgetötet werden. Dies geschieht durch eine effektive Schädigung der bei Tumorzellen oft schon instabilen DNA (Hendry 1997; Schär 2001). Allerdings werden dabei auch andere Körperzellen mit kurzen Zellzyklen erfasst, deren Reparaturmechanismen bei diesen starken artifiziellen Noxen überfordert sind. Je nach Größe und Positionierung des Bestrahlungsfeldes werden hämatopoetische Zellen im Blut und Knochenmark, sich schnell regenerierende Epithelien wie im Gastrointestinaltrakt oder Zellen der Spermio-genese betroffen (Hendry 1997). Der in unseren Untersuchungen bei den meisten Patienten sehr schnelle und steile Anstieg der Nukleosomenkonzentration im Serum nach der ersten Bestrahlungseinheit beruht somit auf der massiven Freisetzung von Nukleosomen aus zugrunde gehenden Tumorzellen wie auch aus normalen Blut- und Gewebezellen.

Verschiedenen Zelltodformen sind nach Bestrahlung einer Zelllinie *in vitro* oder eines Gewebes *in vivo* mit γ -Strahlen beschrieben: Als klassischer Endpunkt vieler *in vitro*-Studien gilt der reproduktive oder klonogene Zelltod, der eine unmittelbare Folge der Unfähigkeit einer Zelle ist, durch Strahlenexposition hervorgerufene DNA-Schäden zu reparieren (Hendry 1995). Abhängig vom Zeitpunkt des Zelltods wird ferner zwischen Interphase-Zelltod im

Falle des Absterbens während desselben Zellzyklus‘ und mitotischem Zelltod im Falle einer späteren Degradierung der Zelle unterschieden. Beide Zelltodformen können morphologische Charakteristika der Apoptose beinhalten. Zusätzlich können Zellen nach DNA-Schädigung in einem inaktiven Stadium verbleiben und als „untote Zellen“ weiter vegetieren (Dewey 1995; Darzynkiewicz 1997).

In therapeutischer Strahlendosierung von 2 Gy wird in vielen Zellsystemen Apoptose induziert, die in hämatologischen Zellen innerhalb weniger Stunden, in solidem Gewebe je nach Gewebetyp mit mehrstündiger bis -tägiger Verzögerung auftritt (Mirkovic 1994; Delic 1995; Mirzaie-Joniani 2002). Bei höherer Dosierung werden auch vermehrt Zelldegenerationen onkotischer oder gemischter Art beobachtet (Leist 1997a).

Zelltodinduktion durch Radiotherapie

Strahlenbedingte Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA können zu einer Unterbrechung des Zellzyklus in verschiedenen Phasen führen, um Reparatursystemen die Behebung der Schäden zu ermöglichen (Maity 1994). In diesem Zusammenhang kommt der Hochregulation des p53-Proteins eine zentrale Bedeutung zu: Effektive Reparaturmechanismen werden aktiviert, um die Läsionen noch vor der DNA-Duplikationsphase zu beseitigen. Sind diese jedoch zu ausgedehnt oder die Reparatursysteme funktionieren nur insuffizient, wird durch eine Aktivierung von Bax und die mitochondriale Cytochrom C - Freisetzung umgehend die apoptotische Degradation der Zelle eingeleitet (Szumiel 1998; Albrechtsen 1999; Sionov 1999; Hengartner 2000). Da bei Tumorzellen häufig schon eine spontane Instabilität der DNA vorgefunden wird und Reparatursysteme aufgrund von Mutationen nicht funktionstüchtig sind, treten bei ihnen in verstärktem Maß DNA-Schäden auf, die nicht adäquat repariert werden können. Sofern sie nicht spezifische Resistenzmechanismen gegen die Zelltodinduktion entwickelt haben, sind sie sehr sensitiv gegenüber γ -Strahlen und werden wegen ihrer erhöhten Teilungsrate schnell und effektiv abgetötet (Schär 2001; Hendry 2001).

Aufgrund der hochgradigen, zeitlich fokussierten und Zellzyklus-unabhängigen Schädigung der Zellen wurde von Mirkovic *et al* in einem *in vivo*-Experiment an Mäusen mit Lymphomen, die mit einer Dosis von 1,25 bis 5 Gy bestrahlt wurden, bereits wenige Stunden nach der ersten Strahlendosis charakteristische apoptotische Zelltodveränderungen festgestellt. Das

Maximum der Zelltodinduktion war – erheblich früher als bei Chemotherapie – bereits nach vier Stunden erreicht. Danach sank die Apoptoserate langsam ab, um nach 24 Stunden wieder beim Ausgangsniveau anzukommen. Dabei wurde eine Korrelation von Bestrahlungsdosierung und Zelltodinduktion nachgewiesen: bei einer Dosis von 2 Gy ergab sich eine Apoptoserate von 40%, bei 5 Gy von über 60%, was dem dreifachen Wert der durch Chemotherapie erzielten Zelltodinduktion entspricht (Mirkovic 1994). Ähnliche zeitliche Verläufe mit einem Zelltodmaximum nach vier Stunden wurden auch von bei Mäusen mit Ovarialkarzinom beschrieben, allerdings waren die resultierenden Apoptoseraten nur etwa halb so groß wie bei den Mäusen mit Lymphomen (Stephens 1993). Hepatozelluläre Tumoren erwiesen sich dagegen äußerst radioresistent; selbst bei einer Strahlendosis konnte nur geringfügig Apoptose mit einem Maximum nach 6 Stunden induziert werden (Stephens 1993).

Auftreten und Elimination von Nukleosomen im Serum

Unter Berücksichtigung einer zusätzlichen Frist für die Desintegration der Zellmembran, die Freisetzung der Nukleosomen in den extrazellulären Raum und die Migration in Blutgefäße ist das in unseren Untersuchungen bei vielen Patienten beobachtete Maximum der Nukleosomenkonzentration im Serum sechs bis 24 Stunden nach der Applikation einer Strahlendosis in Einklang mit diesen experimentellen Daten. Im Gegensatz zur Chemotherapie wurden keine interindividuellen, zeitlichen Unterschiede beim Anstieg der Nukleosomenwerte bei verschiedenen Tumorarten oder Bestrahlungsfelder beobachtet. Dies entspricht der oben beschriebenen, zeitlich einheitlichen Apoptoseinduktion bei mehreren Tumortypen im experimentellen Ansatz (Mirkovic 1994; Stephens 1993).

Auffällig war jedoch der kurzfristige, primäre Abfall der Nukleosomenkonzentration drei Stunden nach Verabreichung der ersten Strahlendosis, der bei mehreren Patienten mit unterschiedlichen Grunderkrankungen vorgefunden wurde. Vermutlich könnte die Schädigung durch γ -Strahlen eine zeitgleiche Arretierung vieler sensibler Zellen im Zellzyklus auslösen, um eine Reparatur der betroffenen DNA zu ermöglichen (Schär 2001). Somit werden als erste Reaktion auf die Bestrahlung weniger Zellen degradiert.

In der bislang einzigen Studie, welche die Veränderungen der DNA-Konzentration im Blut von Tumorpatienten während Radiotherapie durch tägliche Blutabnahmen engmaschig untersuchte, konnten Lo *et. al.* bei fünf Patienten mit nasopharyngealem Karzinom ebenfalls einen

schnellen und deutlichen Anstieg der Anzahl von EBV-DNA-Kopien im Plasma nachvollziehen, dessen Maximum zwischen dem ersten und siebten Tag nach der ersten Bestrahlungseinheit variierte. Allerdings wurden dabei während des ersten Bestrahlungstages keine zusätzlichen Blutabnahmen vorgenommen. Im weiteren Verlauf sanken die Werte unterschiedlich schnell ab und erreichten nach vier bis 21 Tagen wieder das ursprüngliche Niveau (Lo 2000a).

Ähnliche Differenzen in der Absinkgeschwindigkeit der Nukleosomenwerte wurden auch in unseren Untersuchungen deutlich. Während bei einigen Patienten schon nach vier Tagen die Werte auf einem niedrigen Niveau angelangt waren, dauerte es bei anderen mehrere Wochen. Dabei ließen sich Verläufe mit sofortigem Abfall der Nukleosomenkonzentration nach Erreichen des Maximalwertes von solchen unterscheiden, bei denen die Werte über mehrere Tage bis Wochen auf einem hohen Niveau stagnierten, ehe sie abfielen.

Im ersten Fall bestätigte der rasche und einmalige Anstieg einerseits die Beobachtung, dass bereits die erste Bestrahlungs-Fraktion die stärkste Zelltod-induzierende Wirkung besitzt, während in den folgenden Zyklen eine jeweils geringer werdende Zahl von strahlensensiblen Zellen erfasst wird (Mirkovic 1994; Meyn 1994b). Der nach dem Maximalwert einsetzende Abfall war somit vermutlich auf eine effektive Elimination strahlensensibler Tumorzellen zurückzuführen, was häufig später anhand bildgebender Verfahren durch eine deutliche Reduktion der Tumorgroße dokumentiert wurde.

Hingegen wurden bei den Verläufen mit permanent hohen Werten meist ein unzureichendes Ansprechen der Radiotherapie vorgefunden und während oder nach der Therapie bildgebend eine Progression der Erkrankung festgestellt. Wahrscheinlich wurden bei diesen aggressiveren Tumoren zwischen den einzelnen Fraktionen neue Subpopulationen von Tumorzellen nachgebildet oder für eine strahleninduzierten Zelltod sensibilisiert, so dass auch durch die folgenden Radiotherapie-Fraktionen jeweils eine hohe Anzahl von Zellen tödlich getroffen wurde (Meyn 1994b; Thames 1996). Alternativ kann auch der Eliminationsmechanismus der Nukleosomen aus dem Blut nur unzureichend funktioniert haben, was auf ein insuffizientes Immunsystem oder eine begleitende stark inflammatorische Komponente hinweisen würde. So wurde bei einer hohen Konzentration von Zytokinen im Blut auch eine verstärkte Apoptose-Induktion in nicht bestrahlten Gewebe beobachtet (Hill 2001).

Das nach dem Abfall erreichte Minimalniveau der Nukleosomenkonzentration während oder am Ende der Radiotherapie spiegelte vermutlich den Anteil der noch verbleibenden aktiven Tumorzellen wider, zumal bei Patienten mit progredienter Erkrankung höhere Werte gemessen wurden als bei Patienten mit einer anhaltenden Remission. Während bei letzteren ein Großteil der Tumorzellen effizient abgetötet und entfernt wurde und die Nukleosomenfreisetzung somit beständig auf ein niedriges Maß gedrosselt wurde, trugen bei Patienten mit Progression neben der Neubildung und -sensibilisierung von Tumorzellen eventuell auch eine Resistenzentwicklung von Tumorzellklonen mit einer gesteigerten Aktivität zu der nach wie vor erhöhten Nukleosomenfreisetzung ins Blut bei (Thames 1996; Meyn 1996a,b). Aufgrund der nachlassenden Effektivität der Strahlentherapie nahmen diese Zellklone an Zellzahl und Aktivität zu und führten oft zu einem Wiederanstieg der Nukleosomenwerte im Serum, parallel zu bilddiagnostisch neu nachgewiesenen Tumormanifestationen.

Leichte Nebenwirkungen traten bei fast allen untersuchten Patienten auf, nahmen jedoch offensichtlich keine Auswirkungen auf die Nukleosomenwerte im Serum. Hingegen konnte bei stark entzündlichen Komplikationen – ähnlich wie bei Chemotherapie – vorübergehend deutliche Erhöhungen festgestellt werden.

Resistenzmechanismen

Die Wirkung von γ -Strahlen entfaltet sich im besonderen durch direkte Schädigung der DNA mit nachfolgender Hochregulation des p53-Proteins und im Falle ausgedehnter oder nicht reparierbarer Läsionen mit anschließender Einleitung des apoptotischen Zelltodes über die Aktivierung von Bax, Bad und APAF1 (Kerr 1994; Sionov 1999; Rich 2000; Schär 2001; Woods 2001). Mutationen in einer oder mehreren der an diesem Zelltodinduktions-System beteiligten Komponenten können zu einer Resistenzentwicklung gegenüber γ -Strahlen führen. Insbesondere Mutationen des p53-Genes sind bei einer Reihe von Tumoren für das verringerte Therapieansprechen verantwortlich (Meyn 1996a; Pirolo 1997; Sigal 2000; Dahm-Daphi 2000; Kemp 2001). Allerdings ist die p53-assoziierte Strahlenreaktion abhängig vom Tumortyp: Während bei Lymphomen, Mammatumoren und intestinalen Adenomen p53 sehr sensibel nach DNA-Schäden hochreguliert wird, sind Bronchial- und Leberzelltumore weitgehend resistent (Kemp 2001).

Verstärkend wirken γ -Strahlen zumindest bei humanen Lymphozyten und Lymphomzellen über eine Aktivierung des Fas-/APO1-/CD95-Systems. Dabei regulieren sie den Fas-/APO1-/CD95-Liganden hoch und erhöhen die Apoptoserate schon bei geringen Strahlendosen vor allem in Zytokin-stimulierten Zellen. Die Blockierung der Interaktion von Fas-/APO1-/CD95-Liganden und -Rezeptoren durch Antikörper vermindert die strahleninduzierte Apoptoseinduktion erheblich (Belka 1998). Mutationen im Fas-/APO1-/CD95-System, sowie potentiell der am DISC beteiligten Komponenten und der Caspasen-Kaskade sind somit als weitere Resistenzmechanismen gegenüber Strahlentherapie in Betracht zu ziehen.

Außerdem ist für eine zufrieden stellende Effektivität der Radiotherapie eine ausreichende Oxygenierung des betreffenden Tumorgewebes zu gewährleisten. Hypoxie reduziert die Strahlenwirkung um den Faktor zwei bis drei und begünstigt das Überleben von Tumorzellklonen (Mirkovic 1994). Somit können umschriebene, hypoxische Arealen mit verminderter Strahlensensibilität innerhalb eines Tumors zur intratumoralen Heterogenität der Strahlenwirkung beitragen.

Strahlenresistente Tumorklone können theoretisch unterschiedliche Nukleosomen-Freisetzungsmuster hervorrufen: Aufgrund der fehlenden Apoptose-Induktion durch γ -Strahlen kann der initiale Anstieg geringer ausfallen oder ganz ausbleiben. Bei einer sich während der Therapie entwickelnden Resistenz kann zudem ein starker Abfall auf ein sehr niedriges Niveau trotz einer Progression der Erkrankung erfolgen und fälschlicherweise ein gutes therapeutisches Ansprechen vortäuschen. Andererseits können resistente Klone bei hoher Aktivität und Zellumsatz zu einer permanent gesteigerten Zelldegradation und Nukleosomenkonzentrationen im Blut beitragen.

Heterogenität der Apoptoseraten innerhalb und zwischen verschiedenen Tumoren

Darüber hinaus ist in verschiedenen Tumorgeweben eine ausgeprägte Heterogenität hinsichtlich der Sensibilität von Tumorzellen gegenüber der Zelltodinduktion durch γ -Strahlung zu berücksichtigen: So wurde in Zelllinien von Mamma- und Ovarialkarzinomen eine deutliche dosisabhängige Erhöhung der Apoptoserate beobachtet, die ihr Maximum nach drei bis sechs Stunden erreichte. Bei einer einmaligen Dosierung von 2,5 Gy belief sie sich auf 10 bis 20%, bei 25 Gy auf 20 bis 30% (Meyn 1993a,b; Stephens 1991). Noch stärker

reagierten Lymphomzellen, die bei 2,5 Gy zu 40%, bei 25 Gy zu 60% apoptotisch zugrunde gingen. Bei feinerer Modulation der Bestrahlungsdosis konnte für verschiedene Tumorzelllinien ein maximales Apoptosevorkommen bei 7,5 Gy festgestellt werden; bei höheren Dosen ergab sich ein Plateau der Apoptoserate. Hingegen waren Zelllinien von Sarkomen, primären Leberzellkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen weitgehend resistent gegen Bestrahlung. Selbst die höchste Dosierung von 25 Gy bewirkte lediglich eine maximale Apoptoserate von wenigen Prozent (Meyn 1993a).

Einfluss der Dosierung und des Bestrahlungsfeldes auf die Nukleosomenkinetik

Die Gesamtdosis nahm erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Kinetik der Nukleosomenkonzentration, da die interessierenden Veränderungen bereits kurz nach Beginn der Radiotherapie erfolgten. Die Einzeldosis war jeweils in einem Rahmen von 1,6 bis 2,2 Gy relativ einheitlich gewählt, so dass sich daraus keine Verschiebungen ergaben.

Hinsichtlich der Größe des Bestrahlungsfeldes war besonders bei Patienten mit Lymphomen, die eine klassische Mantelfeldbestrahlung mit einem etwa fünffach höheren Bestrahlungsvolumen als Patienten mit Bronchial- oder HNO-Karzinomen erhielten, von einer höheren Therapie-induzierten Apoptoserate auszugehen, besonders da sich im Bestrahlungsgebiet ein großer Anteil blutbildenden Gewebes befand. Allerdings konnten keine generellen Unterschiede in der Nukleosomenfreisetzung gegenüber den Patienten mit soliden Tumoren festgestellt werden. Somit war der Einfluss des blutbildenden Gewebes trotz seiner hohen Apoptose-Sensibilität auf die Therapie-induzierte Nukleosomenkinetik als begrenzt einzustufen.

Verhältnis allgemeiner und tumorspezifischer Radiosensitivität

Da neben apoptotischen Tumorzellen höchstwahrscheinlich auch weitere strahlensensible Zellen, insbesondere Blutzellen wie Lymphozyten, und normales Gewebe in der Umgebung des Tumors zur Nukleosomenfreisetzung nach Bestrahlung einer Tumorregion beitragen (Hendry 1997), stellt sich die Frage nach der Aussagekraft der im Serum bestimmten Nukleosomenkonzentration für die spezifische Strahlensensibilität des Tumorgewebes.

In mehreren Studien wurde eine Korrelation der DNA-Schäden bzw. der Zelltodrate von Fibroblasten und Lymphozyten, die mit verschiedenen Testsystemen nach *in vitro*- und *in vivo*-Bestrahlung untersucht wurden, mit der allgemeinen Strahlensensibilität – insbesondere

mit akuten und/oder späten Nebenwirkungen in normalem Gewebe – gefunden (Geara 1993; Brock 1995; Kiltie 1999; Barber 2000). Ebenso wurde eine Assoziation der Strahlensensitivität von normalem und Tumorgewebe (Geara 1996), sowie von Fibroblasten und Lymphozyten mit Tumorzellen beschrieben (West 1998). Boreham *et. al.* und Crompton *et. al.* schlugen die Apoptoserate in Lymphozyten deshalb zum Einsatz als Dosimeter zur Ermittlung der allgemeinen und somit auch der tumorösen Strahlenempfindlichkeit vor (Boreham 1996; Crompton 1997).

Der Zusammenhang zwischen der Apoptoserate in Lymphozyten und in Tumorgewebe wirkt sich vorteilhaft auf die Interpretationsfähigkeit der Nukleosomenkonzentration im Serum aus: Gemäß dieser Vorstellung stammen die bestimmten Nukleosomen zwar aus verschiedenen Zelltypen, lassen jedoch Rückschlüsse auf die Strahlenempfindlichkeit des Tumors zu. Eine hohe Konzentration von Nukleosomen im Serum bedeutet gleichermaßen eine hohe Zelltodrate der Lymphozyten wie auch des Tumorgewebes. Somit wäre eine Abschätzung der allgemeinen wie auch tumorspezifischen Radiosensitivität durch die Nukleosomenbestimmung im Serum möglich. Allerdings werfen die unterschiedlichen prätherapeutischen Lymphozytenzahlen, die inter- und intratumoralen heterogenen Strahlenwirkungen sowie die sich unregelmäßig entwickelnden Zellklonresistenzen Zweifel bezüglich der Zuverlässigkeit einmaliger Bestimmungen auf. Eine sicherere Aussage könnte jedoch die Kinetik über mehrere Tage zu Beginn der Therapie erlauben.

Korrelation der Nukleosomenkinetik mit dem klinischen Ansprechen auf Radiotherapie

Aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Patienten können die Beobachtungen über das Ansprechen der Radiotherapie nicht als repräsentativ für die verschiedenen Tumorerkrankungen angesehen werden.

Die mangelhaften Therapieerfolge bei Patienten mit Bronchialkarzinom erklären sich dadurch, dass sich die Mehrzahl dieser Patienten bereits im metastasierten Stadium befanden und zum Behandlungszeitpunkt eine Rezidivierung des Tumors vorlag. In dieser palliativen Situation konnte ohnehin nur mit einer eingeschränkten Reduzierung der Tumormasse oder einer zeitlich begrenzten Wachstumsretardierung gerechnet werden. Hingegen wurden bei der Bestrahlung von Patienten mit Lymphomen, obwohl diese ebenfalls überwiegend als Rezidive

vorlagen, ähnlich wie bei Chemotherapie eine hohe Therapieerfolgsrate verzeichnet, was die hohe Sensitivität von Lymphomzellen auf chemo- und radiotherapeutische Interventionen unterstreicht. Mit Ausnahme eines Patienten mit einem rezidivierenden Tumor zeigten auch Patienten mit einem HNO-Karzinom ein gutes Ansprechen auf die bei ihnen durchgeführte Radiochemotherapie. Schließlich blieben die Patienten mit kolorektalem Karzinom unter postoperativer, konsolidierender Radiotherapie erwartungsgemäß rezidivfrei.

Zusammenfassend ist die Verteilung des therapeutischen Ansprechens unter den verschiedenen Tumorerkrankungen wesentlich auf die Auswahl der Patienten in unterschiedlich fortgeschrittenen Stadien zurückzuführen.

Auswahl der Blutabnahme-Zeitpunkte und der Parameter für die spontane und Therapie-induzierte Nukleosomenfreisetzung

Im Vergleich zum Blutabnahme-Protokoll während Chemotherapie wurden bei der Radiotherapie engmaschigere Entnahmen vor allem zu Beginn der Behandlung vorgenommen, um den bereits durch die erste Bestrahlungsfraction hervorgerufenen schnellen Anstieg, den Maximalwert und die Abfallskinetik der Nukleosomenkonzentration im Serum zu erfassen. Da sich die Patienten vor den täglichen Bestrahlungseinheiten ohnehin einer Blutabnahme zu unterziehen hatten, konnte die Entnahme für die Nukleosomenbestimmung damit kombiniert werden. Somit waren die einzigen zusätzlichen Blutabnahmen drei und sechs Stunden nach der ersten Fraktion, was von den Patienten gut toleriert wurde. Bis auf wenige Ausnahmen konnte das Schema bei den Patienten in der ersten Woche vollständig durchgeführt werden; danach variierten die Länge der Gesamtbeobachtungsdauer je nach klinischem Verlauf und weiterer Betreuung der Patienten durch die Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie.

Für diese ersten Untersuchungen wurde bewusst auf eine kleine Anzahl von Patienten mit mehreren definierten Tumorerkrankungen fokussiert, um eventuelle Gemeinsamkeiten wie auch grobe Unterschiede in den Verläufen festzustellen. Dabei wurden mehrere solide Tumoren mit zum Teil hoher Aggressivität wie das Bronchial- und das HNO-Karzinom den systemischen Lymphomen gegenübergestellt. Während bei letzteren das bestrahlte Volumen das der soliden Tumore um ein Mehrfaches übertraf, erhielten diese eine höhere Gesamtdosis. Außerdem wurden einige HNO-Tumore mit einem intensivierten Schema bestrahlt, das täglich zwei Fraktionen vorsah.

Natürlich war dadurch die Vergleichbarkeit der Patienten innerhalb einer sowie zwischen verschiedenen Erkrankungsgruppen limitiert; durch die geringe Patientenzahl, die unterschiedlichen Stadien der jeweiligen Tumoren und deren Bezug zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (Neuerkrankung / Rezidiv / post-OP) sowie die zur Anwendung kommenden Bestrahlungsschemata war bestenfalls eine tendenzielle Aussage über den Zusammenhang zwischen Nukleosomenkinetik und Therapieerfolg zu erwarten. Für vertiefende Studien wird auf eine genaue Definition der benannten Kriterien unbedingt zu achten sein.

Aufgrund der kontinuierlichen Verabreichung der Radiotherapie konnte die spontane Nukleosomenfreisetzung nur vor der Behandlung, mit einigem Abstand danach und möglicherweise während der Therapie eingeschätzt werden, sofern sich die Nukleosomenkonzentration auf einem niedrigen Niveau einpendelte. Damit standen als Bezugsgrößen für die spontane Freisetzung lediglich der prä- und posttherapeutische Nukleosomenwert sowie eventuell der Minimalwert während Therapie zur Verfügung, wobei dieser auch als direkte Auswirkung der Bestrahlung verstanden werden kann.

Die Therapie-induzierten Veränderungen waren durch die engmaschigen Blutabnahmen anhand einer Vielzahl von Messgrößen objektivierbar: Der Maximalwert, die Verzögerung bis zum Werteabfall, der Minimalwert und die jeweiligen prozentualen Relationen zum Ausgangswert. Darüber hinaus wurden der Ausgangswert, die Latenz, Höhe und Steilheit des Anstiegs, die Verzögerung und Geschwindigkeit des Abfalls und die erreichten Minimalwerte durch die Fläche unter der Kurve der ersten Therapiewoche integriert, die zur besseren Vergleichbarkeit durch Anzahl der Tage dividiert und so normiert wurde.

Für weitere Studien wäre während der ersten Woche eine tägliche Blutabnahme anzuraten, um tumorspezifische Veränderungen noch besser abbilden zu können und zu gewährleisten, dass die Zeitpunkte des Maximal- und Minimalwertes nicht übersprungen werden. Dann können auch Anstiegssteilheit und Abfallsgeschwindigkeit direkt abgeleitet werden.

Korrelation der Parameter für die spontane und Therapie-induzierte Nukleosomenfreisetzung mit dem Therapieverlauf während Radiotherapie

Im Einklang mit den Ergebnissen der Querschnittsuntersuchung und den Verläufen während Chemotherapie waren die prätherapeutischen Basiswerte vor Beginn der strahlentherapeutischen Behandlung sehr heterogen und hatten keine Bedeutung für das Ansprechen der Therapie. Zwar wurden niedrige Nukleosomenkonzentrationen vermehrt bei Patienten mit einer Remission beobachtet; jedoch wiesen auch einige aus dieser Gruppe initial deutlich erhöhte Werte ebenso wie viele Patienten mit progredienter Erkrankung auf, so dass aus den prätherapeutischen Werten nicht auf den weiteren Therapieverlauf geschlossen werden konnte.

Auch die Maximalwerte, die durch die massive Nukleosomenfreisetzung als Reaktion auf die erste Bestrahlungsfraction erreicht wurden, konnten nicht das Ansprechen auf die Therapie vorhersagen. Im Median fiel der Anstieg für Patienten mit progredientem Tumorleiden wegen der meist höheren Ausgangswerte etwas geringer aus; die Absolutwerte lagen allerdings deutlich über denen der Patienten mit späterer Remission. Dies spricht dafür, dass durch γ -Bestrahlung bei hoher Tumoraktivität die spontane Nukleosomenfreisetzung noch verstärkt, bei geringer prätherapeutischer Aktivität die Freisetzung effektiv induziert werden kann.

Deutlicher als die eben beschriebenen Parameter eignete sich die Latenzzeit bis zum Beginn des Werteabfalls nach Erreichen des Maximalwertes als Indikator zur Diskriminierung zwischen den Gruppen der Patienten mit Remission und Progression: Der schnell einsetzende Abfall der Nukleosomenkonzentration im Serum bei Patienten mit einer Remission weist auf eine effiziente Schädigung und Elimination der Tumorzellen hin und erklärt die daraus resultierende Reduzierung der Tumormasse und -aktivität. Über mehrere Tage oder Wochen gleich bleibend hohe Wertlagen sind hingegen auf ein ungenügendes Ansprechen der Therapie oder eine aggressive Form der bestrahlten Tumoren zurückzuführen, bei denen die Aktivität ungeachtet der Radiotherapie ungebrochen bleibt oder sich zwischen den einzelnen Fraktionen neue Subpopulationen an Tumorzellen nachbilden und die Verluste durch Strahlenschäden ausgleichen.

Eine ähnlich gute Diskriminationsfähigkeit wies auch der während der Therapie erreichte Minimalwert und der Wert zum Zeitpunkt des Therapieendes auf: Als Ausdruck der restlichen Tumoraktivität waren diese bei Patienten mit Remission auf einem fast durchwegs

niedrigeren Niveau als bei Patienten mit Progression. Aufgrund der häufig schon niedrigen prätherapeutischen Werte bei Patienten mit Remission war der Unterschied der beiden Patientengruppen hinsichtlich der prozentualen Abfälle vom Ausgangswert zum Minimalwert sowie zum Endwert weniger deutlich. Ebenso konnte keine Differenzierung der beiden Gruppen durch die Abfallgeschwindigkeit, die als Halbwertszeit und absoluter täglicher Abfall berechnet wurde, vorgenommen werden. Allerdings war der prozentuale tägliche Abfall bei Patienten mit Remission signifikant stärker als bei Patienten mit Progression.

Bei Einbeziehung einer größeren Patientenzahl könnten sich hypothetisch zwei Untergruppen innerhalb der Patienten mit Progression differenzieren lassen. Neben solchen mit verzögertem Abfall und erhöhten Minimalwerten aufgrund der verbliebenen Tumoraktivität könnten auch Patienten identifiziert werden, deren tumorbedingter Zellumsatz aufgrund einer Resistenzentwicklung des Tumors gegenüber Radiotherapie herabgesetzt ist. In diesem Fall könnten ein rascher Abfall und niedrige Minimalwerte eine Remission vortäuschen, die Tumorerkrankung nach Beendigung der Therapie jedoch weiter progredieren.

Die Summe der im Mittel niedrigeren Ausgangs-, Maximal- und Minimalwerte sowie des frühen Beginn des Werterückgangs spiegelte sich bei Patienten mit Remission auch in einer geringeren Fläche unter der Kurve der ersten Woche wider. Die Integration mehrerer Variablen in einem Parameter bietet den Vorteil, dass auch schwächer diskriminierende Faktoren berücksichtigt werden und zur Erhöhung der Trennschärfe beitragen können. Außerdem ist die Einschätzung der Therapieeffizienz durch die Fläche unter der Kurve nach einer definierten Zeitspanne und schon zu Beginn der Therapie möglich. Hingegen waren das tatsächliche Erreichen des Minimalwertes oder der Beginn des Werterückgangs erst retrospektiv präzise anzugeben. Somit könnte neben einem eventuell frühen Werteabfall die Fläche unter der Kurve ein wichtiges Maß für die frühzeitige Bewertung des Therapieansprechens sein.

Apoptoserate und Effizienz der Strahlentherapie

In der Literatur finden sich eine Reihe von Berichten über den Zusammenhang von Apoptose und Radiotherapie, jedoch nur wenige über den Effekt von Radiotherapie auf die Präsenz von DNA im Blut.

Bereits 1977 bestimmten Leon *et. al.* die Konzentration freier DNA im Serum von Tumorpatienten vor und nach der bei diesen durchgeführten Radiotherapie. Dabei stellten sie häufig ein starkes Absinken von prätherapeutisch erhöhten DNA-Werten fest, welches besonders bei Patienten mit einem verbesserten klinischen Status ausgeprägt war. Blieb der Rückgang der Werte aus oder stiegen die Werte an, werteten sie dies als prognostisch ungünstiges Zeichen (Leon 1977).

Über 20 Jahre später quantifizierten Lo *et. al.* die Konzentration von EBV-DNA bei Patienten mit nasopharyngealem Karzinom nach Radiotherapie in Abständen von jeweils hundert Tagen und beschrieben eine zeitliche Korrelation von niedrigen Werten mit einer Remission sowie von hohen Werten und einer Progression der Erkrankung (Lo 1999b). In einer zeitlichen Fokussierung auf die Dauer der Radiotherapie, während der wöchentlich Blutabnahmen erfolgten, fiel die Zahl der EBV-DNA-Kopien bei den meisten Patienten schon nach wenigen Wochen auf sehr niedrige Werte ab. Eine eventuelle Korrelation zum Ansprechen der Therapie wurde jedoch nicht angegeben. Noch engmaschigere, tägliche Bestimmungen bei einigen dieser Patienten zeigten während der ersten Therapiewoche einen rasante Zunahme der EBV-DNA-Kopienzahl, ehe sie mit einer Halbwertszeit von 3,8 Tagen auf ein sehr niedriges Niveau zurückging. Auch hierzu wurden keine Angaben zur Therapieeffizienz gemacht (Lo 2000a).

Die Apoptoserate eines Tumors als Kriterium der Radiosensitivität wurde von mehreren Arbeitsgruppen unter verschiedenen Bedingungen untersucht:

- in *in-vitro*- und *in-vivo*-Experimenten
- bei verschiedenen Tumorarten oder -zelllinien
- sowohl prätherapeutisch wie auch nach ein- oder mehrmaliger Bestrahlung.

Obwohl bei radiobiologischen Zellmodellen aufgrund von Blockierungsmechanismen apoptotische Zelltodphänomene unterrepräsentiert sind (Hendry 2001), wurde eine Korrelation zwischen der Apoptoserate vor und nach Bestrahlung unter *in vitro*- und *in vivo*-Bedingungen beschrieben (Hendry 1997). Ferner wurde eine intertumorale Heterogenität der spontanen und induzierten Apoptoserate festgestellt (Meyn 1993a), wobei strahlensensitive Tumorentitäten jeweils höhere Werte aufwiesen.

Auch intratumoral wurde eine Heterogenität des Apoptosevorkommens beschrieben, die vermutlich auf dem Vorhandensein von hypoxischen Arealen beruht. Deren Bedeutung scheint allerdings komplex zu sein: Während im Umfeld hypoxischer Tumorregionen die spontane Apoptoserate erhöht ist, sind diese Gebiete für strahleninduzierten Zelltod weniger sensitiv. Daneben spielen die Zusammensetzung und funktionelle Organisation des Tumorgewebes sowie die Verteilung von Apoptose-stimulierenden Faktoren eine Rolle. Die letztlich nach Bestrahlung resultierende Zelltodrate dürfte somit vom Hypoxiegrad und tumor-individuellen Faktoren abhängen (Meyn 1993a).

Ein enger Zusammenhang wurde von Stephens *et. al.* zwischen den prätherapeutischen und Therapie-induzierten Apoptoseraten berichtet, die wenige Stunden nach der Bestrahlung bestimmt wurden. Demzufolge würde die Radiotherapie die Elimination der ohnehin schon Apoptose-sensitiven Tumorzellen nur verstärken (Stephens 1993, Meyn 1996b). Hohe prä- und somit auch posttherapeutische Apoptoseraten korrelierten ferner mit einer guten Prognose bei Mäusen mit Cervixkarzinom im Stadium IB (Wheeler 1995).

Im Widerspruch dazu wurde ebenfalls an Mäusen mit Cervixkarzinom der Stadien I-III eine inverse Korrelation zwischen der prätherapeutischen Apoptoserate und Prognose beschrieben (Levine 1995).

Darüber hinaus wurde in Studien mit Patientinnen und Patienten mit verschiedenen Tumorerkrankungen eine Assoziation von hoher prätherapeutischer Apoptoserate mit einer guten wie auch einer schlechten Prognose gefunden, so bei Patientinnen mit Cervix-Karzinom (Chung 1999; Zaghoul 2000; Paxton 2000; Sheridan 1999; Tsang 1999; Liu 2001; Kim 2001), bei Patienten mit Lymphom (Logsdon 1996; Leoncini 1993), Prostata-Karzinom (Vesalainen 1994; Aihara 1995), Rektum-Karzinom (Adell 2001; Rodel 2002), nicht kleinzelligem Bronchialkarzinom (Hwang 2001; Van de Vaart 2000; Langendijk 2000), HNO-Karzinom (Shintani 2000; Bandoh 2002; Tsuchiya 2001; Ravi 2001) und Blasenkarzinom (Rodel 2000, Moonen 2001, Chyle 1996, Lara 1999). In der folgenden Tabelle sind die kontroversen Studien über den Zusammenhang von Apoptoserate und Prognose zusammengestellt (N = Anzahl der Patienten; KA = Karzinom; TU = Tumor; RT = Radiotherapie; CT = Chemotherapie):

Tabelle 53: Übersicht über den Zusammenhang von Apoptoserate und Prognose

Referenz	N	Tumor	Stadium	Therapie	Prognose bei hoher Apoptoserate
Wheeler (1995)	44	Cervix-KA	I b	RT	Gut
Chung (1999)	48	Cervix-KA	II b	RT	Gut
Zaghloul (2000)	40	Cervix-KA	I-IV	RT	Gut
Paxton (2000)	146	Cervix-KA	I-IV	RT	Keine
Sheridan (1999)	39	Cervix-KA	I-IV	RT	Keine
Tsang (1999)	77	Cervix-KA	I-IV	RT	TU<6cm: Ungünstig TU>6cm: Keine
Levine (1995)	66	Cervix-KA	I-III	RT	Ungünstig
Liu (2001)	77	Cervix-KA	I-IV	RT/ RT+CT	Ungünstig
Kim (2001)	42	Cervix-KA	I-IV	RT	Ungünstig
Logsdon (1996)	144	Lymphom	I-II	RT/CT/ RT+CT	Gut
Leoncini (1993)	50	Lymphom	I-IV	CT	Ungünstig
Vesalainen (1994)	184	Prostata-KA	I-IV	OP	Ungünstig
Aihara (1995)	28	Prostata-KA	Gleason 3	OP	Ungünstig
Adell (2001)	162	Rektum-KA	I-IV	RT	Gut
Rodel (2002)	44	Rektum-KA	T3-4	RT+CT	Gut
Hwang (2001)	68	Bronchial-KA nicht kleinzellig	III	RT	Gut
v de Vaart (2000)	27	Bronchial-KA nicht kleinzellig	III	RT+CT	Keine
Langendijk (2000)	161	Bronchial-KA nicht kleinzellig	III	RT	Ungünstig
Shintani (2000)	32	HNO-KA	I-IV	RT	Gut
Bandoh (2002)	70	HNO-KA	II-IV	RT+CT	Gut
Tsuchiya (2001)	48	HNO-KA	I-III	RT	Keine
Ravi (2001)	69	HNO-KA	I-IV	RT	Ungünstig
Rodel (2000)	70	Blasen-KA	T1-4	RT+CT	Gut
Moonen (2001)	83	Blasen-KA	T1-3	RT	Gut
Chyle (1996)	158	Blasen-KA	I-III	RT	Keine
Lara (1999)	55	Blasen-KA	I-III	RT	Ungünstig

Aus diesen Beobachtungen lassen sich unterschiedliche Folgerungen ableiten: Ein bereits initial hohes Apoptosevorkommen könnte einerseits einer hohen Radiosensitivität und einer guten Therapierbarkeit entsprechen, wenn es Ausdruck intakter Zelltodmechanismen von Tumorzellen ist. Eine niedrige Apoptoserate ließe dann auf einen strahlenresistenten Tumor

schließen, bei dem Abwehrmechanismen für die Strahlen-bedingte Zelltodinduktion bereits entwickelt sind. Andererseits könnte die Apoptoserate zur Ausbalancierung einer stark erhöhten Mitose- und Proliferationsrate gesteigert sein, wie sie bei aggressiven Tumoren mit einer ohnehin schlechteren Therapierbarkeit und Prognose vorkommen.

Die Wechselwirkung von Apoptose und Proliferation wurde in verschiedenen Studien unterschiedlich beurteilt: So fanden Lu *et. al.* und Bedi *et. al.* beim Magen- und kolorektalem Karzinom eine Korrelation von Apoptose- und Proliferationsrate (Lu 1997; Bedi 1995), während Watanabe *et. al.* und Saegusa *et. al.* bei den gleichen Tumorentitäten eine positive Korrelation der beiden Parameter konstatierten (Watanabe 1997; Saegusa 1995).

Aotake *et. al.* schließlich differenzierten bei ihren Untersuchungen nach dem Tumorstadium und beschrieben Verschiebungen des Verhältnisses im Laufe der Tumorprogression. Zunächst wird die Apoptoserate infolge der gesteigerten Proliferationsrate zur Konstanthaltung der Zellzahl hochreguliert. Im weiteren Verlauf setzt vermutlich aufgrund mutativer Veränderungen relevanter Gene ein drastischer Abfall des Apoptosevorkommens ein, wodurch die Proliferation ein deutliches Übergewicht erhält. Bei sehr fortgeschrittenen Tumoren ist dann allerdings der allgemeine Zellumsatz derart erhöht, dass wieder eine höhere Zahl an Tumorzellen bei einer ansteigenden Apoptoserate zugrunde geht (Aotake 1999).

Diese Überlegungen erklären die scheinbar widersprüchlichen Aussagen über die Prognose eines Patienten mit einer prätherapeutisch hohen Apoptoserate: Bei frühen Tumorstadien kann sie als Korrelat intakter Zelltodmechanismen dienen, was mit einer guten Therapierbarkeit des Tumors und einer günstigen Prognose einhergeht, wie Wheeler *et. al.* bei Cervixkarzinomen des Stadiums Ib beobachteten (Wheeler 1995). Bei späteren Tumorstadien hingegen entspricht sie dem erhöhten Zellumsatz eines fortgeschrittenen Tumors mit einer schlechteren Prognose, wie Levine *et. al.* bei Cervixkarzinomen der Stadien I-III berichteten (Levine 1995).

Jedoch dürfte auf individueller Basis die Heterogenität der Apoptoseraten zwischen und innerhalb verschiedener Tumorentitäten die Einschätzung der Prognose zusätzlich erschweren. So beschrieben Komaki *et. al.* unterschiedliche Prognoseinformationen durch die Apoptoserate bei histologischen Subtypen von nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen im

N1-Stadium: Während beim Plattenepithel-Karzinom eine hohe spontane Apoptoserate für eine bessere Prognose sprach, stand sie beim Adeno- und großzelligen Karzinom für eine schlechtere Prognose (Komaki 1996). Letztlich sind auf einen einzigen prätherapeutischen Wert basierende Vorhersagen über die Therapieeffizienz oder die Prognose sehr vorsichtig zu bewerten und nur unter bei gleichzeitiger Differenzierung der Tumorentitäten in histologische Subtypen und Stadienbeschreibung sinnvoll.

Bei der Beurteilung des Zelltodvorkommens während Radiotherapie durch die Bestimmung von freigesetzten Zellbestandteilen werden neben den tumorspezifischen auch unspezifische Effekte mitgemessen, so zum Beispiel Läsionen von Normalgewebe in der unmittelbaren Umgebung des Tumors oder im weiteren Bestrahlungsfeld. Die Sensitivität dieser Gewebe spielt eine wichtige Rolle für akut oder protrahiert auftretende Strahlenschäden.

Durch γ -Strahlen induzierte genomische Instabilität führt häufig zu verzögertem Zelltod (delayed reproductive death; DRD), der im Tumorgewebe neben der akuten Reduktion der Zellzahl von großer Bedeutung zu sein scheint. Die klonogene Kapazität des Tumors – das heißt die Fähigkeit, neue Zellklone zu bilden oder zu vermehren – wird dadurch nachhaltig verringert, was nicht nur zur Radiosensitivität primärer Tumoren beiträgt, sondern auch zu einer geringeren Inzidenz und einem langsameren Wachstum von Rezidiven oder Metastasen sowie zu einem verlängerten Rezidiv-freien Intervall führt. Im Normalgewebe kann der verzögerte Zelltod aufgrund des gesteigerten Zellverlustes jedoch schwere und ausgedehnte Frühreaktionen, verlängerte Regenerationszeiten und größere Restschäden nach sich ziehen. Zusätzlich können sich durch die genetischen Instabilität mittel- bis langfristig leichter Zweitkarzinome entwickeln (Hendry 1995, 2001).

Da die Idealvorstellung einer isolierten Strahlensensitivität des Tumors bei einer weitgehenden Unempfindlichkeit des normalen Gewebes in der Realität nicht zutrifft, wird die Quantifizierung der Zellbestandteile abgestorbener Zellen im Blut notgedrungen eine Mixtur verschiedener Strahlenwirkungen widerspiegeln, was die oben geschilderte Problematik der Bedeutung der Apoptoserate im Tumorgewebe weiter komplexiert.

Klinische Relevanz der Nukleosomen

Auch wenn anhand von Zelltod-Endprodukten im Blut die zugrunde liegenden Bestrahlungseffekte nicht differenziert werden können, haben unsere Untersuchungen gezeigt, dass die engmaschige Beobachtung der Kinetik von Nukleosomen im Serum eine sinnvolle Verlaufskontrolle ermöglicht und bereits zu einem frühen Zeitpunkt das Ansprechen der Therapie beurteilen lässt. Der Einsatz einer derartigen biochemischen Therapieeffizienzkontrolle kann nicht nur für den behandelnden Arzt sondern auch für den betroffenen Patienten von großem Nutzen sein: Immerhin handelt es sich bei der Radiotherapie um ein hoch toxisches Verfahren, das häufig kurz- und langfristige Nebenwirkungen verursacht. Die sich als Verringerung des Tumolvolumens manifestierende Wirksamkeit der Therapie lässt sich jedoch durch bildgebende Verfahren oft erst spät nachweisen. In vielen Fällen werden entsprechende Kontrollen nach Beendigung der mehrwöchigen Therapie oder sogar noch später vorgenommen. In der Zwischenzeit erhält der Patient eine möglicherweise unwirksame Therapie, deren Dauer und Intensität sich zudem an Durchschnittswerten und nicht an seinem individuellen Bedarf orientieren. Noch weniger als bei Chemotherapie kann er während der Behandlung deren Wirkungsweise auf seinen Organismus erfassen und einschätzen. Umso dringlicher für den Patienten ist der Wunsch nach einem frühen Anhaltspunkt für das Ansprechen der Therapie. Den behandelnden Arzt interessieren darüber hinaus Informationen hinsichtlich der individuellen Strahlensensibilität, der Patienten-gerechten Therapieplanung und gegebenenfalls Therapiemodifizierung. Mit zunehmender Kombination von Radio- und Chemotherapie sowie der additiven Boost-Bestrahlung der Tumorregion am Therapieende stehen entsprechende individuelle Adaptionmöglichkeiten zur Verfügung.

Somit eröffnen sich durch die engmaschige Bestimmung der Nukleosomen im Therapieverlauf neue Perspektiven der Therapiekontrolle und der frühzeitigen Beurteilbarkeit des Therapie-ansprechens. Intensive Untersuchungen an größeren Patientenzahlen mit definierten Tumorerkrankungen in definierten Stadien unter definierten Therapie- und Blutentnahmeschemata werden die prädiktive oder prognostische Aussagekraft der Nukleosomenkinetik differenziert beleuchten und spezifische Optionen für die Anwendung der Nukleosomen im klinischen Alltag definieren.

7 Zusammenfassung und Perspektive

Der geregelte Untergang von Zellen ist bei einer Reihe physiologischer Vorgänge im Organismus von großer Bedeutung. Eine Störung im fein regulierten Mechanismus der Zelltod-Einleitung oder seiner Durchführung kann die Entstehung von hyperproliferierenden, mitunter malignen Erkrankungen wie auch von degenerativen oder autoimmunen Erkrankungen zur Folge haben. Andererseits soll durch therapeutische Interventionen – wie durch Chemo- und Radiotherapie bei Patienten mit malignen Tumoren – gezielt Zelltod induziert werden.

Um das Ausmaß und die Akuität eines Krankheitsgeschehens einschätzen und im Verlauf beurteilen zu können, und im Besonderen das Ansprechen einer antitumorösen Therapie mittels mehrzeitiger Kinetikuntersuchungen kontrollieren und bewerten zu können, ist die Bestimmung von Zelltodprodukten im Blut ein neuartiger und viel versprechender Ansatz. Die Hypothese, dass bei gesteigertem lokalem Zelltodvorkommen die Endprodukte Anschluss ans Gefäßsystem finden und dort in messbarer Menge detektierbar sind, bildet dafür die Voraussetzung. Der entscheidende Vorteil gegenüber dem Zelltodnachweis auf zellulärer Ebene ist dabei die geringe Invasivität der Untersuchung, die sie vor allem für Verlaufsbeobachtungen attraktiv macht.

Nukleosomen sind elementare Einheiten des Chromatins, die durch dessen Spaltung durch Endonukleasen als Endprodukte des Zelltodprozesses entstehen. Mittels der Originalversion des Cell Death Detection ELISAs^{plus} konnten sie intrazellulär nachgewiesen werden. In der hier vorgestellten Arbeit gelang es, daraus einen Test zu entwickeln, der Nukleosomen in flüssigen Materialien detektieren und quantifizieren kann.

Dafür wurden einige Modifikationen und Optimierungen des Testsystems sowie zahlreiche Standardisierungen vorgenommen. Eingehend wurde die methodische Qualität des Testes geprüft, wobei eine für manuelle Verfahren gute Intra- (<10%) und Interassay-Varianz (<15%) sowie eine hohe analytische Spezifität und Sensitivität gefunden wurde. Als Matrix erwies sich Serum, das zusätzlich mit EDTA versehen wurde, auch über einen längeren Zeitraum als ausreichend stabil und geeignet, um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen. Die

präanalytische Vorbehandlung der Proben wurde als wesentlicher Einflussfaktor für die Messergebnisse identifiziert. Deshalb wurde eine detaillierte Untersuchung der einzelnen Verfahrensschritte durchgeführt. Als weitere potentielle Störgrößen konnten Hämolyse, Hyperlipidämie und bakterielle Kontamination der Blutproben eruiert werden. Hinsichtlich der Testdurchführung selbst sind keine besonderen Vorsichtsmaßnahmen notwendig. Für die Anwendung im klinischen Alltag wurde eine standardisierte, präanalytische Vorgehensweise vorgeschlagen.

In der klinischen Evaluierung des modifizierten Nukleosomen-Tests wurde die Aussagekraft der spontanen Nukleosomenkonzentration bei insgesamt 590 Personen untersucht: Bei gesunden Personen wurden nur geringe Nukleosomenwerte gefunden; dabei war keine Alters- oder Geschlechtsabhängigkeit vorhanden. Personen mit benignen und malignen Erkrankungen wiesen eine große Bandbreite an prätherapeutischen Werten auf. Zwar ließen sich gesunde Personen von den Gruppen der Personen mit benignen und malignen Erkrankungen signifikant abgrenzen, jedoch war der Unterschied zwischen der Gruppe von Personen mit malignen Erkrankungen und der eigentlich relevanten Kontrollgruppe, der Personen mit benignen Erkrankungen, nicht signifikant. Dafür zeichneten besonders Personen mit akuten Infekten verantwortlich, die – häufig korrelierend zum C-reaktiven Protein – hohe Wertlagen erreichen konnten. Aufgrund der großen Überlappungsbereiche der Wertlagen bei den verschiedenen Gruppen ist im Einzelfall eine diagnostische oder differentialdiagnostische Einordnung mittels der Nukleosomenwerte nicht zuverlässig möglich.

Innerhalb der Gruppe der Personen mit malignen Erkrankungen zeigte sich ein ähnliches Werteverteilungsmuster für alle Tumorarten. Allerdings fielen das Bronchialkarzinom mit höheren und das Prostatakarzinom mit deutlich niedrigeren Werten auf. Eine Korrelation von Nukleosomenwerten mit dem Tumorstadium, der Tumorgröße und dem Metastasierungsgrad fand sich nur bei der Subgruppe der gastrointestinalen Tumoren; bei allen anderen Tumorentitäten hingegen nicht. Keine signifikanten Unterschiede wurden hinsichtlich des Lymphknotenstatus, des Differenzierungsgrades und histologischen Subtyps der Tumorzellen, des Krankheitsstatus, des Alters und Geschlechts festgestellt. Aufgrund der interindividuellen Heterogenität ist die Bestimmung der Nukleosomenwerte bei Staginguntersuchungen somit nicht hilfreich.

Die Beurteilung des Effektes von Therapien auf die Nukleosomenwerte wurde anhand von Longitudinaluntersuchungen bei Seren von 5 gesunden Personen und 107 Personen mit unterschiedlichen Erkrankungen und Therapieformen vorgenommen. Voraussetzung dafür waren stabile Nukleosomenkonzentrationen über mehrere Wochen bei gesunden Personen.

Bei Personen mit akuten Infekten wurde häufig ein deutlicher Anstieg der Nukleosomenwerte beobachtet; unter antibiotischer Behandlung sanken die Werte – oft parallel zum C-reaktiven Protein – wieder ab. Auch nach operativen Eingriffen bei Tumorpatienten stieg die Nukleosomenkonzentration innerhalb weniger Tage an, um danach wieder zurückzugehen. In einigen Fällen fielen die Werte primär ab oder es kam zeitgleich mit dem Auftreten von postoperativen Komplikationen zu einem nochmaligen Anstieg. Diese qualitativen Beobachtungen eröffnen Ansätze für weitergehende Studien mit größeren Personengruppen mit definierten Erkrankungen und Therapieformen zur Bewertung der Nukleosomen bei septischen Krankheitsbildern sowie im perioperativen Verlauf.

Bei Tumorpatienten während einer Chemo- und Radiotherapie wurde durch die gezielte Zelltodinduktion ein schneller Anstieg der Nukleosomenwerte innerhalb weniger Stunden bis Tage nach Applikation verursacht. Unter Chemotherapie sanken die Werte in der behandlungsfreien Zeit rasch ab, um während der folgenden Therapiezyklen wieder anzusteigen. Insgesamt war im Verlauf während Chemotherapie bei Patienten mit einer Remission ein Rückgang der präzyklischen Basiswerte, bei Patienten mit Progression ein Anstieg der Basiswerte festzustellen.

Mehrere Variable, die diese Kinetik der Basiswerte beschreiben, korrelierten signifikant mit dem Ansprechen der Therapie. Insbesondere der Endwert bei den Staginguntersuchungen und das Verhältnis vom End- zum prätherapeutischen Basiswert hatten einen unabhängigen Einfluss auf den Therapieerfolg. Diese Ergebnisse sind umso bemerkenswerter, als sie sich auch innerhalb der klinisch günstigeren (nicht-metastasierte Karzinome oder Lymphome) und ungünstigeren Gruppe (bereits metastasierte Karzinome) bestätigten.

In ähnlicher Weise korrelierten auch etablierte Tumor-assoziierte Antigene mit dem Therapieerfolg. Eine abnehmende Kinetik fand sich häufig bei Patienten mit Remission, eine zunehmende bei Patienten mit Progression. Im Vergleich mit den Nukleosomen zeigten sich

meist gleichsinnige Veränderungen beider Parameter. In der multivariaten Analyse ergab sich ein genereller wechselseitiger, additiver Effekt von Nukleosomen und Tumormarkern, der auch unter Berücksichtigung der klinischen Gruppierung erhalten blieb. Somit wird durch die Kombination von Nukleosomen und Tumor-assoziierten Antigenen die Beurteilung der Effizienz einer Chemotherapie – sogar innerhalb prognostisch einheitlicher Gruppen – verbessert.

Auch während Radiotherapie sanken die Nukleosomenwerte nach dem initialen Anstieg während der kontinuierlich fortgesetzten Therapie – häufig zeitgleich mit einer Regression des Tumors – wieder ab. Hingegen stiegen die Werte bei fehlender Therapieeffizienz und Progression weiter oder erneut wieder an. Mit dem Ansprechen der Therapie korrelierten mehrere Variable der Nukleosomenkinetik: Während fast alle Patienten mit Remission einen frühen und kompletten Abfall bis in den Bereich gesunder Personen aufwiesen, sanken bei der Mehrzahl der Patienten mit Progression die Nukleosomenwerte erst deutlich später ab und blieben über dem Niveau gesunder Personen. Somit erlaubt die Nukleosomenkinetik auch bei Radiotherapie eine Einschätzung der Therapieeffizienz. Diese Resultate könnten erhebliche klinische Relevanz erlangen, da wegen der hohen Toxizität der Therapie eine frühzeitige Beurteilbarkeit der Effizienz dringend gewünscht, anhand bildgebender Verfahren bisher jedoch oft erst spät ermöglicht wurde.

Aufgrund der schnellen Anflutung und Elimination der Nukleosomen im Serum bereits in der ersten Therapiewoche bietet sich in weiterführenden Studien mit größeren Personengruppen mit definierten Tumoren, Therapieformen und Blutentnahmeprotokollen sowohl während Chemo- wie auch während Radiotherapie die Fokussierung auf die initiale Therapiephase an, um die potentielle, schon sehr frühzeitige Prädiktion der Therapieeffizienz durch Nukleosomen beleuchten und klinisch nutzbar machen zu können.

8 Verzeichnis der Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-sulfonat)
ADP	Adenosindiphosphat
aGIK	andere gastrointestinale Karzinome
aGyK	andere gynäkologische Karzinome
AICD	Aktivitäts-induzierter Zelltod <i>activation induced cell death</i>
AIF	Apoptose-induzierender Faktor <i>apoptosis inducing factor</i>
AK	Antikörper
Ann Arbor	Klassifikation für Lymphome
7-AMD	7-Amino-Actinomycin-D
AO	Acridin Orange
Apaf	<i>apoptotic protease-activating factor</i>
APC	Adenomatöses Polyposis Coli Gen
Apo	<i>apoptosis receptor</i>
ATA	Aurintricarboxylsäure <i>aurin tricarboxyl acid</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>arbitrary units</i>
AUC	Fläche unter der Kurve <i>area under the curve</i>
Bad	proapoptotisches Mitglied der BCL-Familie
Bax	proapoptotisches Mitglied der BCL-Familie
Bcl	<i>B-cell lymphoma gene</i>
Bcl-W	antiapoptotisches Mitglied der BCL-Familie
Bcl-X _L	antiapoptotisches Mitglied der BCL-Familie
Bcl-X _S	proapoptotisches Mitglied der BCL-Familie
bds	beidseits
ben	benigne
BH-Domäne	Bcl-2 homologe Domäne
Bik	proapoptotisches Mitglied der BCL-Familie
Bim	proapoptotisches Mitglied der BCL-Familie
BK	Bronchialkarzinom
bp	Basenpaare
BRCA	<i>breast cancer related antigen</i>
BW	Basiswert
BW-1	Basiswert vor dem ersten Zyklus
BW-2	Basiswert vor dem zweiten Zyklus
BW-3	Basiswert vor dem dritten Zyklus
BW-E	Endwert
c	<i>cellular</i>
C	Celsius
C elegans	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CA	Karzinom
CA 19-9	<i>Cancer Antigen 19-9</i>

Abkürzung	Bedeutung
Ca ²⁺	Kalzium
CAD	Caspase aktivierte DNase <i>caspase activated DNase</i>
CASH	Name eines FLIPs
CASP	Caspase
Caspase	Cystein-abhängige Aspartat-spezifische Protease <i>cystein-dependent aspartate specific protease</i>
Casper	Name eines FLIPs
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDDE	<i>Cell Death Detection ELISA</i>
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>
CEA	Carcino-Embryonales Antigen
ced	Zelltod Gen <i>cell death gene</i>
CLARP	<i>caspase-like apoptosis-regulatory protein</i>
CMK	Chlormethylketone
c-myc	Name eines Onkogens
CO	Grenzwert <i>cutoff</i>
CPAN	Caspase-aktivierte Nuklease
CrmA	<i>cytokine response modifier A</i>
CRP	C-reaktives Protein
CT	Chemotherapie
CYFRA 21-1	Cytokeratin 19 Fragmente
Cyto C	Cytochrom C
d	Tage
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamino-2-Phenylindole
DAPK	<i>death-associated protein kinase</i>
DD	Todesdomäne <i>death domain</i>
DED	<i>death effector domain</i>
DFF	<i>DNA fragmentation factor</i>
DIABLO	<i>direct IAP binding protein with low pl</i>
DISC	Tod induzierender Signalkomplex <i>death inducing signalling complex</i>
dl	Deziliter
DMTase	DNA-Methyltransferase
DNA	Desoxyribonukleinsäure <i>desoxyribonucleic acid</i>
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DNase	Desoxyribonuklease
DR	<i>death receptor</i>
DRD	<i>delayed reproductive death</i>
Dukes	Klassifikation für kolorektale Karzinome
dUTP	Deoxyuridintriphosphat
E.c.	Escherichia coli

Abkürzung	Bedeutung
E1A	Name eines Onkogens
EBV	Ebstein-Barr-Virus
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat-Säure
EGF	<i>epithelial growth factor</i>
egl	<i>egg lying defective gene</i>
EGTM	<i>European Group on Tumor Markers</i>
EIA	<i>Enzym-Immuno-Assay</i>
EK	Erkrankung
ELISA	<i>Enzym-Linked-Immuno-Sorbent-Assay</i>
End	Endwert
et al	und andere
ext dis	<i>extended disease</i>
FADD	FAS assoziierte Todesdomäne <i>FAS associated death domain</i>
Fas	Name eines Zelltodrezeptors
FDA	Fluorescein Diacetat
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FIGO	Klassifikation für gynäkologische Karzinome
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FLAME	Name eines FLIPs
FLICE	Name für Caspase 8
FLIP	<i>FADD like ICE inhibitory protein</i>
FMK	Fluoromethylketone
fn	falsch negativ
fp	falsch positiv
g	Gramm
ges	gesund
griech	griechisch
GSTP	Glutathione S-Transferase P
Gy	Gray
H	Histon
h	Stunden
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
hMLH	Name eines <i>mismatch repair gene</i>
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HPV	humanes Papilloma-Virus
HWZ	Halbwertszeit
IAPs	Apoptose-inhibierende Proteine <i>inhibitors of apoptosis proteins</i>
ICAD	<i>inhibitor of caspase activated DNase</i>
ICE	<i>interleukin-1β-converting enzyme</i>
ISEL	<i>in situ end labeling</i>
ISWI	Name einer Chromatin Remodelling Komplex-Familie

Abkürzung	Bedeutung
J	Jahre
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KA	Karzinom
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
KI	Karnofsky-Index
KRK	Kolorektales Karzinom
L	Ligand
l	Liter
LARD	<i>lymphocyte-associated receptor of death</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
lim dis	<i>limited disease</i>
LK	Lymphknoten
LOH	Verlust der Heterozygotität <i>loss of heterozygosity</i>
LTI β	Lymphotoxin β
Ly	Lymphome
μ l	Mikroliter
M	männlich
M	Morbus
MACH	Name für Caspase 8
mal	maligne
Max	Maximumwert
MDM 2	Inhibitor von p53
Med	Median
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
MGTMT	<i>O6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
MH	Morbus Hodgkin
MHC	<i>major histocompatibility antigene</i>
Min	Minimumwert
min	Minuten
MK	Mammakarzinom
ml	Milliliter
MLR	<i>mixed lymphocyte reaction</i>
mM	Millimolar
MM	Multiples Myelom
Mn ²⁺	Mangan
MORT	Name für FADD
MRIT	Name eines FLIPs
MSI	Mikrosatelliten-Instabilität
mU	Milli-Units
mult	multiple
MW	Mittelwert
N	Anzahl
n sig	nicht signifikant

Abkürzung	Bedeutung
NAIP	<i>neuronal apoptosis inhibitory protein</i>
NC	<i>no change</i>
neg präd Wert	negativer prädiktiver Wert
NF κB	<i>nuclear factor-kappaB</i>
ng	Nanogramm
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NHL	Non Hodgkin's Lymphom
nm	Nanometer
NMDA	<i>N-methyl-D-aspartate</i>
Noxa	proapoptotisches Mitglied der BCL-Familie
NSCLC	Nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom
NSE	Neuronen spezifische Enolase
NURF	<i>nucleosome remodelling factor</i>
NZK	Nierenzellkarzinom
OD	optische Dichte
OP	Operation
OPG	Osteoprotegerin
OV	Ovarialkarzinom
P	Plasma
P-	Plasma ohne EDTA-Zusatz
P+	Plasma mit EDTA-Zusatz
P.a.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
p53	Name eines Tumorsuppressorgens
PARP	Poly-(ADP-Ribose) Polymerase
Pat	Patienten
PBS	<i>phosphate buffer saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	<i>pondus hydrogenii</i>
PI	Propidiumiodid
PK	Prostatakarzinom
pOP	postoperative Therapie
Pos	Position
pos präd Wert	positiver prädiktiver Wert
Präv	Prävalenz
prim	Primärtherapie
Prog	Progression
ProGRP	<i>pro-gastrin-releasing peptide</i>
PT	<i>permeability transition</i>
R	Rezeptor
ras	Name eines Onkogens
Rb	Retinoblastom-Gen
RCT	Radiochemotherapie
rel	Name eines Onkogens
Rem	Remission
RES	Retikulo-Endotheliales System
Rez	Rezidivdiagnose
rez	Rezidivtherapie

Abkürzung	Bedeutung
RH123	Rhodamin 123
m	richtig negativ
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	<i>receiver operating characteristic</i>
rp	richtig positiv
RSC	Name eines Chromatin Remodelling Komplexes
RT	Radiotherapie
S	Serum
s	Standardabweichung
S-	Serum ohne EDTA-Zusatz
S+	Serum mit EDTA-Zusatz
S.a.	Staphylococcus aureus
SAP	Serum Amyloid P
SCC	<i>squamous cancer cell antigene</i>
SCLC	Kleinzelliges Bronchialkarzinom
Sens	Sensitivität
sig	signifikant
SIR	<i>silent information regulator gene</i>
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
Smac	<i>second mitochondria derived activator of caspase</i>
SNF	Name eines Chromatin Remodelling Komplexes
so	sonstige Karzinome
Spez	Spezifität
SWI	Name eines Chromatin Remodelling Komplexes
SWI/SNF	Name einer Chromatin Remodelling Komplex-Familie
TA	Tumor-assoziiertes Antigen
TA-1	Tumormarkerwert vor dem ersten Zyklus
TA-2	Tumormarkerwert vor dem zweiten Zyklus
TA-3	Tumormarkerwert vor dem dritten Zyklus
TA-S	Tumormarkerwert beim Staging
TdT	<i>terminal deoxyribonucleotidyl transferase</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
tgl	täglich
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRAMP	Synonym für den DR3-Rezeptor
TRICK	Synonym für den DR4/DR5-Rezeptor
TRIS	Tri(hydroxymethyl)methylamin
Tu	Tumor
TUNEL	<i>terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling</i>
U	Units
UICC	Klassifikation von Karzinomen nach der Union Internationale Contre le Cancer
Unsens	Unsensitivität
Unspez	Unspezifität

Abkürzung	Bedeutung
UV	ultraviolett
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VK	Variationskoeffizient
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
W	weiblich
WSL	Synonym für den DR3-Rezeptor
x	Mittelwert
XIAP	Mitglied der Gruppe Apoptose-inhibierender Proteine
Z	Zyklus
Zn ²⁺	Zink
Zy	Zyklen

Englische und lateinische Übersetzungen sind *kursiv* gedruckt.

9 Literaturverzeichnis

Adams, J.M. & Cory, S.

The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.
Science **281**: 1322-1326 (1998).

Adell, G.C., Zhang, H., Evertsson, S., Sun, X.F., Stal, O.H. & Nordenskjold, B.A.

Apoptosis in rectal carcinoma: prognosis and recurrence after preoperative radiotherapy.
Cancer **91**: 1870-1875 (2001).

Aihara, M., Scardino, P.T., Truong, L.D., Wheeler, T.M., Goad, J.R., Yang, G. & Thompson, T.C.

The frequency of apoptosis correlates with the prognosis of Gleason Grade 3 adenocarcinoma of the prostate.
Cancer **75**: 522-529 (1995).

Albrechtsen, N., Dornreiter, I., Grosse, F., Kim, E., Wiesmüller, L. & Deppert, W.

Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53.
Oncogene **18**: 7706-7717 (1999).

Allen, P.D., Bustin, S.A., Macey, M.G., Johnston, D.H., Williams, N.S. & Newland, A.C.

Programmed cell death (apoptosis) in immunity and haematological neoplasia.
Br. J. Biomed. Sci. **50**: 135-149 (1993).

Ameisen, J.C.

Programmed cell death (apoptosis) and cell survival regulation: relevance to AIDS and cancer.
AIDS **8**: 1197-1213 (1994).

Ameisen, J.C., Estaquier, J., Idziorek, T. & De Bels, F.

The relevance of apoptosis to AIDS pathogenesis.
Trends Cell Biol. **5**: 27-31 (1995).

Amoura, Z., Chabre, H., Koutouzov, S., Lotton, C., Cabrespines, A., Bach, J.F. & Jacob, L.

Nucleosome-restricted antibodies are detected before anti-dsDNA and/or antihistone antibodies in serum of MRL-Mp lpr/lpr and +/+ mice, and are present in kidney eluates of lupus mice with proteinuria.
Arthritis Rheum. **37**: 1684-1688 (1994).

Amoura, Z., Piette, J.C., Chabre, H., Cacoub, P., Papo, T., Wechsler, B., Bach, J.F. & Koutouzov, S.

Circulating plasma levels of nucleosomes in patients with systemic lupus erythematosus: correlation with serum antinucleosome antibody titers and absence of clear association with disease activity.
Arthritis Rheum. **40**: 2217-2225 (1997).

Amoura, Z., Koutouzov, S. & Piette, J.C.

The role of nucleosomes in lupus.
Curr. Opin. Rheumatol. **12**: 369-373 (2000).

Anker, P., Stroun, M & Maurice, P.

Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an *in vitro* system.
Cancer Res. **35**: 2375-2382 (1975).

Anker, P., Lefort, F., Vasioukhin, V., Lyautey, J., Lederrey, C., Chen, X.Q., Stroun, M., Mulcahy, H.E. & Farthing, M.J.

K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer.
Gastroenterology **112**: 1114-1120 (1997).

Anker, P., Mulcahy, H., Chen, X.Q. & Stroun, M.

Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients.
Cancer Metastasis Rev. **18**: 65-73 (1999).

Anker, P.

Quantitative aspects of plasma/serum DNA in cancer patients.
Ann. N. Y. Acad. Sci. **906**: 5-7 (2000).

Anker, P. & Stroun, M.

Tumor-related alterations in circulating DNA, potential for diagnosis, prognosis and detection of minimal residual disease.
Leukemia **15**: 289-291 (2001a).

Anker, P., Lyautey, J., Lederrey, C. & Stroun, M.

Circulating nucleic acids in plasma or serum.
Clin. Chim. Acta **313**: 143-146 (2001b).

Aotake, T., Lu, C.D., Chiba, Y., Muraoka, R. & Tanigawa, N.

Changes of angiogenesis and tumor cell apoptosis during colorectal carcinogenesis.
Clin. Cancer Res. **5**: 135-142 (1999).

- Arends, M.J., Morris, R.G. & Wyllie, A.H.**
Apoptosis. The role of the endonuclease.
Am. J. Pathol. **136**: 593-608 (1990).
- Ashkenazi, A. & Dixit, V.M.**
Death receptors: signaling and modulation.
Science **281**: 1305-1308 (1998).
- Bandoh, N., Hayashi, T., Kishibe, K., Takahara, M., Imada, M., Nonaka, S. & Harabuchi, Y.**
Prognostic value of p53 mutations, bax, and spontaneous apoptosis in maxillary sinus squamous cell carcinoma.
Cancer **94**: 1968-1980 (2002)
- Barber, J.B.P., Burrill, W., Spreadborough, A.R., Levine, E., Warren, C., Kiltie, A.E., Roberts, S.A. & Scott, D.**
Relationship between in vitro chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and the expression of normal tissue damage following radiotherapy for breast cancer.
Radiother. Oncol. **55**: 179-186 (2000).
- Barry, M.A., Behnke, C.A. & Eastman, A.**
Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia.
Biochem. Pharmacol. **40**: 2353-2362 (1990).
- Barry, M.A. & Eastman, A.**
Endonuclease activation during apoptosis: the role of cytosolic Ca²⁺ and pH.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **186**: 782-789 (1992).
- Barry, M.A. & Eastman, A.**
Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved in apoptosis.
Arch. Biochem. Biophys. **300**: 440-450 (1993).
- Baylin, S.B., Herman, J.G., Graff, J.R., Vertino, P.M. & Issa, J.P.**
Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia.
Adv. Cancer Res. **72**: 141-196 (1998).
- Baylin, S.B. & Herman, J.G.**
DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics.
Trends Genet. **16**: 168-174 (2000).
- Bedi, A., Pasricha, P.J., Akhtar, A.J., Barber, J.P., Bedi, G.C., Giardiello, F.M., Zehnbauser, B., Hamilton, S.R. & Jones, R.J.**
Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer.
Cancer Res. **55**: 1811-1816 (1995).
- Bell, D.A., Morrison, B. & Van den Bygaart, P.**
Immunogenic DNA-related factors. Nucleosomes spontaneously released from normal murine lymphoid cells stimulate proliferation and immunoglobulin synthesis of normal mouse lymphocytes.
J. Clin. Invest. **85**: 1487-1496 (1990).
- Belka, C., Marini, P., Budach, W., Schulze-Osthoff, K., Lang, F., Gulbins, E. & Bamberg, M.**
Radiation-induced apoptosis in human lymphocytes and lymphoma cells critically relies on the up-regulation of CD95/Fas/APO-1 ligand.
Rad. Res. **149**: 588-595 (1998).
- Ben-Sasson, S.A., Sherman, Y. & Gavrieli, Y.**
Identification of dying cells – in situ staining.
Methods Cell Biol. **46**: 29-39 (1995).
- Bevilacqua, R.A.U., Nunes, D.N., Stroun, M. & Anker, P.**
The use of genetic instability as a clinical tool for cancer diagnosis.
Sem. Cancer Biol. **8**: 447-453 (1998).
- Bianchi, D.W., Flint, A.F., Pizzimenti, M.F., Knoll, J.H. & Latt, S.A.**
Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **87**: 3279-3283 (1990).
- Bianchi, D.W.**
Fetal DNA in maternal plasma: the plot thickens and the placental barrier thins.
Am. J. Hum. Genet. **62**: 763-764 (1998).
- Bianchi, D.W. & Lo, Y.M.**
Fetomaternal cellular and plasma DNA trafficking: the Yin and the Yang.
Ann. N. Y. Acad. Sci. **945**: 119-131 (2001).

Birnbaum, M.J., Clem, R.J. & Miller, L.K.

An apoptosis-inhibiting gene from a nuclear polyhedrosis virus encoding a polypeptide with Cys/His sequence motif.
J. Virol. **68**: 2521-2528 (1994).

Bjorklund, S., Almouzni, G., Davidson, I., Nightingale, K.P. & Weiss, K.

Global transcription regulators of eukaryotes.
Cell **96**: 759-767 (1999).

Boender, P.J., Heijntink, R.A. & Hellings, J.A.

Nucleosomal fragments in serum may directly reflect cell-mediated cytotoxic activity in vivo.
Clin. Immunol. Immunopathol. **53**: 87-98 (1989).

Boldin, M.P., Goncharov, T.M., Goltsev, Y.V. & Wallach, D.

Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1 and TNF receptor-induced cell death.
Cell **85**: 803-815 (1996).

Boreham, D.R., Gale, K.L., Maves, S.R., Walker, J.A. & Morrison, D.P.

Radiation-induced apoptosis in human lymphocytes: potential as a biological dosimeter.
Health Phys. **71**: 685-691 (1996).

Bortner, C.D., Oldenburg, N.B.E. & Cidlowski, J.A.

The role of DNA fragmentation in apoptosis.
Trends Cell Biol. **5**: 21-26 (1995).

Braithwaite, K.L. & Rabbitts, P.H.

Multi-step evolution of lung cancer.
Sem. Cancer Biol. **9**: 255-265 (1999).

Bret, L., Lule, J., Alary, C., Appolinaire-Pilipenko, S., Pourrat, J.P. & Fournie, G.J.

Quantitation of blood plasma DNA as an index of in vivo cytotoxicity.
Toxicol. **61**: 283-292 (1990).

Brock, W.A., Tucker, S.L., Geara, F.B., Turesson, I., Wike, J., Nyman, J. & Peters, L.J.

Fibroblast radiosensitivity versus acute and late normal skin responses in patients treated for breast cancer.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **32**: 1371-1379 (1995).

Bruhn, N., Beinert, T., Oehm, C., Jandrig, B., Petersen, I., Chen, X.Q., Possinger, K. & Fleischhacker, M.

Detection of microsatellite alterations in the DNA isolated from tumor cells and from plasma DNA of patients with lung cancer.
Ann. N. Y. Acad. Sci. **906**: 72-82 (2000).

Budach, W., Gioioso, D., Taghian, A., Stuschke, M. & Suit, H.D.

Repopulation capacity during fractionated irradiation of squamous cell carcinomas and glioblastomas in vitro.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **39**: 743-750 (1997).

Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X. & Wang, X.

Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis.
Annu. Re. Cell. Dev. Biol. **15**: 269-290 (1999).

Burlingame, R.W., Boey, M.L., Starkebaum, G. & Rubin, R.L.

The central role of chromatin in autoimmune responses to histones and DNA in systemic lupus erythematosus.
J. Clin. Invest. **94**: 184-192 (1994).

Burlingame, R.W., Volzer, M.A., Harris, J. & Du Clos, T.W.

The effect of acute phase proteins on clearance of chromatin from the circulation of normal mice.
J. Immunol. **156**: 4783-4788 (1996).

Buttista, F., Marchetti, A., Gadducci, A., Pellegrini, S., Morganti, M., Carnicelli, V., Cosio, S., Galletti, O., Genazzani, A.R. & Bevilacqua, G.

P53 alterations are predictive of chemoresistance and aggressiveness in ovarian carcinomas: a molecular and immunohistochemical study.
Br. J. Cancer **75**: 230-235 (1997).

Carbonari, M., Cibati, M. & Fiorilli, M.

Measurement of apoptotic cells in peripheral blood.
Cytometry **22**: 161-167 (1995).

Castells, A., Puig, P., Mora, J., Boadas, J., Boix, L., Urgell, E., Sole, M., Capella, G., Lluís, F., Fernandez-Cruz, L., Navarro, S. & Farre, A.

K-ras mutations in DNA extracted from the plasma of patients with pancreatic carcinoma: diagnostic utility and prognostic significance.
J. Clin. Oncol. **17**: 578-584 (1999).

Cecconi, F.

Apaf1 and the apoptotic machinery.
Cell Death Differ. **6**: 1087-1098 (1999).

Chen, X.Q., Stroun, M., Magnenat J.L., Nicod, L.P., Kurt, A.M., Lyautey, J., Lederrey, C. & Anker, P.
Microsatellite alterations in plasma DNA of small cell lung cancer patients.
Nature Med. **2**: 1033-1035 (1996).

Chen, X.Q., Bonnefoi, H., Diebold-Berger, S., Lyautey, J., Lederrey, C., Faltin-Traub E., Stroun, M. & Anker, P.
Detecting tumor-related alterations in plasma or serum DNA of patients diagnosed with breast cancer.
Clin. Cancer Res. **5**: 2297-2303 (1999).

Chen, X.Q., Bonnefoi, H., Pelte, M.F., Lyautey, J., Lederrey, C., Movarekhi, S., Schaeffer, P., Mulcahy, H.E., Meyer, P., Stroun, M. & Anker, P.
Telomerase RNA as a detection marker in the serum of breast cancer patients.
Clin. Cancer Res. **6**: 3823-3826 (2000).

Chung, E.J., Seong, J., Yang, W.I., Park, T.K., Kim, J.W., Suh, C.O. & Kim, G.E.
Spontaneous apoptosis as a predictor of radiotherapy in patients with stage IIb squamous cell carcinoma of the uterine cervix.
Acta Oncol. **38**: 449-454 (1999).

Chyle, V., Pollack, A., Czerniak, B., Stephens, L.C., Zagars, G., Terry, N. & Meyn, R.E.
Apoptosis and downstaging after preoperative radiotherapy for muscle-invasive bladder cancer.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **35**: 281-287 (1996).

Clahsen, P.C., van de Velde, C.J., Duval, C., Pallud, C., Mandard, A.M., Delobelle-Deroide, A., van den Broek, L., Sahnoud, T.M. & van de Vijver, M.J.
P53 protein accumulation and response to adjuvant chemotherapy in premenopausal women with node-negative early breast cancer.
J. Clin. Oncol. **16**: 470-479 (1998).

Clarke, P.G.H. & Clarke, S.
Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena.
Anat. Embryol. **193**: 81-99 (1996).

Cohen, G.M., Sun, X.M., Snowden, R.T., Dinsdale, D. & Skilleter, D.N.
Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation.
Biochem. J. **286**: 331-334 (1992).

Collins, R.J., Harmon, B.V., Gobe, G.C. & Kerr, J.F.R.
Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis.
Int. J. Radiat. Biol. **61**: 451-453 (1992).

Conradt, B. & Horvitz, H.R.
The *C.elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9.
Cell **93**: 519-529 (1998).

Contreras, D.N., Krammer, P.H., Potkul, R.K., Bu, P., Rossi, J.L., Kaufmann, A.M., Gissmann, L. & Qiao, L.
Cervical cancer cells induce apoptosis of cytotoxic T lymphocytes.
J. Immunother. **23**: 67-74 (2000).

Cooper, C.A., Carby, F.A., Bubb, V.J., Lamb, D., Kerr, K.M. & Wyllie, A.H.
The pattern of K-ras mutation in pulmonary adenocarcinoma defines a new pathway of tumour development in the human lung.
J. Pathol. **181**: 401-404 (1997).

Cotter, T.G., Lennon, S.V., Glynn, J.G. and Martin, S.J.
Cell death via apoptosis and its relationship to growth, development and differentiation of both tumour and normal cells.
Anticancer Res. **10**: 1153-1160 (1990).

Cotter, T.G., Glynn, J.M., Echeverri, F. & Green, D.R.
The induction of apoptosis by chemotherapeutic agents occurs in all phases of the cell cycle.
Anticancer Res. **12**: 773-779 (1992).

Coulet, F., Blons, H., Cabelguenne, A., Lecomte, T., Lacourreye, O., Brasnu, D., Beaune, P., Zucman, J. and Laurent-Puig, P.
Detection of plasma tumor DNA in head and neck squamous cell carcinoma by microsatellite typing and p53 mutation analysis.
Cancer Res. **60**: 707-711 (2000).

Crompton, N.E. & Ozsahin, M.

A versatile and rapid assay of radiosensitivity of peripheral blood leukocytes based on DNA and surface-marker assessment of cytotoxicity.

Rad. Res. **147**: 55-60 (1997).

Cummings, M.C., Winterford, C.M. & Walker, N.I.

Apoptosis.

Am. J. Surg. Pathol. **21**: 88-104 (1997).

Dahm-Daphi, J.

p53: biology and role for cellular radiosensitivity.

Strahlenther. Onkol. **176**: 278-285 (2000).

Dacheux, D., Toussaint, B., Richard, M., Brochier, G., Croize, J. & Attree, I.

Pseudomonas aeruginosa cystic fibrosis isolates induce rapid, type III secretion-dependent, but ExoU-independent, oncosis of macrophages and polymorphonuclear neutrophils.

Infect. Immun. **68**: 2916-2924 (2000).

Darzynkiewicz, Z., Li, X. & Gong, J.

Assays of cell viability: discrimination of cells dying by apoptosis.

Methods Cell. Biol. **41**: 15-38 (1994).

Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T. & Traganos, F.

Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis).

Cytometry **27**: 1-20 (1997).

Debatin, K.M.

Activation of apoptosis pathways by anticancer drugs.

Adv. Exp. Med. Biol. **457**: 237-244 (1999).

Decaudin, D., Geley, S., Hirsch, T., Castedo, M., Marchetti, P., Macho, A., Kofler, R. & Kroemer, G.

Bcl-2 and Bcl-x_L antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents.

Cancer Res. **57**: 62-67 (1997).

Degen, W.G.J., Pruijn, G.J.M., Raats, J.M.H. & van Venrooij, W.J.

Caspase-dependent cleavage of nucleic acids.

Cell Death Differ. **7**: 616-627 (2000).

Delic, J., Magdelenat, H., Barbaroux, C., Chaillet, M.P., Dubray, B., Gluckman, E., Fourquet, A., Girinsky, T. & Cosset, J.M.

In vivo induction of apoptosis in human lymphocytes by therapeutic fractionated total body irradiation.

Br. J. Rad. **68**: 997-1003 (1995).

Desmouliere, A., Badid, C., Bochaton-Piallat, M.L. & Gabbiani, G.

Apoptosis during wound healing, fibrocontractive diseases and vascular wall injury.

Int. J. Biochem. Cell Biol. **29**: 19-30 (1997).

Deveraux, Q.L., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S. & Reed, J.C.

Endogenous inhibitors of caspases.

J. Clin. Immunol. **19**: 388-398 (1999).

Dewey, W.C., Ling, C.C. & Meyn, R.E.

Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy.

Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **33**: 781-796 (1995).

Dirnagl, U., Iadecola, C. & Moskowitz, M.A.

Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view.

Trends Neurosci. **22**: 391-397 (1999).

Dörner, K.

Klinische Chemie und Hämatologie.

Enke-Verlag, Stuttgart, 3. Auflage (1999).

Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. & Wang, X.

Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition.

Cell **102**: 33-42 (2000).

Du Clos, T.W., Marnell, L., Zlock, L.R. & Burlingame, R.W.

Analysis of the binding of C-reactive protein to chromatin subunits.

J. Immunol. **146**: 1220-1225 (1991).

Du Clos, T.W.

The interaction of C-reactive protein and serum amyloid P component with nuclear antigens.
Mol. Biol. Rep. **23**: 253-260 (1996).

Dyson, J.E., Simmons, D.M., Daniel, J., McLaughlin, J.M., Quirke, P. & Bird, C.C.

Kinetic and physical studies of cell death induced by chemotherapeutic agents or hyperthermia.
Cell Tissue Kinet. **19**: 311-324 (1986).

Ehlert, J.E. & Kubbutat, M.H.G

Apoptosis and its relevance in cancer therapy.
Onkologie **24**: 433-440 (2001).

Eichhorst, S.T., Mürköster, S., Weigand, M.A. & Krammer, P.H.

The chemotherapeutic drug 5-fluorouracil induces apoptosis in mouse thymocytes in vivo via activation of the CD95 (APO-1/Fas) system.
Cancer Res. **61**: 243-248 (2001).

Ekert, P.G., Silke, J. & Vaux, D.L.

Caspase inhibitors.
Cell Death Differ. **6**: 1081-1086 (1999).

Eliopoulos, A.G., Kerr, D.J., Herod, J., Hodgkins, L., Krajewski, S., Reed, J.C. & Young, L.S.

The control of apoptosis and drug resistance in ovarian cancer: influence of p53 and bcl-2.
Oncogene **11**: 1217-1228 (1995).

Ellis, H.M. & Horvitz, H.R.

Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*.
Cell **44**: 817-829 (1986).

Emlen, W. & Mannik, M.

Clearance of circulating DNA-anti-DNA immune complexes in mice.
J. Exp. Med. **155**: 1210-1215 (1982).

Emlen, W. & Mannik, M.

Effect of DNA size and strandedness on the in vivo clearance and organ localization of DNA.
Clin. Exp. Immunol. **56**: 185-192 (1984).

Emlen, W. & Burdick, G.

Clearance and organ localization of small DNA anti-DNA immune complexes in mice.
J. Immunol. **140**: 1816-1822 (1988).

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. & Nagata, S.

A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD.
Nature **391**: 43-50 (1998).

Esteller, M., Sanchez-Cespedes, M., Rosell, R., Sidransky, D., Baylin, S.B. & Herman, J.G.

Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients.
Cancer Res. **59**: 67-70 (1999).

Esteller, M., Corn, P.G., Baylin, S.B. & Herman, J.G.

A gene hypermethylation profile of human cancer.
Cancer Res. **61**: 3225-3229 (2001).

Evan, G. & Littlewood, T.

A matter of life and cell death.
Science **281**: 1317-1321 (1998).

Fadeel, B., Orrenius, S. & Zhivotovsky, B.

Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony?
Biochem. Biophys. Res. Commun. **266**: 699-717 (1999).

Fadock, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L. & Henson, P.M.

Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages.
J. Immunol. **148**: 2207-2216 (1992).

Fateh-Moghadam, A. & Stieber, P.

Sensible use of tumour markers.
Hartmann-Verlag, Marloffstein 2.Auflage (1993).

- Fearon, E.R. & Vogelstein, B.**
A genetic model for colorectal tumorigenesis.
Cell **61**: 759-767 (1990).
- Ferreira, C.G., Tolis, C. & Giaccone, G.**
P53 and chemosensitivity.
Ann. Oncol. **10**: 1011-1021 (1999).
- Ferreira, C.G., Epping, M., Kruyt, F.A.E. & Giaccone, G.**
Apoptosis: target of cancer therapy.
Clin. Cancer Res. **8**: 2024-2034 (2002).
- Flemming, W.**
Über die Bildung von Richtungsfiguren in Säugethiereiern beim Untergang Graaf'scher Follikel.
Arch. Anat. EntwGesch. 221-244 (1885).
- Fliss, M.S., Usadel, H., Caballero, O.L., Wu, L., Buta, M.R., Eleff, S.M., Jen, J. & Sidransky D.**
Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids.
Science. **287**: 2017-2019 (2000).
- Fournie, G.J., Gayral-Taminh, M., Bouche, J.P. & Conte, J.J.**
Recovery of nanogram quantities of DNA from plasma and quantitative measurement using labeling by nick translation.
Anal. Biochem. **158**: 250-256 (1986).
- Fournie, G.J.**
Circulating DNA and lupus nephritis.
Kidney Int. **33**: 487-497 (1988).
- Fournie, G.J., Courtin, J.P., Laval, F., Chale, J.J., Pourrat, J.P., Pujazon, M.C., Lauque, D. & Carles, P.**
Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours.
Cancer Lett. **91**: 221-227 (1995).
- Franek, F. & Dolnikova, J.**
Nucleosomes occurring in protein-free hybridoma cell culture. Evidence for programmed cell death.
FEBS Lett. **284**: 285-287 (1991).
- Fraser, A.G.**
Programmed cell death in *C. elegans*.
Cancer Metast. Rev. **18**: 285-294 (1999).
- Friesen, C., Fulda, S. & Debatin, K.M.**
Cytotoxic drugs and the CD95 pathway.
Leukemia **13**: 1854-1858 (1999).
- Fulda, S., Los, M., Friesen, C. & Debatin, K.M.**
Chemosensitivity of solid tumor cells in vitro is related to activation of the CD95 system.
Int. J. Cancer. **76**: 105-114 (1998a).
- Fulda, S., Scaffidi, C., Pietsch, T., Krammer, P.H., Peter, M.E. & Debatin, K.M.**
Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells.
Cell Death Differ. **5**: 884-893 (1998b).
- Fulda, S., Meyer, E., Friesen, C., Susin, S.A., Kroemer, G. & Debatin, K.M.**
Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis.
Oncogene **20**: 1063-1075 (2001).
- Gal, S., Fidler, C., Lo, Y.M., Chin, K., Moore, J., Harris, A.L. & Wainscoat, J.S.**
Detection of Mammaglobin mRNA in the plasma of breast cancer patients.
Ann. N. Y. Acad. Sci. **945**: 192-194 (2001a).
- Gal, S., Fidler, C., Turner, S., Lo, Y.M., Roberts, D.J. & Wainscoat, J.S.**
Detection of *Plasmodium falciparum* DNA in plasma.
Ann. N. Y. Acad. Sci. **945**: 234-238 (2001b).
- Garcia-Olmo, D., Garcia-Olmo, D.C., Ontanon, J., Martinez, E. & Vallejo, M.**
Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. the hypothesis of the genomestasis.
Histol. Histopathol. **14**: 1159-1164 (1999).
- Gastman, B.R.**
Apoptosis and its clinical impact.
Head Neck **23**: 409-425 (2001).

- Gauthier, V.J., Tyler, L.N. & Mannik, M.**
Blood clearance kinetics and liver uptake of mononucleosomes in mice.
J. Immunol. **156**: 1151-1156 (1996).
- Geara, F.B., Peters, L.J., Ang, K.K., Wike, J.L. & Brock, W.A.**
Prospective comparison of in vitro normal cell radiosensitivity and normal tissue reactions in radiotherapy patients.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **27**: 1173-1179 (1993).
- Geara, F.B., Peters, L.J., Ang, K.K., Garden, A.S., Tucker, S.L., Levy, L.B. & Brown, B.W.**
Comparison between normal tissue reactions and local tumor control in head and neck cancer patients treated by definitive radiotherapy.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **35**: 455-462 (1996).
- Giacona, M.B., Ruben, G.C., Iczkowski, K.A., Roos, T.B., Porter, D.M. & Sorenson, G.D.**
Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls.
Pancreas **17**: 89-97 (1998).
- Glücksmann, A.**
Cell deaths in normal vertebrate ontogeny.
Biol. Rev. **26**: 59-86 (1951).
- Goessl, C., Heicappell, R., Munker, R., Anker, P., Stroun, M., Krause, H., Muller, M. and Miller, K.**
Microsatellite analysis of plasma DNA from patients with clear cell renal carcinoma.
Cancer Res. **58**: 4728-4732 (1998).
- Gold, R., Schmied, M., Giegerich, G., Breitschopf, H., Hartung, H.P., Toyka, K.V. & Lassmann, H.**
Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of in situ tailing and nick translation techniques.
Lab. Invest. **71**: 219-225 (1994).
- Golstein, P.**
Controlling cell death.
Science **275**: 1081-1082 (1997).
- Gonzales, R., Silva, J.M., Sanchez, A., Dominguez, G., Garcia, J.M., Chen, X.Q., Stroun, M., Provencio, M., Espana, P., Anker, P. & Bonilla, F.**
Microsatellite alterations and TP 53 mutations in plasma DNA of small-cell lung cancer patients: follow-up study and prognostic significance.
Ann. Oncol. **11**: 1097-1104 (2000).
- Gorczyca, W., Gong, J. & Darzynkiewicz, Z.**
Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays.
Cancer Res. **53**: 1945-1951 (1993a).
- Gorczyca, W., Bigman, K., Mittelman, A., Ahmed, T., Gong, J., Melamed, M.R. & Darzynkiewicz, Z.**
Induction of DNA strand breaks associated with apoptosis during treatment of leukemias.
Leukemia **7**: 659-670 (1993b).
- Goto, A., Kanda, H., Ishikawa, Y., Matsumoto, S., Kawaguchi, N., Machinami, R., Kato, Y. & Kitagawa, T.**
Association of loss of heterozygosity at the p53 locus with chemoresistance in osteosarcomas.
Jap. J. Cancer Res. **89**: 539-547 (1998).
- Goyal, L.**
Cell death inhibition: keeping caspases in check.
Cell **104**: 805-808 (2001).
- Gräper, L.**
Eine neue Anschauung über physiologische Zellausschaltung.
Arch. Zellforsch. **12**: 373-394 (1914).
- Graham, S.H. & Chen, J.**
Programmed cell death in cerebral ischemia.
J. Cereb. Blood Flow Metabol. **21**: 99-109 (2001).
- Granville, D.J., Carthy, C.M., Hunt, D.W.C. & McManus, B.M.**
Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease.
Lab. Invest. **78**: 893-913 (1998).
- Green, D.R. & Reed, J.C.**
Mitochondria and apoptosis.
Science **281**: 1309-1316 (1998).

- Grinstein, S.**, Preciado, M.V., Gattuso, P., Chabay, P.A., Warren, W.H., De Matteo, E. & Gould, V.E.
Demonstration of Epstein-Barr Virus in carcinomas of various sites.
Cancer Res. **62**: 4876-4878 (2002).
- Grossmann, J.**
Molecular mechanisms of “detachment-induced apoptosis – Anoikis”
Apoptosis **7**: 247-260 (2002).
- Grunstein, M.**
Histone acetylation in chromatin structure and transcription.
Nature **389**: 349-352 (1997).
- Hagmann, M.**
How chromatin changes its shape.
Science **285**: 1200-1202 (1999).
- Hannun, Y.A.**
Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy.
Blood **6**: 1845-1853 (1997).
- Hashimoto, T.**, Tokuchi, Y., Hayashi, M., Kobayashi, Y., Nishida, K., Hayashi, S., Ishikawa, Y., Tsuchiya, S., Nakagawa, K., Hayashi, J. & Tsuchiya, E.
P53 null mutations undetected by immunohistochemical staining predict a poor outcome with early-stage non-small cell lung carcinomas.
Cancer Res. **59**: 5572-5577 (1999).
- Hasholzner, U.**, Stieber, P., Hofmann, K., Nagel, D. & Hoegg, A.
Stability of serum-cytokeratins and –cytokeratin-fragments following different pre-treatment.
Anticancer Res. **19**: 5735 (1999) *Abstract*.
- Hayashi, T.**, Sugahara, K., Dateki, N., Yamada, Y., Sudou, R., Kanematsu, T. & Kamihira, S.
Characteristics of plasma DNA and its application for detection of K-ras gene mutation.
Rinsho Byori **48**: 547-553 (2000).
- Hendry, J.H. & West, C.M.**
Implications of delayed reproductive cell death (lethal mutations/genomic instability) for the interpretation of tissue responses.
Int. J. Radiat. Biol. **68**: 363-367 (1995).
- Hendry, J.H. & West, C.M.**
Apoptosis and mitotic cell death: their relative contributions to normal-tissue and tumour radiation response.
Int. J. Radiat. Biol. **71**: 709-719 (1997).
- Hendry, J.H.**
Genomic instability: potential contributions to tumour and normal tissue response, and second tumours, after radiotherapy.
Radiother. Oncol. **59**: 117-126 (2001).
- Hengartner, M.O.**, Ellis, R.E. & Horvitz, H.R.
Caenorhabditis elegans gene *ced-9* protects cells from programmed cell death.
Nature **356**: 494-499 (1992).
- Hengartner, M.O.**
The biochemistry of apoptosis.
Nature **407**: 770-776 (2000).
- Hengartner, M.O.**
Apoptosis: Corraling the corpses.
Cell **104**: 325-328 (2001).
- Hentze, H.**, Schoebel, F., Lund, S., Kehl, M., Ertel, W., Wendel, A., Jäättelä, M. & Leist, M.
In vivo and in vitro evidence for extracellular caspase activity released from apoptotic cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **283**: 1111-1117 (2001).
- Herman, J.G.**
Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer.
Sem. Cancer Biol. **9**: 359-367 (2000a).
- Herman, J.G. & Baylin, S.B.**
Promoter-region hypermethylation and gene silencing in human cancer.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. **249**: 35-54 (2000b).

- Hermine, O.**, Haioun, C., Lepage, E., D'Agay, M.F., Briere, J., Lavignac, C., Fillet, G., Salles, G., Marolleau, J.P., Diebold, J., Reyes, F. & Gaulard, P.
Prognostic significance of Bcl-2 protein expression in aggressive Non-Hodgkin's lymphoma.
Blood **87**: 265-272 (1996).
- Herod, J.J.**, Eliopoulos, A.G., Warwick, J., Niedobitek, G., Young, L.S. & Kerr, J.R.
The prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in ovarian carcinoma.
Cancer Res. **56**: 2178-2184 (1996).
- Herr, I.** & Debatin, K.M.
Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy.
Blood **98**: 2603-2614 (2001).
- Hewish, D.R.** & Burgoyne, L.A.
Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease.
Biochem. Biophys. Res. Comm. **52**: 504-510 (1973).
- Hickman, J.A.**, Potten, C.S., Merritt, A.J. & Fisher, T.C.
Apoptosis and cancer chemotherapy.
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. **345**: 319-325 (1994).
- Hickman, J.A.**
Apoptosis and Chemotherapy Resistance.
Eur. J. Cancer **32**: 921-926 (1996).
- Hill, R.P.**, Rodemann, H.P., Hendry, J.H., Roberts, S.A. & Anscher, M.S.
Normal tissue radiobiology: from the laboratory to the clinic.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **49**: 353-365 (2001).
- Hofer, M.F.**, Newell, K., Duke, R.C., Schlievert, P.M., Freed, J.H. & Leung, D.Y.M.
Differential effects of staphylococcal toxic shock syndrome toxin-1 on B cell apoptosis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **93**: 5425-5430 (1996).
- Horvitz, H.R.**, Ellis, H.M. & Sternberg, P.W.
Programmed cell death in nematode development.
Neurosci. Comment. **1**: 56-65 (1982).
- <http://www.biochem.roche.com>
- <http://www.cnbi.de>
- Huang, D.C.S.** & Strasser, A.
BH3-only proteins - essential initiators of apoptotic cell death.
Cell **103**: 839-842 (2000).
- Hwang, J.H.**, Lim, S.C., Kim, Y.C., Park, K.O., Ahn, S.J. & Chung, W.K.
Apoptosis and Bcl-2 expression as predictors of survival in radiation-treated non-small-cell lung cancer.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **50**: 13-18 (2001).
- Igney, F.**, Behrens, C.K. & Krammer, P.H.
Tumor counterattack - concept and reality.
Eur. J. Immunol. **30**: 725-731 (2000).
- Igney, F.** & Krammer, P.H.
Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis.
Nat. Rev. Cancer **2**: 277-288 (2002).
- Jacobson, M.D.**, Weil, M. & Raff, M.C.
Programmed cell death in animal development.
Cell **88**: 347-354 (1997).
- Jäättelä, M.**
Escaping cell death: survival proteins in cancer.
Exp. Cell Res. **248**: 30-43 (1999).
- Jahr, S.**, Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F.O., Hesch, R.D. & Knippers R.
DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells.
Cancer Res. **61**: 1659-1665 (2001).
- Jen, J.**, Wu, L. & Sidransky, D.
An overview on the isolation and analysis of circulating tumor DNA in plasma and serum.
Ann. N. Y. Acad. Sci. **906**: 8-12 (2000).

- Johnson, P.J. & Lo, Y.M.**
Plasma nucleic acids in the diagnosis and management of malignant disease.
Clin. Chem. **48**: 1186-1193 (2002).
- Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y.J., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y.M., Gavagnan, L., Ferri, K.F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y.Y., Mak, T.W., Zuniga-Pflucker, J.C., Kroemer, G. & Penninger, J.M.**
Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death.
Nature **410**: 549-554 (2001).
- Kanduc, D., Mittelman, A., Serpico, R., Sinigaglia, E., Sinha, A.A., Natale, C., Santacroce, R., Di Corcia, M.G., Lucchese, A., Dini, L., Pani, P., Santacroce, S., Simone, S., Bucci, R. & Farber, E.**
Cell death: apoptosis versus necrosis (review).
Int. J. Oncol. **21**: 165-170 (2002).
- Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E. & Poirier, G.G.**
Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis.
Cancer Res. **53**: 3976-3985 (1993).
- Kaufmann, S.H. & Gores, G.J.**
Apoptosis in cancer: cause and cure.
BioEssays **22**: 1007-1017 (2000).
- Kemp, C.J., Sun, S. & Gurley, K.E.**
P53 induction and apoptosis in response to radio- and chemotherapy in vivo is tumor-type-dependent.
Cancer Res. **61**: 327-332 (2001).
- Kerr, J.F.**
Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death.
J. Pathol. **105**: 13-20 (1971).
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R.**
Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.
Br. J. Cancer **26**: 239-257 (1972).
- Kerr, J.F., Winterford, C.M. & Harmon, B.V.**
Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy.
Cancer **73**: 2013-2026 (1994).
- Kerr, J.F., Gobe, G.C., Winterford, C.M. & Harmon, B.V.**
Anatomical methods in cell death.
Methods Cell Biol. **46**: 1-27 (1995).
- Kiltie, A.E., Ryan, A.J., Swindell, R., Barber, J.B., West, C.M., Magee, B. & Hendry, J.H.**
A correlation between residual radiation-induced DNA double-strand breaks in cultured fibroblasts and late radiotherapy reactions in breast cancer patients.
Radiother. Oncol. **51**: 55-65 (1999).
- Kim, J.M., Eckmann, L., Savidge, T.C., Lowe, D.C., Witthöft, T. & Kagnoff, M.F.**
Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacterial invasion.
J. Clin. Invest. **102**: 1815-1823 (1998).
- Kim, J.Y., Cho, H.Y., Lee, K.C., Hwang, Y.J., Lee, M.H., Roberts, S.A. & Kim, C.H.**
Tumor apoptosis in cervical cancer: its role as a prognostic factor in 42 radiotherapy patients.
Int. J. Cancer **96**: 305-312 (2001).
- Kitanaka, C. & Kuchino, Y.**
Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology.
Cell Death Differ. **6**: 508-515 (1999).
- Klionsky, D.J. & Emr, S.D.**
Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation.
Science **290**: 1717-1721 (2000).
- Kolenko, V.M., Uzzo, R.G., Bukowski, R. & Finke, J.H.**
Caspase-dependent and -independent death pathways in cancer therapy.
Apoptosis **5**: 17-20 (2000).
- Komaki, R., Fujii, T., Perkins, P., Ro, J.Y., Allen, P.K., Mason, K.A., Mountain, C.F. & Milas, L.**
Apoptosis and mitosis as prognostic factors in pathologically staged N1 nonsmall cell lung cancer.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **36**: 601-605 (1996).

- Konstantinidou, A.E.,** Korkolopoulou, P. & Patsouris, E.
Apoptotic markers for tumor recurrence: a minireview.
Apoptosis **7**: 461-470 (2002).
- Koopman, G.,** Reutelingsperger, C.P.M., Kuijten, G.A.M., Keehnen, R.M.J., Pals, S.T. & Van Oers, M.H.J.
Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis.
Blood **84**: 1415-1420 (1994).
- Kopreski, M.S.,** Benko, F.A., Kwak, L.W. & Gocke, C.D.
Detection of tumor messenger RNA in the serum of patients with malignant melanoma.
Clin. Cancer Res. **5**: 1961-1965 (1999).
- Kopreski, M.S.,** Benko, F.A., Borys, D.J., Khan, A., McGarrity, T.J. & Gocke, C.D.
Somatic mutation screening: identification of individuals harboring K-ras mutations with the use of plasma DNA.
J. Nat. Cancer Inst. **92**: 918-923 (2000).
- Kopreski, M.S.,** Benko, F.A. & Gocke, C.D.
Circulating RNA as a tumor marker: detection of 5T4 mRNA in breast and lung cancer patient serum.
Ann. N. Y. Acad. Sci. **945**: 172-178 (2001).
- Kornberg, R.**
Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA.
Science **184**: 868-871 (1974).
- Kornberg, R.**
Structure of the Chromatin.
Ann. Rev. Biochem. **46**: 931-954 (1977).
- Kornberg, R. & Lorch, Y.**
Twenty-Five Years of the Nucleosome, Fundamental Particle of the Eukaryote Chromosome.
Cell **98**: 285-294 (1999).
- Kornbluth, R.S.**
The immunological potential of apoptotic debris produced by tumor cells and during HIV infection.
Immunol. Lett. **43**: 125-132 (1994).
- Krammer, P.H.**
Apoptose im Immunsystem: Mord oder Selbstmord.
Onkologie **20**: 239-243 (1997).
- Krammer, P.H.**
CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die.
Adv. Immunol. **71**: 163-210 (1999)
- Krammer, P.H.**
Apoptose.
Dt. Arztebl. **97**: 1752-1759 (2000a).
- Krammer, P.H.**
CD95's deadly mission in the immune system.
Nature **407**: 789-795 (2000b).
- Kroemer, G.**
The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis.
Nature Med. **3**: 614-619 (1997).
- Kumar, S.**
Mechanisms mediating caspase activation in cell death.
Cell Death Differ. **6**: 1060-1066 (1999).
- Kuroi, K.,** Tanaka, C. & Toi, M.
Plasma nucleosome levels in node-negative breast cancer patients.
Breast Cancer **6**: 361-364 (1999).
- Kuroi, K.,** Tanaka, C. & Toi, M.
Clinical significance of plasma nucleosome levels in cancer patients.
Int. J. Oncol. **19**: 143-148 (2001).
- Lambert, N.C.,** Stevens, A.M., Tylee, T.S., Erickson, T.D., Furst, D.E. & Nelson, J.L.
From the simple detection of microchimerism in patients with autoimmune diseases to its implication in pathogenesis.
Ann. N. Y. Acad. Sci. **945**: 164-171 (2001).

Lane, D.P.

Cancer. P53, guardian of the genome.
Nature **358**: 15-16 (1992).

Langendijk, H., Thunnissen, E., Arends, J.W., de Jong, J., ten Velde, G., Lamers, R., Guinee, D., Holden, J. & Wouters, M.
Cell proliferation and apoptosis in stage III inoperable non-small cell lung carcinoma treated by radiotherapy.
Radiother. Oncol. **56**: 197-207 (2000).

Lara, P.C., Perez, S., Rey, A. & Santana, C.

Apoptosis in carcinoma of the bladder: relation with radiation treatment results.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **43**: 1015-1019 (1999).

Le Lann-Terisse, A.D., Fournie, G.J. & Benoist, H.

Nucleosome-dependent escape of tumor cells from natural-killer-mediated lysis: nucleosomes are taken up by target cells and act at a postconjugation level.
Cancer Immunol. Immunother. **43**: 337-344 (1997).

Lee, T.H., Montalvo, L., Chrebtow, V. & Busch, M.P.

Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma
Transfusion **41**: 276-282 (2001).

Leers, M.P.G., Kölgen, W., Björklund, V., Bergman, T., Tribbick, G., Persson, B., Björklund, P., Ramaekers, F.C.S., Björklund, B., Nap, M., Jörnvall, H. & Schutte, B.

Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis.
J. Pathol. **187**: 567-572 (1999).

Lei, K.I., Chan, L.Y.S., Chan, W.Y., Johnson, P.J. & Lo, Y.M.

Diagnostic and prognostic implications of circulating cell-free Epstein-Barr Virus DNA in natural killer / T-cell lymphoma.
Clin. Cancer Res. **8**: 29-34 (2002).

Leist, M., Gartner, F., Bohlinger, I., Tiegs, G. & Wendel, A.

Application of the Cell Death Detection ELISA for the detection of tumor necrosis factor-induced DNA fragmentation in murine models of inflammatory organ failure.
Biochemica **3**: 18-20 (1994).

Leist, M. & Nicotera, P.

The shape of cell death.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **236**: 1-9 (1997a).

Leist, M., Single, B., Castoldi, A.F., Kuhnle, S. & Nicotera, P.

Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis.
J. Exp. Med. **185**: 1481-1486 (1997b).

Leist, M. & Nicotera, P.

Calcium and neuronal death.
Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. **132**: 79-125 (1998).

Leist, M. & Jäätelä, M.

Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms.
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. **2**: 1-10 (2001).

Lenz, H.J., Hayashi, K., Salonga, D., Danenberg, K.D., Danenberg, P.V., Metzger, R., Banerjee, D., Bertino, J.R., Groshen, S., Leichman, L.P. & Leichman, C.G.

P53 point mutations and thymidylate synthase messenger RNA levels in disseminated colorectal cancer: an analysis of response and survival.
Clin. Cancer Res. **4**: 1243-1250 (1998).

Leon, S.A., Shapiro, B., Sklaroff, D.M. & Yaros, M.J.

Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy.
Cancer Res. **37**: 646-650 (1977).

Leoncini, L., Del Vecchio, M.T., Megha, T., Barbini, P., Galieni, P., Pileri, S., Sabattini, E., Gherlinzoni, F., Tosi, P. & Kraft, R.

Correlations between apoptotic and proliferative indices in malignant non-Hodgkin's lymphomas.
Am. J. Pathol **142**: 755-763 (1993).

Leung, T.N., Zhang, J., Lau, T.K., Hjelm, N.M. & Lo, Y.M.

Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour.
Lancet **352**: 1904-1905 (1998).

- Levine, E.L.,** Renehan, A., Gossiel, R., Davidson, S.E., Roberts, S.A., Chadwick, C., Wilks, D.P., Potten, C.S., Hendry, J.H., Hunter, R.D. & West, C.M.L.
Apoptosis, intrinsic radiosensitivity and prediction of radiotherapy response in cervical carcinoma.
Radiotherap. Oncol. **37**: 1-9 (1995).
- Levine, A.J.**
P53, the cellular gatekeeper for growth and division.
Cell **88**: 323-331 (1997).
- Lichtenstein, A.V.,** Melkonyan, H.S., Tomei, L.D. & Umansky, S.R.
Circulating nucleic acids and apoptosis.
Ann. N. Y. Acad. Sci. **945**: 239-249 (2001).
- Liu, S.S.,** Tsang, B.K., Cheung, A.N.Y., Xue, W.C., Cheng, D.K.L., Ng, T.Y., Wong, L.C. & Ngan, H.Y.S.
Anti-apoptotic proteins, apoptotic and proliferative parameters and their prognostic significance in cervical carcinoma.
Eur. J. Cancer **37**: 1104-1110 (2001).
- Liu, X.,** Zou, H., Slaughter, C. & Wang, X.
DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis.
Cell **89**: 175-184 (1997).
- Lo, Y.M.,** Corbetta, N., Chamberlain, P.F., Rai, V., Sargent, I.L., Redman, C.W. & Wainscoat, J.S.
Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum.
Lancet. **350**: 485-487 (1997).
- Lo, Y.M.,** Chan, L.Y., Lo, K.W., Leung, S.F., Zhang, J., Chan, A.T., Lee, J.C., Hjelm, N.M., Johnson, P.J. & Huang, D.P.
Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma.
Cancer Res. **59**: 1188-1191 (1999a).
- Lo, Y.M.,** Chan, L.Y., Chan, A.T., Leung, S.F., Lo, K.W., Zhang, J., Lee, J.C., Hjelm, N.M., Johnson, P.J. & Huang, D.P.
Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma.
Cancer Res. **59**: 5452-5455 (1999b).
- Lo, Y.M.,** Leung, S.F., Chan, L.Y., Chan, A.T., Lo, K.W., Johnson, P.J. & Huang, D.P.
Kinetics of plasma Epstein-Barr virus DNA during radiation therapy for nasopharyngeal carcinoma.
Cancer Res. **60**: 2351-2355 (2000a).
- Lo, Y.M.,** Chan, A.T., Chan, L.Y., Leung, S.F., Lam, C.W., Huang, D.P. & Johnson, P.J.
Molecular prognostication of nasopharyngeal carcinoma by quantitative analysis of circulating Epstein-Barr virus DNA.
Cancer Res. **60**: 6878-6881 (2000b).
- Lo, Y.M.**
Fetal DNA in maternal plasma: biology and diagnostic applications.
Clin. Chem. **46**: 1903-1906 (2000c).
- Lo, Y.M.,** Rainer, T.H., Chan, L.Y., Hjelm, N.M & Cocks, R.A.
Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients.
Clin. Chem. **46**: 319-323 (2000d).
- Lo, Y.M.**
Circulating nucleic acids in plasma and serum: an overview.
Ann. N. Y. Acad. Sci. **945**: 1-8 (2001a).
- Lo, Y.M.,** Chan, W.Y., Ng, E.K.W., Chan, L.Y.S., Lai, P.B.S., Tam, J.S. & Chung, S.C.S.
Circulating Epstein-Barr virus DNA in the serum of patients with gastric carcinoma.
Clin. Cancer Res. **7**: 1856-1859 (2001b).
- Lockshin, R.A. & Williams, C.M.**
Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms.
J. Insect Physiol. **10**: 643-649 (1964).
- Lockshin, R.A.**
Programmed cell death. Activation of lysis by a mechanism involving the synthesis of protein.
J. Insect Physiol. **15**: 1505-1516 (1969).
- Lockshin, R.A.,** Osborne, B. & Zakeri, Z.
Cell death in the third millennium.
Cell Death Differ. **7**: 2-7 (2000).
- Los, M.,** Herr, I., Friesen, C., Fulda, S., Schulze-Osthoff, K. & Debatin, K.M.
Cross-resistance of CD95- and drug-induced apoptosis as a consequence of deficient activation of caspases.
Blood **90**: 3118-3129 (1997).

- Lowin, B., Peitsch, M.C. & Tschopp, J.**
Perforin and granzymes: crucial effector molecules in cytolytic T lymphocyte and natural killer cell-mediated cytotoxicity.
In: Griffiths, G.M. & Tschopp, J. Pathways for cytolysis. Springer-Verlag: 1-24 (1995).
- Lu, C. & Tanigawa, N.**
Spontaneous apoptosis is inversely related to intratumoral microvessel density in gastric carcinoma.
Cancer Res. **57**: 221-224 (1997).
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. & Richmond, T.J.**
Crystal structure of the nucleosome core particle at 2,8 Å resolution.
Nature **389**: 251-260 (1997).
- Macanovic, M. & Lachmann, P.J.**
Measurement of deoxyribonuclease I (DNase) in the serum and urine of systemic lupus erythematosus (SLE)-prone NZB/NZW mice by a new radial enzyme diffusion assay.
Clin. Exp. Immunol. **108**: 220-226 (1997).
- Maebo, A.**
Plasma DNA level as a tumor marker in primary lung cancer.
Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi **28**: 1085-1091 (1990).
- Maity, A., McKenna, G. & Muschel, R.J.**
The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review.
Radiotherap. Oncol. **31**: 1-13 (1994).
- Majno, G., La Gattuta, M. & Thompson, T.E.**
Cellular death and necrosis: chemical, physical and morphologic changes in rat liver.
Virchows Arch. Pathol. Anat. **333**: 421-465 (1960).
- Majno, G. & Joris, I.**
Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death.
Am. J. Pathol. **146**: 3-15 (1995).
- Mandel, P. & Metais, P.**
Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme.
C.R. Acad. Sci. Paris **142**: 241-243 (1948).
- Mani, S., Manalo, J. & Bregman, D.**
Novel combinations with oxaliplatin.
Oncology **14** (Suppl): 52-58 (2000).
- Mannherz, H.G., Peitsch, M.C., Zanotti, S., Paddenberg, R. & Polzar, B.**
A new function for an old enzyme: the role of DNase I in apoptosis.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. **198**: 161-174 (1995).
- Martin, D.S., Stolfi, R.L. & Colofiore, J.R.**
Perspective: the chemotherapeutic relevance of apoptosis and a proposed biochemical cascade for chemotherapeutically induced apoptosis.
Cancer Invest. **15**: 372-381 (1997).
- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P.M., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, R.C.A.A., La Face, D.M. & Green, D.R.**
Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl.
J. Exp. Med. **182**: 1545-1556 (1995).
- Martins, G.A., Kawamura, M.T. & Carvalho, M.D.**
Detection of DNA in the plasma of septic patients.
Ann. N.Y. Acad. Sci. **906**: 134-140 (2000).
- Matsuyama, S., Llopis, J., Deveraux, Q.L., Tsien, R.Y. & Reed, J.C.**
Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis.
Nat. Cell Biol. **2**: 318-325 (2000).
- Mattson, M.P., Duan, W., Pedersen, W.A. & Culmsee, C.**
Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases.
Apoptosis **6**: 69-81 (2001).
- Mayall, F., Fairweather, S., Wilkins, R., Chang, B. & Nicholls, R.**
Microsatellite abnormalities in plasma of patients with breast carcinoma: concordance with the primary tumour.
J. Clin. Pathol. **52**: 363-366 (1999).

- McIlroy, D.**, Sakahira, H., Talanian, R.V. & Nagata, S.
Involvement of caspase 3-activated DNase in internucleosomal DNA cleavage induced by diverse apoptotic stimuli.
Oncogene **18**: 4401-4408 (1999).
- Meier, P.**, Finch, A. & Evan G.
Apoptosis in development.
Nature **407**: 796-801 (2000).
- Melino, G.**
The meaning of death.
Cell Death Differ. **9**: 347-348 (2002).
- Meng, X.W.**, Fraser, M.J., Feller, J.M. & Ziegler, J.B.
Caspase-3-dependent and caspase-3-independent pathways leading to chromatin DNA fragmentation in HL-60 cells.
Apoptosis **5**: 61-67 (2000).
- Mesner, P.W.** & Kaufmann, S.H.
Methods utilized in the study of apoptosis.
Adv. Pharmacol. **41**: 57-87 (1997a).
- Mesner, P.W.**, Budihardjo, I.I. & Kaufmann, S.H.
Chemotherapy-induced apoptosis.
Adv. Pharmacol. **41**: 461-500 (1997b).
- Metzstein, M.M.**, Stanfield, G.M. & Horvitz, H.R.
Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future.
Trends Genet. **14**: 410-416 (1998).
- Meyn, R.E.**, Stephens, L.C., Ang, K.K., Hunter, N.R., Brock, W.A., Milas, L. & Peters, L.J.
Heterogeneity in the development of apoptosis in irradiated murine tumours of different histologies.
Int. J. Radiat. Biol. **64**: 583-591 (1993a).
- Meyn, R.E.**, Stephens, L.C., Voehringer, D.W., Story, M.D., Mirkovic, N. & Milas, L.
Biochemical modulation of radiation- induced apoptosis in murine lymphoma cells.
Radiat. Res. **136**: 327-334 (1993b).
- Meyn, R.E.**, Stephens, L.C., Hunter, N.R. & Milas, L.
Induction of apoptosis in murine tumors by cyclophosphamide.
Cancer Chemother. Pharmacol. **33**: 410-414 (1994a).
- Meyn, R.E.**, Stephens, L.C., Hunter, N.R., Ang, K.K. & Milas, L.
Reemergence of apoptotic cells between fractionated doses in irradiated murine tumors.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **30**: 619-624 (1994b).
- Meyn, R.E.**, Stephens, L.C., Hunter, N.R. & Milas, L.
Kinetics of cisplatin-induced apoptosis in murine mammary and ovarian adenocarcinomas.
Int. J. Cancer **60**: 725-729 (1995).
- Meyn, R.E.**, Stephens, L.C., Mason, K.A. & Medina, D.
Radiation-induced apoptosis in normal and pre-neoplastic mammary glands in vivo: significance of gland differentiation and p53 status.
Int. J. Cancer **65**: 466-472 (1996a).
- Meyn, R.E.**, Stephens, L.C. & Milas, L.
Programmed cell death and radioresistance.
Cancer Metast. Rev. **15**: 119-131 (1996b).
- Milas, L.**, Hunter, N., Kurdoglu, B., Mason, K.A., Meyn, R.E., Stephens, L.C. & Peters, L.J.
Kinetics of mitotic arrest and apoptosis in murine mammary and ovarian tumors treated with taxol.
Cancer Chemother. Pharmacol. **35**: 297-303 (1995).
- Milner, A.E.**, Palmer, D.H., Hodgkin, E.A., Eliopoulos, A.G., Knox, P.G., Poole, C.J., Kerr, D.J. & Young, L.S.
Induction of apoptosis by chemotherapeutic drugs: the role of FADD in activation of caspase-8 and synergy with death receptor ligands in ovarian carcinoma cells.
Cell Death Differ. **9**: 287-300 (2002).
- Mirkovic, N.**, Meyn, R.E., Hunter, N.R. & Milas, L.
Radiation-induced apoptosis in a murine lymphoma in vivo.
Radiother. Oncol. **33**: 11-16 (1994).
- Mirzaie-Joniani, H.**, Eriksson, D., Sheikholvaezin, A., Johansson, A., Löfroth, P.O., Johansson, L. & Stigbrand, T.
Apoptosis induced by low-dose and low-dose-rate radiation.
Cancer **94**: 1210-1214 (2002).

- Mitsudomi, T.**, Hamajima, H., Ogawa, M. & Takahashi, T.
Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis.
Clin. Cancer Res. **6**: 4055-4063 (2000).
- Monestier, M.**
Autoantibodies to nucleosomes and histone-DNA complexes.
Methods **11**: 36-43 (1997).
- Moonen, L.**, Ong, F., Gallee, M., Verheij, M., Horenblas, S., Hart, A.A. & Bartelink, H.
Apoptosis, proliferation and p53, cyclin D1, and retinoblastoma gene expression in relation to radiation response in transitional cell carcinoma of the bladder.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **49**: 1305-1310 (2001).
- Mulcahy, H.E.**, Lyautey, J., Lederrey, C., Chen, X.Q., Anker, P., Alstead, E.M., Ballinger, A., Farthing, M.J. & Stroun, M.
A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients.
Clin. Cancer Res. **4**: 271-275 (1998).
- Mulcahy, H.E.**, Lyautey, J., Lederrey, C., Chen, X.Q., Lefort, F., Vasioukhin, V., Anker, P., Alstead, E.M., Farthing, M.J. & Stroun, M.
Plasma DNA K-ras mutations in patients with gastrointestinal malignancies.
Ann. N. Y. Acad. Sci. **906**: 25-28 (2000).
- Müller, M.**, Scaffidi, C.A., Galle, P.R., Stremmel, W. & Krammer, P.H.
The role of p53 and the CD95 (APO-1/Fas) death system in chemotherapy-induced apoptosis.
Eur. Cytokine Netw. **9**: 685-686 (1998).
- Muzio, M.**, Chinnaiyan, A.M., Kischkel, F.C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J.D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P.H., Peter, M.E. & Dixit, V.M.
FLICE, a novel FADD-homologous ICE/ced-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/Apo-1) death-inducing signaling complex.
Cell **85**: 817-827 (1996).
- Nagata, S.** & Golstein, P.
The Fas death factor.
Science **267**: 1449-1455 (1995).
- Nagata, S.**
Apoptosis by death factor.
Cell **88**: 355-365 (1997).
- Nagata, S.**
Apoptotic DNA fragmentation.
Exp. Cell Res. **256**: 12-18 (2000).
- Nakayama, T.**, Taback, B., Nguyen, D.H., Chi, D.D., Morton, D.L., Fujiwara, Y. & Hoon, D.S.
Clinical significance of circulating DNA microsatellite markers in plasma of melanoma patients.
Ann. N. Y. Acad. Sci. **906**: 87-98 (2000).
- Nawroz, H.**, Koch, W., Anker, P., Stroun, M. & Sidransky, D.
Microsatellite alterations in serum DNA of head and neck cancer patients.
Nature Med. **2**: 1035-1037 (1996).
- Nicholson, D.W.**
Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death.
Cell Death Differ. **6**: 1028-1042 (1999).
- Nicholson, D.W.**
From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents.
Nature **407**: 810-816 (2000).
- Nicotera, P.**, Leist, M. & Ferrando-May, E.
Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis.
Toxicol. Lett. **102-103**: 139-142 (1998).
- Nicotera, P.**, Leist, M. Single, B. & Volbracht, C.
Execution of apoptosis: converging or diverging pathways?
Biol. Chem. **380**: 1035-1040 (1999).
- Oberhammer, F.**, Wilson, J.W., Dive, C., Morris, I.D., Hickman, J.A., Wakeling, A.E., Walker, P.R. & Sikorska, M.
Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation.
EMBO J. **12**: 3679-3684 (1993).

- Odaka, C. & Mizuochi, T.**
Role of macrophage lysosomal enzymes in the degradation of nucleosomes of apoptotic cells.
J. Immunol. **163**: 5346-5352 (1999).
- O'Flaherty, E., Wong, W.K., Petit, S.J., Seymour, K., Ali, S. & Kirby, J.A.**
Regulation of T-cell apoptosis: a mixed lymphocyte reaction model.
Immunol. **100**: 289-299 (2000).
- Ostermeier, B., Zedler, S. & Faist, E.**
Apoptotic response of mononuclear leukocytes following major surgery.
in Klein, H.G. & Seidel D. "Research Festival 1997".
MMV-Verlag, München: 224 (1997) *Abstract*
- Pace, E., Melis, M., Siena, L., Bucchieri, F., Vignola, A.M., Profita, M., Gjomarkaj, M. & Bonsignore, G.**
Effects of gemcitabine on cell proliferation and apoptosis in non-small-cell lung cancer (NSCLC) cell lines.
Cancer Chemother. Pharmacol. **46**: 467-476 (2000).
- Papac, R.J.**
Spontaneous regression of cancer.
Cancer Treatment Rev. **22**: 395-423 (1996).
- Paxton, J.R., Bolger, B.S., Armour, A., Symonds, R.P., Mao, J.H. & Burnett, R.A.**
Apoptosis in cervical squamous carcinoma: predictive value for survival following radiotherapy.
J. Clin. Pathol. **53**: 197-200 (2000).
- Pegoraro, L., Palumbo, A., Erikson, J., Falda, M., Giovanazzo, B., Emanuel, B.S., Rovero, G., Nowell, P.C. & Croce, C.M.**
A 14;18 and an 8;14 chromosome translocation in a cell line derived from an acute B-cell leukemia.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**: 7166-7170 (1984).
- Peitsch, M.C., Hestekamp, T., Polzar, B., Mannherz, H.G. & Tschopp J.**
Functional characterisation of serum DNase I in MRL-lpr/lpr mice.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **186**: 739-745 (1992).
- Peitsch, M.C., Polzar, B., Stephan, H., Crompton, T., MacDonald, H.R., Mannherz, H.G. & Tschopp, J.**
Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death).
EMBO J. **12**: 371-377 (1993).
- Peitsch, M.C., Irmeler, M., French, L.E. & Tschopp J.**
Genomic organisation and expression of mouse deoxyribonuclease I.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **207**: 62-68 (1995).
- Pezzala, F., Turley, H., Kuzu, J., Tungekar, M.F., Dunnill, M.S., Pierce, C.B., Harris, A., Gatter, K.G. & Mason, D.Y.**
Bcl-2 protein in non-small cell lung carcinoma.
N. Engl. J. Med. **329**: 690-694 (1993).
- Pirollo, K.F., Hao, Z., Rait, A., Jang, Y.J., Fee, W.E., Ryan, P., Chiang, Y. & Chang, E.H.**
P53 mediated sensitization of squamous cell carcinoma of the head and neck to radiotherapy.
Oncogene **14**: 1735-1746 (1997).
- Pisetsky, D.S.**
Immunostimulatory DNA: A clear and present danger?
Nature Med. **3**: 829-831 (1997).
- Plattner, H. & Hentschel, J.**
Taschenlehrbuch Zellbiologie.
Thieme-Verlag, Stuttgart, 1.Auflage (1997).
- Polzar, B., Zanotti, S., Stephan, H., Rauch, F., Peitsch, M.C., Irmeler, M., Tschopp, J. & Mannherz, H.G.**
Distribution of deoxyribonuclease I in rat tissues and its correlation to cellular turnover and apoptosis (programmed cell death).
Eur. J. Cell. Biol. **64**: 200-210 (1994).
- Poon, L.M., Leung, T.N., Lau, T.K. & Lo, Y.M.**
Prenatal detection of fetal Down's syndrome from maternal plasma.
Lancet **356**: 1819-1820 (2000a).
- Poon, L.M., Leung, T.N., Lau, T.K. & Lo, Y.M.**
Presence of fetal RNA in maternal plasma.
Clin. Chem. **46**: 1832-1834 (2000b).

- Poremba, C.**, Simon, R., Boecker, W. & Dockhorn-Dworniczak, B.
Molekulare Ursachen der Tumorentstehung.
Onkologie **5**: 847-854 (1999).
- Prindull, G.**
Apoptosis in the embryo and tumorigenesis.
Eur. J. Cancer **31**: 116-123 (1995).
- Pyun, E.H.**, Pisetsky, D.S. & Gilkeson, G.S.
The fine specificity of monoclonal anti-DNA antibodies induced in normal mice by immunization with bacterial DNA.
J. Autoimmun. **6**: 11-26 (1993).
- Raff, M.C.**
Social controls on cell survival and cell death.
Nature **356**: 397- 399 (1992).
- Ravi, D.**, Ramadas, K., Mathew, B.S., Panikkar, K.R., Nair, M.K. & Pillai, M.R.
Apoptosis, angiogenesis and proliferation: trifunctional measure of tumour response to radiotherapy for oral cancer.
Oral Oncol **37**: 164-171 (2001).
- Reed, J.C.**, Cuddy, M., Slabiak, T., Croce, C.M. & Nowell, P.C.
Oncogenic potential of bcl-2 demonstrated by gene transfer.
Nature **336**: 259-261 (1988).
- Reed, J.C.**
Bcl-2 family proteins: strategies for overcoming chemoresistance in cancer.
Adv. Pharmacol. **41**: 501-532 (1997).
- Reed, J.C.**
Dysregulation of apoptosis in cancer.
J. Clin. Oncol. **17**: 2941-2953 (1999).
- Reed, J.C.**
Apoptosis-based therapies.
Nat. Rev. Drug Discov. **1**: 111-121 (2002).
- Reeve, J.G.**, Xiong, J., Morgan, J. & Bleehen, N.M.
Expression of apoptosis-regulatory genes in lung tumor cell lines: relationship to p53 expression and relevance to acquired drug resistance.
Br. J. Cancer **73**: 1193-1200 (1996).
- Rhodes, D.**
The nucleosome core all wrapped up.
Nature **389**: 231-232 (1997).
- Rich, T.**, Allen, R.L. & Wyllie, A.H.
Defying death after DNA damage.
Nature **407**: 777-783 (2000).
- Richter, C.**, Schweizer, M., Cossarizza, A. & Franceschi, C.
Control of apoptosis by the cellular ATP level
FEBS Lett. **378**: 107-110 (1996).
- Robertson, J.D.**, Fadeel, B., Zhivotovsky, B. & Orrenius, S.
“Centennial” nobel conference on apoptosis and human disease.
Cell Death Differ. **9**: 468-475 (2002).
- Rodel, C.**, Grabenbauer, G.G., Rodel, F., Birkenhake, S., Kuhn, R., Martus, P., Zorcher, T., Fursich, D., Papadopoulos, T., Dunst, J., Schrott, K.M. & Sauer, R.
Apoptosis, p53, bcl-2, and Ki-67 in invasive bladder carcinoma: possible predictors for response to radiochemotherapy and successful bladder preservation.
Int. J. Radiat. Oncol. Phys. **46**: 1213-1221 (2000).
- Rodel, C.**, Grabenbauer, G.G., Papadopoulos, T., Bigalke, M., Gunther, K., Schick, C., Peters, A., Sauer, R. & Rodel, F.
Apoptosis as a cellular predictor for histopathologic response to neoadjuvant radiochemotherapy in patients with rectal cancer.
Int. J. Radiat. Oncol. Phys. **52**: 294-303 (2002).
- Rosell, R.**, Monzo, M., Alberola, V., Taron, M., Barnadas, A., Sanchez, J.M., Manzano, J.L. & Sanchez, J.J.
Determinants of response and resistance to cytotoxics.
Sem. Oncol. **29** (Suppl 4): 110-118 (2002).

- Rosen, A.** & Casciola-Rosen L.
Autoantigens as substrates for apoptotic proteases: implications for the pathogenesis of systemic autoimmune disease.
Cell Death Differ. **6**: 6-12 (1999).
- Rowan, S.,** Fisher, D.E.
Mechanisms of apoptotic cell death.
Leukemia **11**: 457-465 (1997).
- Rumore, P.M.** & Steinman, C.R.
Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus: occurrence as multimeric complexes bound to histones.
J. Clin. Invest. **86**: 471-477 (1990).
- Rumore, P.,** Muralidhar, B., Lin, M., Lai, C. & Steinman, C.R.
Hemodialysis as a model for studying endogenous plasma DNA: oligonucleosome-like structure and clearance.
Clin. Exp. Immunol. **90**: 56-62 (1992).
- Saegusa, M.,** Takano, Y., Wakabayashi, T. & Okayasu, I.
Apoptosis in gastric carcinomas and its association with cell proliferation and differentiation.
Jpn. J. Cancer Res. **86**: 743-748 (1995).
- Saikumar, P.,** Dong, Z., Mikhailov, V., Denton, M., Weinberg, J.M. & Venkatachalam, M.A.
Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease.
Am. J. Med. **107**: 489-506 (1999).
- Sakahira, H.,** Enari, M. & Nature, S.
Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis.
Nature **391**: 96-99 (1998).
- Sakakura, C.,** Koide, K., Ichikawa, D., Wakasa, T., Shirasu, M., Kimura, A., Taniguchi, H., Hagiwara, A., Yamaguchi, T., Inazawa, J., Abe, T., Takahashi, T. & Otsuji, E.
Analysis of histological therapeutic effect, apoptosis rate and p53 status after combined treatment with radiation hyperthermia and 5-fluorouracil suppositories for advanced rectal cancers.
Br. J. Cancer **77**: 159-166 (1998).
- Salgame, P.,** Varadhachary, A.S., Primiano, L.L., Fincke, J.E., Muller, S & Monestier, M.
An ELISA for detection of apoptosis.
Nucl. Acids Res. **25**: 680-681 (1997).
- Samali, A.,** Zhivotovsky, B., Jones, D., Nagata, S. & Orrenius, S.
Apoptosis: cell death defined by caspase activation.
Cell Death Differ. **6**: 495-496 (1999).
- Sartorius, U.,** Schmitz, I. & Krammer, P.
Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis.
Chembiochem. **2**: 20-29 (2001).
- Savill, J.** & Fadok, V.
Corpse clearance defines the meaning of cell death.
Nature **407**: 784-788 (2000).
- Savitz, S.I.** & Rosenbaum, D.M.
Apoptosis in neurological disease.
Neurosurg. **42**: 555-574 (1998).
- Scaffidi, C.,** Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H. & Peter, M.E.
Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways.
EMBO J. **17**: 1675-1687 (1998).
- Schär, P.**
Spontaneous DNA damage, genome instability, and cancer – when DNA replication escapes control.
Cell **104**: 329-332 (2001).
- Schneider, J.,** Presek, P., Braun, A., Löffler, S. & Weitowitz, H.J.
Serum ras (p21) as a marker for occupationally derived lung cancer?
Clin. Chem. Lab. Med. **38**: 301-305 (2000).
- Seiter, K.**
Induction of apoptosis by topotecan: implications for the treatment of leukemia.
Semin. Hematol. **35**: 22-25 (1998).
- Sekizawa, A.,** Samura, O., Zhen, D.K., Falco, V., Farina, A. & Bianchi, D.W.
Apoptosis in fetal nucleated erythrocytes circulating in maternal blood.
Prenat. Diagn. **20**: 886-889 (2000).

- Sgonc, R. & Wick, G.**
Methods for the detection of apoptosis.
Int. Arch. Allergy Immunol. **105**: 327-332 (1994).
- Shapiro, B., Chakrabarty, M., Cohn, E.M. & Leon, S.A.**
Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease.
Cancer **51**: 2116-2120 (1983).
- Shaw, J.A., Smith, B.M., Walsh, T., Johnson, S., Primrose, L., Slade, M.J., Walker, R.A. & Coombes, R.C.**
Microsatellite alterations plasma DNA of primary breast cancer patients.
Clin. Cancer Res. **6**: 1119-1124 (2000).
- Sheard, M.A., Krammer, P.H. & Zaloudik, J.**
Fractionated gamma-irradiation renders tumour cells more responsive to apoptotic signals through CD95.
Br. J. Cancer **80**: 1689-1696 (1999).
- Sheard, M.A., Vojtesek, B., Simickova, M. & Valik, D.**
Release of cytokeratin-18 and -19 fragments (TPS and CYFRA 21-1) into the extracellular space during apoptosis.
J. Cell. Biochem. **85**: 670-677 (2002).
- Sheridan, M.T., Cooper, R.A. & West, C.M.L.**
A high ratio of apoptosis to proliferation correlates with improved survival after radiotherapy for cervical adenocarcinoma.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **44**: 507-512 (1999).
- Shi, X., Liu, S., Kleeff, J., Friess, H. & Buchler, M.W.**
Acquired resistance of pancreatic cancer cells towards 5-Fluorouracil and Gemcitabine is associated with altered expression of apoptosis-regulating genes.
Oncology **62**: 354-362 (2002).
- Shintani, S., Mihara, M., Nakahara, Y., Terakado, N., Yoshihama, Y., Kiyota, A., Ueyama, Y. & Matsumura, T.**
Apoptosis and p53 are associated with effect of preoperative radiation in oral squamous cell carcinomas.
Cancer Lett. **154**: 71-77 (2000).
- Sidransky, D.**
Nucleic acid-based methods for the detection of cancer.
Science **278**: 1054-1059 (1997).
- Sidransky, D.**
Circulating DNA: What we know and what we need to learn.
Ann. N. Y. Acad. Sci. **906**: 1-4 (2000).
- Sidransky, D.**
Emerging molecular markers of cancer.
Nat. Rev. Cancer **2**: 210-219 (2002).
- Sierra, A., Castellsague, X., Escobedo, A., Lloveras, B., Garcia-Ramirez, M., Moreno, A. & Fabra, A.**
Bcl-2 with loss of apoptosis allows accumulation of genetic alterations: a pathway to metastatic progression in human breast cancer.
Int. J. Cancer (Pred. Oncol.) **89**: 142-147 (2000).
- Sigal, A. & Rotter, V.**
Oncogenic mutations of the tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome.
Cancer Res. **60**: 6788-6793 (2000).
- Silvestrini, R., Veneroni, S., Daidone, M.G., Benini, E., Boracchi, P., Mezzetti, M., Di Fronzo, G., Rilke, F. & Veronesi, U.**
The bcl-2 protein: a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer.
J. Natl. Cancer Inst. **86**: 499-504 (1994).
- Sinicropo, F.A., Ruan, S.B., Cleary, K.R., Stephens, L.C., Lee, J.J. & Levin, B.**
Bcl-2 and p53 oncoprotein expression during colorectal tumorigenesis.
Cancer Res. **55**: 237-241 (1995).
- Sionov, R.V. & Haupt, Y.**
The cellular response to p53: the decision between life and death.
Oncogene **18**: 6145-6157 (1999).
- Skalka, M., Matyasova, J. & Cejkova, M.**
DNA in chromatin of irradiated lymphoid tissues degrades *in vivo* into regular fragments.
FEBS Lett. **72**: 271-274 (1976).
- Slee, E.A., Adrain, C. & Martin, S.J.**
Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis.
Cell Death Differ. **6**: 1067-1074 (1999).

Smyth, M.J., Obeid, L.M. & Hannun, Y.A.

Ceramide: a novel lipid mediator of apoptosis.

Adv. Pharmacol. **41**: 133-154 (1997).

Sorenson, G.D., Pribish, D.M., Valone, P.H., Memoli, V.A., Bzik, D.J. & Yao, S.L.

Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood.

Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. **1**: 67-71 (1994).

Sorenson, G.D.

A review of studies on the detection of mutated KRAS2 sequences as tumor markers in plasma/serum of patients with gastrointestinal cancer.

Ann. N. Y. Acad. Sci. **906**: 13-16 (2000).

Sozzi, G., Musso, K., Ratcliffe, C., Goldstraw, P., Pierotti, M.A. & Pastorino, U.

Detection of microsatellite alterations in plasma DNA of non-small cell lung cancer patients: a prospect for early diagnosis.

Clin. Cancer Res. **5**: 2689-2692 (1999).

Sperandio, S., de Bell, I. & Bredesen, D.E.

An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death.

Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **97**: 14376-14381 (2000).

Stahnke, K., Fulda, S., Friesen, C., Strauss, G. & Debatin, K.M.

Activation of apoptosis pathways in peripheral blood lymphocytes by in vivo chemotherapy

Blood **98**: 3066-3073 (2001).

Steiner, G., Schoenberg, M.P., Linn, J.F., Mao, L. & Sidransky, D.

Detection of bladder cancer recurrence by microsatellite analysis of urine.

Nature Med. **3**: 621-624 (1997).

Steinman, C.R.

Free DNA in serum and plasma from normal adults.

J. Clin. Invest. **56**: 512-515 (1975).

Steller, H.

Mechanisms and genes of cellular suicide.

Science **267**: 1445-1449 (1995).

Stephens, L.C., Ang, K.K., Schultheiss, T.E., Milas, L. & Meyn, R.E.

Apoptosis in irradiated murine tumors.

Radiat. Res. **127**: 308-316 (1991).

Stephens, L.C., Hunter, N.R., Ang, K.K., Milas, L. & Meyn, R.E.

Development of apoptosis in irradiated murine tumors as a function of time and dose.

Radiat. Res. **135**: 75-80 (1993).

Stewart, B.W.

Mechanisms of apoptosis: integration of genetic, biochemical, and cellular indicators.

J. Natl. Cancer Inst. **86**: 1286-1296 (1994).

Stieber, P., Hasholzner, U., Bodenmüller, H., Nagel, D., Sunder-Plassmann, L., Dienemann, H., Meier, W. & Fateh-Moghadam, A.

CYFRA 21-1. A new marker in lung cancer.

Cancer **72**: 707-713 (1993).

Stieber, P., Dienemann, H., Schalhorn, A., Schmitt, U.M., Reinmiedl, J., Hofmann, K. & Yamaguchi, K.

Pro-gastrin-releasing peptide (ProGRP) – a useful marker in small cell lung carcinomas.

Anticancer Res. **19**: 2673-2678 (1999).

Stieber, P.

Sensible use of tumor markers.

J. Lab. Med. **25**: 327-336 (2001).

Stoetzer, O., Nüssler, V., Darsow, M., Gullis, E., Pelka-Fleischer, R., Scheel, U. & Wilmanns, W.

Association of bcl-2, bax, bcl-x_L and interleukin-1β-converting enzyme expression with initial response to chemotherapy in acute myeloid leukemia.

Leukemia **10** (Suppl): 18-22 (1996).

Strahl, B.D. & Allis, C.D.

The language of covalent histone modifications.

Nature **403**: 41-45 (2000).

- Stroun, M., Anker, P., Maurice, P. & Gahan, P.B.**
Circulating nucleic acids in higher organisms.
Int. Rev. Cytol. **51**: 1-48 (1977).
- Stroun, M., Anker, P., Lyautey, J., Lederrey, C. & Maurice, P.**
Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients.
Eur. J. Cancer Clin. Oncol. **23**: 707-712 (1987).
- Stroun, M., Anker, P., Maurice, P., Lyautey, J., Lederrey, C. & Beljanski, M.**
Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients.
Oncology **46**: 318-322 (1989).
- Stroun, M., Maurice, P., Vasioukhin, V., Lyautey, J., Lederrey, C., Lefort, F., Rossier, A., Chen, X.Q. & Anker, P.**
The origin and mechanism of circulating DNA.
Ann. N. Y. Acad. Sci. **906**: 161-168 (2000).
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. & Kroemer, G.**
Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor.
Nature **397**: 441-446 (1999).
- Szumiel, I.**
Monitoring and signaling of radiation-induced damage in mammalian cells.
Radiat. Res. **150** (Suppl.): 92-101 (1998).
- Takano, Y.S., Harmon, B.V. & Kerr, J.F.**
Apoptosis induced by mild hyperthermia in human and murine tumour cell lines: a study using electron microscopy and DNA gel electrophoresis.
J. Pathol. **163**: 329-336 (1991).
- Tan, E.M., Schur, P.H., Carr, R.I. & Kunkel, H.G.**
Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus.
J. Clin. Invest. **45**: 1732-1740 (1966).
- Tanuma, S. & Shiokawa, D.**
Multiple forms of nuclear deoxyribonuclease in rat thymocytes.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **203**: 789-797 (1994).
- Tata, J.R.**
Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture.
Dev. Biol. **13**: 77-94 (1966).
- Termaat, R.M., Brinkman, K., van Gompel, F., van den Heuvel, L.P., Veerkamp, J.H., Smeenk, R.J. & Berden, J.H.**
Cross-reactivity of monoclonal anti-DNA antibodies with heparan sulfate is mediated via bound DNA/histone complexes.
J. Autoimmun. **3**: 531-545 (1990).
- Thames, H.D., Ruifrok, A.C., Milas, L., Hunter, N., Mason, K.A., Terry, N.H. & White, R.A.**
Accelerated repopulation during fractionated irradiation of a murine ovarian carcinoma: downregulation of apoptosis as a possible mechanism.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **35**: 951-962 (1996).
- Tolis, C., Peters, G.J., Ferreira, C.G., Pinedo, H.M. & Giaccone, G.**
Cell cycle disturbances and apoptosis induced by topotecan and gemcitabine on human lung cancer cell lines.
Eur. J. Cancer **35**: 796-807 (1999).
- Thomas, L.**
Labor und Diagnose.
TH-Books Verlag, Frankfurt, 5. Auflage (1998).
- Thompson, C.B.**
Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.
Science **267**: 1456-1462 (1995).
- Thornberry, N.A., Bull, H.G., Calaycay, J.R., Chapman, K.T., Howard, A.D., Kostura, M.J., Miller, D.K., Molineaux, S.M., Weidner, J.R., Aunins, J., Elliston, K.O., Ayala, J.M., Casano, F.J., Chin, J., Ding, G.J., Egger, L.A., Gaffney, E.P., Limjuco, G., Paylha, O.C., Raju, S.M., Rolando, A.M., Salley, J.P., Yanin, T.T., Lee, T.D., Shively, J.E., MacCross, J.E., Mumford, R.A., Schmidt, J.A. & Tocci, M.J.**
A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes.
Nature **356**: 768-774 (1992).
- Thornberry, N.A. & Lazebnik, Y.**
Caspases: enemies within.
Science **281**: 1312-1316 (1998).

Thornberry, N.A.

Caspases: a decade of death research.
Cell Death Differ. **6**: 1023-1027 (1999).

Timmer, T., De Vries, E.G. & De Jong, S.

Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application?
J. Pathol. **196**: 125-134 (2002).

Trauth, B.C., Klas, C., Peters, A.M.J., Matzku, S., Möller, P., Falk, W., Debatin, K.M. & Krammer, P.H.

Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis.
Science **245**: 301-304 (1989).

Tsang, R.W., Wong, C.S., Fyles, A.W., Levin, W., Manchul, L.A., Milosevic, M., Chapman, W., Li, Y.Q. & Pintilie, M.

Tumor proliferation and apoptosis in human uterine cervix carcinoma II: correlations with clinical outcome.
Radiother. Oncol. **50**: 93-101 (1999).

Tsuchiya, K., Shirato, H., Nishioka, T., Yamazaki, A., Hashimoto, S., Kagei, K., Oomori, K., Yasuda, M., Shindo, M. & Miyasaka, K.

Pretreatment apoptotic scores do not predict response to radiation therapy in oropharyngeal squamous cell carcinoma.
Oral Oncol. **37**: 159-163 (2001).

Uchiyama, Y.

Apoptosis: the history and trends of its studies.
Arch. Histol. Cytol. **58**: 127-137 (1995).

Ucker, D.S.

Death and dying in the immune system.
Adv. Pharmacol. **41**: 179-218 (1997).

Van Bruggen, M.C., Walgreen, B., Rijke, T.P., Tamboer, W., Kramers, K., Smeenk, R.J., Monestier, M., Fournie, G.J. & Berden, J.H.

Antigen specificity of anti-nuclear antibodies complexed to nucleosomes determines glomerular basement membrane binding in vivo.
Eur. J. Immunol. **27**: 1564-1569 (1997).

Van de Vaart, P.J.M., Belderbos, J., De Jong, D., Sneeuw, K.C.A., Majoor, D., Bartelink, H. & Begg, A.C.

DNA-adduct levels as a predictor of outcome for NSCLC patients receiving daily cisplatin and radiotherapy.
Int. J. Cancer (Pred. Oncol.) **89**: 160-166 (2000).

Van Loo, G., Schotte, P., van Gorp, M., Demol, H., Hoorelbeke, B., Gevaert, K., Rodriguez, I., Ruiz-Carrillo, A., Vandekerckhove, J., Declercq, W., Beyaert, R. & Vandenaabeele, P.

Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation.
Cell Death Differ. **8**: 1136-1142 (2001).

Vasioukhin, V., Anker, P., Maurice, P., Lyautey, J., Lederrey, C. & Stroun, M.

Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia.
Br. J. Haematol. **86**: 774-779 (1994).

Vaux, D.L., Cory, S. & Adams, J.M.

Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells.
Nature **355**: 440-442 (1988).

Vaux, D.L.

Caspases and apoptosis – biology and terminology.
Cell Death Differ. **6**: 493-494 (1999).

Vaux, D.L.

Apoptosis timeline.
Cell Death Differ. **9**: 349-354 (2002).

Vayssiere, J.L., Petit, P.X., Risler, Y. & Mignotte, B.

Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **91**: 11752-11756 (1994).

Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J. & Vaux, D.L.

Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins.
Cell **102**: 43-53 (2000).

- Verhoven, B.**, Schlegel, R.A. & Williamson, P.
Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes.
J. Exp. Med. **182**: 1597-1601 (1995).
- Vermes, I.**, Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutelingsperger, C.
A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V.
J. Immunol. Methods **184**: 39-51 (1995).
- Vesalainen, S.**, Lipponen, P., Talja, M. & Syrjanen, K.
Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma.
Eur. J. Cancer **30A**: 1797-1803 (1994).
- Vogt, C.**
Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*).
Solothurn 1842
- Vousden, K.H.**
P53: death star.
Cell **103**: 691-694 (2000).
- Wagener, C.**
Molekulare Onkologie. Entstehung und Progression maligner Tumoren.
Thieme-Verlag, Stuttgart, 2. Auflage (1999).
- Warner, H.R.**, Hodes, R.J. & Pocinki, K.
What does cell death have to do with aging?
J. Am. Geriatr. Soc. **45**: 1140-1146 (1997).
- Watanabe, I.**, Isozaki, H., Toyoda, M., Ishibashi, T., Hara, H., Kanagawa, T., Niki, M., Gon, G., Tenjo, T. & Tanigawa, N.
Correlations between cell proliferating activity and apoptosis in the colorectal cancer and apoptosis in the mucosa adjacent to colorectal cancer.
Gan To Kagaku Ryoho **24** Suppl 2: 301-306 (1997).
- Watson, R.W.G.**, Redmond, H.P., Wang, J.H., Condron, C. & Bouchier-Hayes D.
Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of *Escherichia coli*.
J. Immunol. **156**: 3986-3992 (1996).
- Webb, S.J.**, Harrison, D.J. & Wyllie, A.H.
Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease.
Adv. Pharmacol. **41**: 1-34 (1997).
- Weller, M.**
Predicting response to cancer chemotherapy: the role of p53.
Cell Tissue Res. **292**: 435-445 (1998).
- West, C.M.**, Davidson, S.E., Elyan, S.A.G., Swindell, R., Roberts, S.A., Orton, C.J., Coyle, C.A., Valentine, H., Wilks, D.P., Hunter, R.D. & Hendry, J.H.
The intrinsic radiosensitivity of normal and tumor cells.
Int. J. Radiat. Biol. **73**: 409-413 (1998).
- Wheeler, J.A.**, Stephens, L.C., Tornos, C., Eifel, P.J., Ang, K.K., Milas, L., Allen, P.K. & Meyn, R.E.
Astro research fellowship: apoptosis as a predictor of tumor response to radiation in stage 1b cervical carcinoma.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **32**: 1487-1493 (1995).
- Widom, J.**
Getting around the nucleosomes.
Science **278**: 1899-1901 (1997).
- Wijsman, J.H.**, Jonker, R.R., Keijzer, R., Van de Velde, C.J.H., Cormelisse, C.J. & Van Dierendonck, J.H.
A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA.
J. Histochem. Cytochem. **41**: 7-12 (1993).
- Williams, R.C.**, Malone, C.C., Meyers, C., Decker, P. & Muller, S.
Detection of nucleosome particles in serum and plasma from patients with systemic lupus erythematosus using monoclonal antibody 4H7.
J. Rheumatol. **28**: 81-94 (2001).

- Woods, D.B. & Vousden, K.H.**
Regulation of p53 function.
Exp. Cell Res. **264**: 56-66 (2001).
- Wyllie, A.H.**
Cell death: The significance of apoptosis.
Int. Rev. Cytol. **68**: 251-306 (1980a).
- Wyllie, A.H.**
Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation.
Nature **284**: 555-556 (1980b).
- Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L. & Dunlop, D.**
Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis.
J. Pathol. **142**: 67-77 (1984).
- Wyllie, A.H.**
Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview.
Cancer Metastasis Rev. **11**: 95-103 (1992).
- Wyllie, A.H.**
Death from inside out: an overview.
Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. **345**: 237-241 (1994).
- Wyllie, A.H., Bellamy, C.O., Bubb, V.J., Clarke, A.R., Corbet, S., Curtis, L., Harrison, D.J., Hooper, M.L., Toft, N., Webb, S. & Bird, C.C.**
Apoptosis and carcinogenesis.
Br. J. Cancer **80** (Suppl. 1): 34-37 (1999).
- Yamada, T., Ohyama, H., Kinjo, Y. & Watanabe, M.**
Evidence for the internucleosomal breakage of chromatin in rat thymocytes irradiated *in vitro*.
Radiat. Res. **85**: 544-553 (1981).
- Yamada, T., Nakamori, S., Ohzato, H., Oshima, S., Aoki, T., Higaki, N., Sugimoto, K., Akagi, K., Fujiwara, Y., Nishisho, I., Sakon, M., Gotoh, M. & Monden, M.**
Detection of K-ras gene mutations in plasma DNA of patients with pancreatic adenocarcinoma: correlation with clinicopathological features.
Clin. Cancer Res. **4**: 1527-1532 (1998).
- Yonehara, S., Ishii, A. & Yonehara, M.**
A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor.
J. Exp. Med. **169**: 1747-1756 (1989).
- Yonish, R.E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A. & Oren, M.**
Wildtype p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6.
Nature **353**: 345-347 (1991).
- Yuan, J. & Yanker, B.A.**
Apoptosis in the nervous system.
Nature **407**: 802-809 (2000).
- Zaghloul, M.S., El Naggat, M., El Deeb, A., Khaled, H. & Mokhtar, N.**
Prognostic implication of apoptosis and angiogenesis in cervical uteri cancer.
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. **48**: 1409-1415 (2000).
- Zanotti, S., Polzar, B., Stephan, H., Doll, U., Niessing, J. & Mannherz, H.G.**
Localization of deoxyribonuclease I gene transcripts and protein in rat tissues and its correlation with apoptotic cell elimination.
Histochemistry **103**: 369-377 (1995).
- Zheng, T.S., Hunot, S., Kuida, K. & Flavell, R.A.**
Caspase knockouts: matters of life and death
Cell Death Differ. **6**: 1043-1053 (1999).
- Zhivotovsky, B.D., Zvonareva, N.B. & Hanson, K.P.**
Characteristics of rat thymus chromatin degradation products after whole body X-irradiation.
Int. J. Radiat. Biol. **39**: 437-440 (1981).

Zhivotovsky, B.D., Wade, D., Nicotera, P. & Orrenius, S.
Role of nucleases in apoptosis.
Int. Arch. Allergy Immunol. **105**: 333-338 (1994).

Zhong, X.Y., Holzgreve, W. & Hahn, S.
Circulatory fetal and maternal DNA in pregnancies at risk and those affected by preeclampsia.
Ann. N. Y. Acad. Sci. **945**: 138-140 (2001).

Zörnig, M., Hueber, A.O., Baum, W. & Evan, G.
Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis.
Biochim. Biophys. Acta **1551**: F1-F37 (2001).

Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. & Wang, X.
Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans*, CED-4 participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3.
Cell **90**: 405-413 (1997)

Zychlinsky, A., Prevost, M.C. & Sansonetti, P.J.
Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages.
Nature **358**: 167-169 (1992).

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Chemie, Universitätsklinikum München -Großhadern- der Ludwig-Maximilians-Universität München (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. D. Seidel) durchgeführt.

Mein Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. D. Seidel für die Überlassung des Themas und die Gewährung der Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Klinische Chemie.
- Frau Dr. med. Petra Stieber für die intensive Betreuung während der Arbeit, die zahl- und lehrreichen Diskussionen sowie ihre fachliche Förderung und Unterstützung.
- Frau Dr. rer. nat. Dorothea Nagel für die hilfreiche Beratung und kenntnisreiche Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten sowie die intensive Diskussion der Ergebnisse.
- Herrn Prof. Dr. med. A. Schalhorn, Oberarzt der Medizinischen Klinik III am Klinikum Großhadern, Herrn PD Dr. med. M. Busch, Oberarzt der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie am Klinikum Großhadern, Herrn Prof. Dr. med. N. Schmeller, Oberarzt der Urologischen Klinik am Klinikum Großhadern, Herrn Prof. Dr. med. H. Fürst, Oberarzt der Chirurgischen Klinik am Klinikum Großhadern, und Herrn PD Dr. med. M. Untch, Oberarzt der Gynäkologischen Klinik am Klinikum Großhadern, für die konstruktive Kooperation, die Überlassung der Patientenproben und die Diskussion der entsprechenden Krankenakten.
- Frau Dr. med. Beatrice Grabein, Oberärztin am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie, für die Überlassung der Bakterienstämme für die Untersuchung von *in vitro* Störeinflüssen.
- Herrn Dr. H. Bodenmüller, Herrn Dr. P. Bialk, Herrn Dr. D. Banauch und Herrn Dr. D. Fertig von der Firma Roche Diagnostics Mannheim / Penzberg für die Bereitstellung der Reagenzien und die fachliche Beratung bei der Testmodifizierung.
- Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Onkologische Labor-diagnostik“ sowie des Bereichs Protein- und Immunchemie für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung beim Erlernen der technischen Grundlagen.
- Meiner Familie und meinen Freunden für ihre Geduld und ihre verständnisvolle Unterstützung.

Lebenslauf:

Stefan Holdenrieder

geboren: am 12.06.1970 in Jettingen-Scheppach

Schulbildung:

1976-80 Grundschule in Scheppach

1980-89 St. Thomas-Gymnasium in Wettenhausen

Berufliche Ausbildung:

4/91-4/99 Studium der Humanmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

2/98-1/99 Praktisches Jahr
an der Neurologischen Klinik, Klinikum München -Großhadern-
an der Medizinischen Klinik III, Klinikum München -Großhadern-
am Royal College of Surgeons of Ireland in Dublin (Irland)

13.04.99 Ärztliche Prüfung

9/95-9/00 Praktische Tätigkeit im Rahmen der Dissertationsarbeit am
Institut für Klinische Chemie, Klinikum München -Großhadern-

10/00-3/01 Arzt im Praktikum am Institut für Klinische Chemie,
Klinikum München -Großhadern-

02.04.01 Approbation

seit 4/01 Assistenzarzt am Institut für Klinische Chemie,
Klinikum München -Großhadern-