

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin  
der Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor:  
Prof. Dr. med. Rudolf Arnold

Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Immunologie  
Direktor: Prof. Dr. med A. Neubauer

# **Wirkungen des Retinoids Fenretinid auf Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung  
des Doktorgrades der gesamten Medizin

vorgelegt dem  
Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg

von  
Christine Jung  
aus Limburg

Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

am: 21.11.2002

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Bernhard Maisch

Referent: Priv.-Doz. Dr. Gabriele Jaques

Correferent: Prof. Dr. med. Roland Moll

# Inhalt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das kleinzellige Bronchialkarzinom</b>	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie, Pathologie, Therapie	1
1.1.2	Histologische Einteilung und molekulare Grundlagen	3
<b>1.2</b>	<b>Retinoide in der Chemoprävention</b>	<b>5</b>
1.2.1	Der Begriff Chemoprävention	5
1.2.2	Retinoide	6
1.2.2.1	Metabolismus und Retinoidrezeptoren	6
1.2.2.2	Retinoidwirkungen	9
1.2.2.3	Regulation des IGF-Systems durch Retinoide	10
1.2.2.4	Retinoide in der Chemoprävention des Bronchialkarzinoms	13
1.2.3	Fenretinid, N-(4-hydroxyphenyl)retinamid	14
1.2.3.1	Pharmakokinetik und Pharmakodynamik	15
1.2.3.2	Wirkungen	16
1.2.4	Klinische Studien mit Retinoiden	20
<b>1.3</b>	<b>Fragestellungen der Arbeit</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>23</b>
2.1.1	Geräte	23
2.1.2	Labormaterialien	23
2.1.3	Chemikalien, Reagenzien	24
2.1.4	Nukleinsäuren, Nukleotide, Primer	24
2.1.5	Pufferlösungen für Western-Ligand-Blot und Elektrophorese	25
2.1.6	Apoptose-Kits	25
2.1.7	Zellkulturmedien	25
2.1.8	Zelllinien	26
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>27</b>
2.2.1	Zellkultur	27
2.2.2	Wachstumsversuche	27
2.2.3	Zellzahlbestimmung	28
2.2.3.1	Neubauer-Zählkammer	28
2.2.3.2	Coulter Counter	28
2.2.3.3	MTT-Assay	29

2.2.4	Wachstumskinetik, Reversibilitätsversuche	29
2.2.5	Apoptosetests	30
2.2.5.1	TUNEL-Assay	30
2.2.5.2	AnnexinV-Assay	30
2.2.6	Western Ligand-Blot	31
2.2.6.1	Präzipitation der Proteine mit Trichloressigsäure	31
2.2.6.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.2.6.3	Blotten der Proteine	32
2.2.6.4	Western-Ligand Blot	33
2.2.7	Reverse Transkriptase-PCR	33
2.2.7.2	RNA-Extraktion aus Zellen	33
2.2.7.2	cDNA-Synthese (Reverse Transkription)	34
2.2.7.3	PCR	35
2.2.7.4	Elektrophoretische Trennung der PCR-Produkte	35
2.2.8	Auswertung der Daten	36
2.2.8.1	Wachstumsversuche	36
2.2.8.2	Synergistische Wirkung der beiden Retinoide	36
2.2.8.3	Berechnung der Zellzahlverdopplungszeit pdt	37
2.2.8.4	Densitometrische Bestimmung der Bandenintensität	37
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>38</b>
<b>3.1</b>	<b>Vergleich der Zellzahlbestimmungsmethoden</b>	<b>38</b>
3.1.1	Coulter Counter versus Neubauer-Zählkammer	38
3.1.2	Coulter Counter versus MTT-Assay	39
<b>3.2</b>	<b>Proliferation von SCLC-Zelllinien unter Retinoiden</b>	<b>41</b>
3.2.1	Einfluß von Fenretinid auf das Zellwachstum	41
3.2.2	Vergleich der Wirkung von Fenretinid mit all-trans-Retinsäure	45
3.2.3	Wachstumstimulierende Wirkung von Fenretinid	47
3.2.4	Abhängigkeit der Hemmung von der Zellzahl	48
<b>3.3</b>	<b>Wirkung der Retinoide in serumfreien Medium</b>	<b>48</b>
3.3.1	Wachstum der serumfreien Zelllinien NCI-H82-SIT und SCLC-24H-SIT unter Fenretinid	48
3.3.2	Wachstum der Zelllinie NCI-H82 in serumfreien Medium	49
3.3.3	Abhängigkeit der Retinoidwirkung von Serumalbumin	50
3.3.3.1	Fenretinidwirkung	50
3.3.3.2	All-trans-Retinsäure-Wirkung	51
3.3.4	Einfluß von dialysierten oder gestripten Medien auf das Zellwachstum	52
<b>3.4</b>	<b>Wirkung von Fenretinid in Kombination mit all-trans-Retinsäure</b>	<b>52</b>

<b>3.5</b>	<b>Reversibilität der Wirkung von Fenretinid und all-trans-Retinsäure</b>	<b>55</b>
<b>3.6</b>	<b>Effekte durch konstante Fenretinidexposition</b>	<b>57</b>
3.6.1	Kultivierung resistenter Zelllinien unter Fenretinidzusatz	57
3.6.2	Morphologische Veränderungen unter Fenretinid	57
3.6.3	Einfluß von all-trans-Retinsäure oder retinoidfreiem Medium auf NCI-H82-HPR	59
<b>3.7</b>	<b>Nachweis von Apoptose</b>	<b>60</b>
3.7.1	TUNEL-Test	60
3.7.2	AnnexinV-Assay	61
<b>3.8</b>	<b>Expression von IGFBP-2</b>	<b>64</b>
3.8.1	Sekretion von IGFBP-2	64
3.8.2	mRNA-Expression von IGFBP-2	66
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>68</b>
<b>4.1</b>	<b>Vergleich der Zellzahlbestimmungsmethoden</b>	<b>68</b>
<b>4.2</b>	<b>Wirkung der Retinoide in serumhaltigem Medium</b>	<b>69</b>
4.2.1	Hemmung des Zellwachstums durch Fenretinid	69
4.2.2	Vergleich der Hemmung durch Fenretinid mit all-trans-Retinsäure	71
4.2.3	Wachstumstimulation durch Fenretinid	73
<b>4.3</b>	<b>Wirkung der Retinoide in serumfreiem Medium</b>	<b>73</b>
<b>4.4</b>	<b>Synergistische Wirkung von Fenretinid und all-trans-Retinsäure</b>	<b>76</b>
<b>4.5</b>	<b>Reversibilität der Wirkung von Fenretinid und all-trans-Retinsäure</b>	<b>78</b>
<b>4.6</b>	<b>Effekte durch kontinuierliche Fenretinidexposition</b>	<b>79</b>
4.6.1	Kultivierung resistenter Zelllinien unter Fenretinid	79
4.6.2	Morphologische Veränderungen unter Fenretinid	80
4.6.3	Einfluß von all-trans-Retinsäure oder retinoidfreiem Medium auf eine resistente Zelllinie	81
<b>4.7</b>	<b>Induktion von Apoptose durch Fenretinid</b>	<b>82</b>
<b>4.8</b>	<b>Expression von IGFBP-2</b>	<b>86</b>
<b>4.9</b>	<b>Zusammenfassung der Fenretinid-Wirkungen</b>	<b>89</b>
<b>4.10</b>	<b>Ausblick</b>	<b>90</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>95</b>

## ANHANG

# 1 Einleitung

## 1.1 Das kleinzellige Bronchialkarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie, Pathologie, Therapie

Bronchialkarzinome zählen in den westlichen Industrienationen zu den häufigsten Krebsarten. 1997 erkrankten in Deutschland schätzungsweise 28.200 Männer und 8.900 Frauen an malignen Lungentumoren (DATEN DES GESUNDHEITSWESENS 1999). In den USA traten 2001 bei Männer geschätzt 90.700, bei Frauen 78.800 Neuerkrankungen auf (AMERICAN CANCER SOCIETY, CANCER FACTS AND FIGURES 2001). Die Inzidenz lag damit an zweiter Stelle hinter dem Prostatakarzinom bzw. dem Mammakarzinom. Bronchialkarzinome weisen jedoch die höchste Tumormortalität mit 70 pro 100.000 der Männer und 34 pro 100.000 der Frauen in den USA auf (WINGO 1999). In Deutschland lag die altersstandardisierte Mortalitätsrate 1999 bei 41,6 (Männer) und 10,2 (Frauen) pro 100.000 (DKFZ HEIDELBERG, KREBSATLAS). Während bei Männern Inzidenz und Mortalität in den letzten Jahren gesunken sind, ist die Tendenz unter Frauen weiterhin steigend und dürfte in Kürze die Brustkrebsinzidenz überholt haben (WINGO 1999, DKFZ HEIDELBERG, KREBSATLAS). Die gesamte 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei ca. 15% (BEPLER 1999, LOTAN 1997b).

Der wesentliche Risikofaktor für die Entwicklung eines Bronchialkarzinoms ist im Rauchen zu sehen. So erhöht sich ab 20 „packyears“ das relative Risiko für Männer um den Faktor 17, für Frauen um das 10fache. Bereits durch Passivrauchen verdoppelt sich ungefähr das Lungentumorrisiko (BEPLER 1999), und noch nach 10 Jahren besteht für ehemalige Raucher ein deutlich erhöhtes Erkrankungsrisiko (LOTAN 1997b). Die Hauptcarcinogene im Tabakrauch gehören zur Gruppe der Nitrosamine, der aromatischen Amine sowie der polyzyklischen Kohlenwasserstoffe, hier insbesondere Benzo-a-pyren (FONG 1999, MINNA 1997). Weitere exogene Risikofaktoren stellen Asbest, Kohlenstaub, Radon, Nickel und Chrom dar (BEPLER 1999). Neben diesen exogenen existieren auch endogene ätiologische Faktoren. Dies sind vor allem Polymorphismen des Cytochroms P450 und der Glutathion-S-Transferase, die eine Giftung im Rahmen des Katabolismus bewirken (BEPLER 1999, FONG 1999).

Bronchialkarzinome werden nach histologischen und pathologischen Gesichtspunkten in verschiedene Gruppen unterteilt. Dem kleinzelligen Bronchialkarzinom (SCLC), welches 20-25% der Lungentumoren ausmacht, steht die heterogene Gruppe der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome (NSCLC) gegenüber. Diese umfaßt als wichtigste das Plattenepithelkarzinom (40%), das Adenokarzinom (15-20%), das großzellig-anaplastische Karzinom (5-10%) sowie weitere seltener Tumorentitäten (WOLF 1998).

Das SCLC ist ähnlich wie das Plattenepithelkarzinom vor allem zentral lokalisiert (WOLF 1998), beide Typen sind fast ausschließlich mit dem Rauchen assoziiert (BEPLER 1999, JOHNSON 1999). Paraneoplastische Syndrome finden sich häufiger beim SCLC als beim NSCLC (WOLF 1998). Kleinzellige Bronchialkarzinome sind klinisch charakterisiert durch ein rasches aggressives Wachstum mit frühzeitiger Metastasierung. Unbehandelt liegt die mediane Überlebenszeit nach Diagnosestellung bei ungefähr drei Monaten und erhöht sich unter Behandlung auf 9-12 Monate (BÜLZEBRUCK 1998, WOLF 1998). Zum Vergleich beträgt die mediane Überlebenszeit des NSCLC 15-18 Monate (BEPLER 1999). Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit liegt beim SCLC bei lediglich 3-8% und ist damit die niedrigste unter den Lungentumoren (BÜLZEBRUCK 1998). Bereits 40% der Patienten weisen bei Diagnosestellung Fernmetastasen auf (BÜLZEBRUCK 1998), 90% Metastasen in medianen Lymphknoten (WOLF 1998). Die Prognose des SCLC ist sowohl vom Stadium als auch vom Ort der Metastasen abhängig (BÜLZEBRUCK 1998). Frauen zeigen dabei bis zum 60. Lebensjahr einen günstigeren Verlauf (WOLF 1998).

Das rasche Fortschreiten der Erkrankung und die schlechten Therapiemöglichkeiten finden ihren Ausdruck in einer vereinfachten Tumor-Klassifikation. Zwar setzt sich inzwischen als staging-Verfahren zunehmend das TNM-System durch (BÜLZEBRUCK 1998), gebräuchlich ist aber immer noch die vereinfachte Klassifizierung der VALG (Veterans Administration Lung Cancer Study Group). „Limited disease“ bezeichnet darin die Beschränkung des Tumors auf einen Hemithorax mit oder ohne ipsilateralen Lymphknotenbefall, alle anderen Konstellationen fallen in das Stadium „extensive disease“ (BÜLZEBRUCK 1998). Die Marburger Klassifikation erweitert diese Stadieneinteilung unter klinischen Aspekten um die Gruppen „very limited disease“ sowie „extensive disease I“, „extensive disease IIa“ und „extensive disease IIb“ (WOLF 1998).

Kleinzellige Bronchialkarzinome sind im Gegensatz zum NSCLC zunächst chemo- und strahlensensibel. Sie werden standardmäßig mit einer kombinierten Chemotherapie behandelt, im limited stage zusätzlich noch bestrahlt (JOHNSON 1999). Im Laufe der

Behandlung entwickelt sich aber meist eine Resistenz, die vermutlich auf Übergänge der SCLC-Zellen zu NSCLC-Formen zurückzuführen ist (GAZDAR 1985, KALEMKERIAN 1994). In Biopsiematerial aus Primärtumoren finden sich häufig nicht nur reine SCLC-Zellen, sondern auch Mischtumoren, die Anteile von Plattenepithelkarzinom- oder Adenokarzinomzellen enthalten (DOYLE 1989).

Die sehr schlechte Prognose des SCLC und die beschränkten Therapieerfolge machen neue Behandlungsstrategien nötig. Neben dem Einsatz neuer Zytostatika (JOHNSON 1999) gewinnt dabei die Prävention zunehmend an Gewicht. Wichtigster Ansatz ist hierbei der Rückgang des Rauchens, der im wesentlichen die Inzidenz der malignen Lungentumoren beeinflusst, wie das Beispiel USA zeigt (WINGO 1999). Aber auch Chemoprävention könnte das Auftreten neuer Bronchialkarzinome verringern (s. dazu Kapitel 1.2).

### *1.1.2 Histologische Einteilung und molekulare Grundlagen*

Die Gewinnung von permanenten Zelllinien aus primärem Tumorbiopsiematerial stellte die entscheidende Voraussetzung für die Erforschung des Bronchialkarzinoms dar. Eine Überprüfung anhand von NSCLC-Zelllinien ergab auch nach vielen Passagen der Kulturhaltung eine gute Übereinstimmung der Eigenschaften mit dem Ausgangsmaterial (WISTUBA 1999). Das folgende Kapitel soll einen kurzen Überblick über die wichtigsten Charakteristika der SCLC-Zelllinien geben.

Das kleinzellige Bronchialkarzinom zählt zu den neuroendokrinen Lungentumoren, die außer dem SCLC typische und atypische Karzinoide (TC, AC) sowie das großzellige neuroendokrine Karzinom (LCNEC) umfassen (ONUKE 1999). Als Zellen mit neuroendokrinen Eigenschaften werden sie dem APUD-Zellsystem zugerechnet (APUD = Amine Precursor Uptake and Decarboxylation). Gekennzeichnet sind die Zellen des SCLC durch die Expression folgender Enzyme: L-DOPA-Decarboxylase (DDC), Bombesin-ähnliche Immunoreaktivität (BLI), Neuron-spezifische Enolase (NSE) und BB-Isoenzym der Kreatinkinase (CK-BB) (CARNEY 1985, GAZDAR 1985).

Die WHO unterteilte 1982 die SCLC-Zellen morphologisch in „oat-cells“ und „intermediate cells“, wobei erstere vermutlich eine degenerierte Form der intermediären Zellen darstellen. Darüber hinaus finden sich in einigen Präparaten zwischen den intermediären Zellen solche, die mit ihren prominenten Nukleoli morphologisch an



Großzeller erinnern (CARNEY 1985, GAZDAR 1985). Eine klinische Relevanz dieser Unterscheidung konnte jedoch nicht beobachtet werden (BEPLER 1989, GAZDAR 1985). Von größerer Bedeutung scheint dagegen die Unterteilung der SCLC-Zelllinien in variante und klassische Subtypen zu sein. In varianten Formen ist weder L-Dopa-Decarboxylase noch Bombesin-ähnliche Immunoreaktivität nachweisbar, die Expression von NSE und CK-BB bleibt erhalten. Morphologisch entsprechen sie in der Regel den erwähnten Großzellern. Typisch ist ihr schnelles Wachstum in lockeren Zellaggregaten und eine hohe Koloniebildungsrate. Im Gegensatz zur klassischen Form zeigen sie eine starke Überexpression oder Amplifikation von Genen der myc-Familie (s.u.) (CARNEY 1985, GAZDAR 1985). Bepler et al. (1989) ergänzten die beiden Subtypen noch um einen dritten, den sog. ‚transienten‘ oder Übergangstyp. Dieser weist trotz der c-myc Überexpression noch neuroendokrine Differenzierung bei mittlerer Wachstumsgeschwindigkeit auf. Diese Einteilung wird auch in der vorliegenden Arbeit gewählt. Zelllinien, die c-myc überexprimieren, stammen in der Regel von Patienten, die zuvor mit einer Chemotherapie behandelt wurden (FONG 1999). Sie sind meist radioresistent (LEVIN 1994) und besitzen eine schlechtere klinische Prognose (BEPLER 1999, CARNEY 1985, GAZDAR 1985, JOHNSON 1987).

Bronchialkarzinome weisen auf molekularer Ebene eine Reihe typischer chromosomaler und genetischer Veränderungen auf, hiervon betroffen sind Proto-Onkogene ebenso wie Tumorsuppressorgene, DNA-Reparatur-Gene und Wachstumsfaktoren mit ihren Rezeptoren.

Wichtige autokrine Wachstumsfaktoren des SCLC sind das Gastrin-releasing-Peptide (GRP) (= Bombesin) und die Insulin-like-Growth-Factors (IGFs) (FONG 1999, HAVEMANN 1990). Während das für eine Tyrosinkinase kodierende KIT-Proto-Onkogen vorwiegend von SCLC exprimiert wird, findet man die Wachstumsfaktor-Rezeptoren erbB1 und erbB2 bei NSCLC vor (FONG 1999, MINNA 1997).

Eine Amplifikation und Überexpression der myc-Familie c-myc, N-myc und L-myc, die für Transkriptionsfaktoren kodieren und eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus und der Proliferation spielen, ist kennzeichnend für den varianten Subtyp des SCLC. Vereinzelt tritt das c-myc-Gen auch im klassischen Subtyp oder im NSCLC auf. Dagegen ist das Proto-Onkogen K-ras fast ausschließlich beim NSCLC zu finden (FONG 1999, MINNA 1997).

Fast alle SCLC-Zelllinien (75-100%) weisen schon im frühen Stadium eine Punktmutation des Tumorsuppressor-Gens p53 oder eine abnormale Expression (40-70%) auf.

Gerade diese Veränderung ist eng mit dem Rauchen assoziiert. Ebenso häufig ist im SCLC die Inaktivierung eines weiteren Tumorsuppressor-Gens, des Retinoblastom-Gens, während diese Veränderung nur in 15-30% der NSCLC erscheint. Der Verlust des kurzen Arms von Chromosom 3, der in nahezu allen Bronchialkarzinomen auftritt, wird ebenfalls mit dem Verlust eines Tumorsuppressor-Gens gleichgesetzt (FONG 1999, MINNA 1997).

Das Produkt des anti-apoptotischen Onkogens bcl-2 ist interessanterweise in den chemosensiblen SCLC-Zellen fast immer erhöht und korreliert mit dem Grad der neuroendokrinen Expression, während NSCLC-Zellen bcl-2 nur in geringerem Ausmaß exprimieren. Eine apoptotische Wirkung besitzen die vor kurzem auf der Zellmembran von Bronchialkarzinom-Zelllinien entdeckten Opioid-Rezeptoren. Die ebenfalls vorhandenen Nikotin-Rezeptoren scheinen deren Wirkung zu antagonisieren und könnten auf diese Weise einen Teil der Nikotinwirkung aus Tabakrauch vermitteln (FONG 1999).

## 1.2 Retinoide in der Chemoprävention

### 1.2.1 Der Begriff Chemoprävention

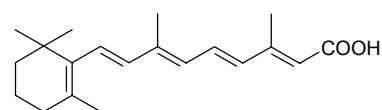
Sporn führte in den siebziger Jahren die Bezeichnung Chemoprävention in Zusammenhang mit den Retinoiden ein (SPORN 1976). Chemoprävention soll das Krebsrisiko für gefährdete Personen durch Einnahme von nicht-toxischen Substanzen, welche Carcinogenese supprimieren oder revidieren können, senken. Dies kann auf Ebene der Tumor-Initiation, -Promotion oder -Progression erfolgen (NAIK 1995). Je nach Zielgruppe lassen sich dabei drei Formen von Chemoprävention unterscheiden. Primäre Chemoprävention soll gesunde Personen mit hohem Erkrankungsrisiko, wie z.B. Raucher, erfassen. Sekundäre Chemoprävention erstreckt sich auf Patienten mit Präkanzerosen, wie beispielsweise oralen Leukoplakien oder aktinischer Keratinose. Tertiäre Chemoprävention schließlich findet ihre Anwendung bei Patienten mit hohem Risiko für Zweitumoren (DEPALO 1995).

Insbesondere Tumoren der oberen Atem- und Speisewege bieten sich aus mehreren Gründen für eine chemopräventive Behandlungsstrategie an. Die Carcinogenese im oberen Luft- und Speisetrakt verläuft als mehrstufiger Prozeß, in dem es zu einer Reihung von Genveränderungen kommt, die letztlich in einem malignen Tumor

enden. Diese Veränderungen treten nach dem Konzept der ‚field cancerization‘, welches Anfang der 50er Jahre erstmals von Slaughter (1953) entwickelt wurde, an verschiedenen Stellen des Epithels auf und können sich in unterschiedlichen Stadien der Dysplasie befinden. Hervorgerufen werden die Epithelschäden meist durch exogene Noxen, die über lange Jahre einwirken (BENNER 1994, LOTAN 1997a). Das Auftreten von ‚field cancerization‘ und die generelle Schadstoffexposition des Epithels erklärt die hohe Rate an Zweitumoren, die Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC) und Bronchialkarzinome aufweisen (BENNER 1995, DEPALO 1995, HEYNE 1992, LOTAN 1997b, SAGMAN 1992). Für Patienten mit HNSCC liegt das Risiko, einen sekundären Primärtumor zu entwickeln, bei 30% (BENNER 1995), für Patienten mit Bronchialkarzinomen noch bei ca. 4% (LOTAN 1997b). Eine systemische Therapie, wie sie die Chemoprävention darstellt, erscheint daher gerade für Tumoren der Lunge und des Kopf-Hals-Bereiches vielversprechend.

### 1.2.2 Retinoide

Unter Retinoiden versteht man Abkömmlinge des Vitamin A oder Retinols. Dieser Begriff umfaßt auch synthetische Substanzen, die an die Retinsäure-Rezeptoren binden und spezifische Reaktionen hervorrufen können (SPORN 1991).



All-trans-Retinsäure

Retinoide spielen eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, der Proliferation und Differenzierung von Epithelzellen und der Inhibition von Carcinogenese (LOTAN 1997a). Dies erklärt ihr Hauptanwendungsgebiet in der Onkologie und der Dermatologie, wo Retinoide wegen ihrer antikeratinisierenden Wirkung und der Reduktion von Sebumproduktion erfolgreich eingesetzt werden (PFAHL 1994).

#### 1.2.2.1 Metabolismus und Retinoidrezeptoren

Die wichtigsten natürlichen Retinoide sind neben Retinol die all-trans-Retinsäure (Tretinoin, ATRA) und deren Isomere 9-cis-Retinsäure, 11-cis-Retinsäure und 13-cis-Retinsäure (Isotretinoin) sowie das Retinaldehyd 11-cis-Retinal, welches eine wichtige Funktion für das Sehvermögen besitzt. Die aus der Nahrung aufgenommenen Reti-

noide oder  $\beta$ -Carotin als dessen Vorstufe werden in der Leber als Retinyl-Ester gespeichert. Der Transport im Serum erfolgt größtenteils als Retinol, welches zu 95% an ein Retinol-Bindungsprotein (RBP) bindet (DEPALO 1995, NAIK 1995). Die Aufnahme in die Zellen wird außer per Diffusion möglicherweise zusätzlich über RBP-Rezeptoren gesteuert (NAIK 1995). Im Zytoplasma erfolgt die Bindung an zelluläre Retinol-Bindungsproteine (CRBP) und die Oxidation zur Retinsäure. All-trans-Retinsäure stellt vermutlich die aktive Wirkform des Vitamin A in den meisten Zellen dar und kann sowohl über Isomerasen als auch nicht-enzymatisch zu 13-cis-Retinsäure, 11-cis-Retinsäure oder 9-cis-Retinsäure umgewandelt werden (MAYNE 1997, NAPOLI 1996, WARRELL 1994). Die Retinsäuren binden an zelluläre Retinsäure-Bindungsproteine, CRABP-I und CRABP-II, welche neben dem zellulären Transport die Konzentration der freien Retinsäure regulieren und deren Abbau fördern (BOYLAN 1995, NAIK 1995, NAPOLI 1996, WARRELL 1994). Die Funktion der CRABP ist derzeit noch nicht vollständig geklärt: nicht alle Zellen exprimieren diese Bindungsproteine, so beispielsweise auch die kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien, und ihre Anwesenheit ist für eine Wirkungsvermittlung von ATRA nicht nötig (DOYLE 1989, NAPOLI 1996). Der Abbau von ATRA erfolgt im wesentlichen über das Cytochrom-P450-System, dabei ist die 4-oxo-all-trans-Retinsäure der Hauptmetabolit (ADAMSON 1994).

Die Wirkung der Retinsäuren wird vor allem über Retinsäure-Rezeptoren vermittelt, welche im Kern lokalisiert sind und als Ligand-Rezeptor-Komplex Retinsäure-Rezeptor-Response-Elements (RARE) transaktivieren. Diese RARE steuern wiederum als Transkriptionsfaktoren die Aktivierung von Zielgenen. Die Retinsäure-Rezeptoren zählen ebenso wie die Vitamin-D3-Rezeptoren und Thyroidhormon-Rezeptoren zur Superfamilie der Steroidhormon-Rezeptoren. Es existieren zwei Klassen, die RA-Rezeptoren (RAR) und die RX-Rezeptoren (RXR), welche jeweils drei Subtypen  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  bilden. Innerhalb dieser Subtypen lassen sich noch mehrere Isoformen unterscheiden. Die RAR binden als Heterodimer mit RXR ihre Liganden ATRA oder 9-cis-Retinsäure. Dagegen können die RXR auch Homodimere oder Heterodimere mit Vitamin-D3-Rezeptoren und Thyroidhormon-Rezeptoren bilden. Nur RXR sind in der Lage, 9-cis-Retinsäure zu binden (CHAMBON 1996, LOTAN 1997a, PFAHL 1994). Weitere Faktoren, die die Bindung der Liganden und deren Wirkung beeinflussen, sind Interaktionen mit Co-Aktivatoren und die Existenz von ‚orphan receptors‘, Retinsäure-Rezeptoren ohne bisher bekannte Liganden, die die Wirkung von ATRA modulieren und für Resistenzen verantwortlich sein können. Sie wurden auch in Lungenkarzinom-

zellen nachgewiesen, wo über eine gezielte Expression verschiedener ‚orphan receptors‘ die Empfindlichkeit der Zelllinien gegenüber ATRA verändert wurde (WU 1997). Die Vielfalt der möglichen Rezeptorwirkungen wird noch durch eine gewebespezifische und zeitabhängige Expression erhöht (PFAHL 1994, SPORN 1991). Zudem treten die Rezeptoren untereinander in Wechselwirkung (MELINO 1997, LA VISTA-PICARD 1996) und können teilweise ihre eigene Expression über ein RARE induzieren, wie für RAR $\beta$  bekannt ist (DETHE 1990, LOTAN 1997a).

All-trans-Retinsäure kann über Interaktion mit AP-1, einem allgemeinen Transkriptionsfaktor, eine Transrepression hervorrufen. Dabei spielt vermutlich neben einer Bindung von RAR $\alpha$  an der AP-1 binding site (CHAMBON 1996, SPORN 1991) auch eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit AP-1 (PFAHL 1994, SPORN 1991) eine Rolle. Zusätzlich kann ATRA die Transkription von c-fos und/oder c-jun, welche AP-1 bilden, hemmen (BUSAM 1992, JAFFEY 1992, LI 1994) und dadurch beispielsweise den Wachstumsfaktor TGF $\beta$  hochregulieren, der in vielen Zellen eine hemmende Wirkung besitzt (SALBERT 1993, SPORN 1991). Einige Autoren sehen in der anti-AP-1 Wirkung einen Schlüssel zur antitumorigenen Wirkung der Retinoide (CHAMBON 1996, PFAHL 1994), weil über AP-1, welches die Signale von Peptidhormonen, Onkogenen und Tumorsuppressoren vermittelt, eine Verbindung zur Zellmembran hergestellt wird.

Die Regulation der Rezeptorinteraktionen sowie der Bindungsaffinität der Liganden und der RARE verlaufen ausgesprochen komplex. Daher liegen zu den einzelnen Rezeptoren wenige Ergebnisse vor, die nicht nur innerhalb der jeweiligen Zellart Geltung haben, sondern auch auf andere Zellsysteme übertragbar sind. Eine Ausnahme stellt möglicherweise die humane Isoform des RAR $\beta$ -Rezeptors, der RAR $\beta$ 2-Rezeptor, dar, welcher insbesondere für die Tumorentwicklung in der Lunge interessant ist. Während gesundes Lungengewebe meist RAR $\beta$ 2 exprimiert, ist die Expression in Bronchialkarzinomen deutlich reduziert oder fehlt völlig (GEBERT 1991, GERADTS 1993, HOULE 1993, XU 1997). Dies lässt sich schon im Stadium von Dysplasien beobachten (HOULE 1993, LOTAN 1997a) und gilt in gleicher Weise für andere Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (XU 1994), für orale Leukoplakien (LOTAN 1997a) oder Prostatakarzinome (LOTAN 2000). Bronchialkarzinome weisen in der Regel einen Verlust des kurzen Arms von Chromosom 3 auf; dort ist das Gen für den RAR $\beta$ 2-Rezeptor lokalisiert (HOULE 1993). Die Mutation des RAR $\beta$ 2-Rezeptors erhöht das Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken: so entwickelten transgene Mäuse ohne RAR $\beta$ 2 vermehrt Bronchialkarzinome (BERARD 1996). In einem Transfektionsassay

verminderte die RAR $\beta$ 2-Expression die Tumorinzidenz und Tumorzunahme und erhöhte die Latenzzeit *in vivo* (HOULE 1993). Durch ATRA oder 13-cis-Retinsäure kann RAR $\beta$ 2 in Tracheobronchial-Epithel oder Bronchialkarzinom-Zelllinien hochreguliert werden (GEBERT 1991, LIU 1996, LOTAN 1997a, ZHANG 1994), ein Mechanismus, über den ein Teil der wachstumshemmenden Wirkung der all-trans-Retinsäure vermittelt wird (FRANGIONI 1994, LIU 1996, WEBER 1999). Dies setzt jedoch funktionelle RAR $\beta$ 2-Rezeptoren voraus, so daß sich nur ein kleiner Teil der Bronchialkarzinom-Zelllinien durch ATRA inhibieren läßt (GERADTS 1993, HERRLINGER 1994).

### 1.2.2.2 Retinoidwirkungen

Retinoide üben auf Epithelzellen eine Vielzahl von Wirkungen aus. So ist all-trans-Retinsäure essentiell für eine normale **fetale Entwicklung**. Bei starkem kongenitalen Vitamin A-Mangel treten Fehlbildungen des Auges, der Lunge, des kardiovaskulären Systems und des Urogenital-Traktes auf (MORRIS-KAY 1996). In der fetalen Lunge erhöht ATRA die Anzahl der proximalen Bronchien (NABEYRAT 1998). Vor der Geburt führen Retinyl-Ester zur Lungenreifung, welche vermutlich durch ATRA induziert wird (CHYTIL 1996).

Eine weitere wichtige Rolle spielen Retinoide bei der **Differenzierung** von Epithelzellen (CHAMBON 1996, LOTAN 1997a, PFAHL 1994). Diese Differenzierungs-Induktion scheint durch Retinsäure-Rezeptoren vermittelt zu sein. Die beteiligten Rezeptoren variieren jedoch in Abhängigkeit der untersuchten Zellart (BOYLAN 1995, CLIFFORD 1999, MELINO 1997, PFAHL 1994). Auch bei hämatopoetischen Stammzellen oder Tumorzellen sind Retinoide bei der Differenzierung von Bedeutung (MEHTA 1996, DELIA 1993, DIPIETRANTONIO 1996).

Eine große Anzahl von Zelltypen werden durch ATRA in ihrem **Wachstum gehemmt**, beispielsweise myeloische Leukämiezellen (DELIA 1993, DIPIETRANTONIO 1996, MEHTA 1996), embryonale Karzinomzellen (BOYLAN 1995), Zervixkarzinom-Zelllinien (ORIDATE 1995), HNSCC (ZOU 1994), Neuroblastom-Zelllinien (PONZONI 1995, REYNOLDS 1997) oder Mammakarzinom-Zelllinien (KAZMI 1996). Die dazu benötigten Konzentrationen liegen jedoch meist im Bereich der toxischen Konzentration von ungefähr 1  $\mu$ M (DOYLE 1989). Kleinzellige Bronchialkarzinom-Zelllinien oder NSCLC dagegen sprechen kaum auf ATRA an (GERADTS 1993, ZOU 1998b). Außer über Differenzierung scheint in eini-

gen Zelllinien die zytostatische Wirkung von ATRA über TGF $\beta$  vermittelt zu werden. Dabei erfolgt die Induktion von TGF $\beta$  über eine Interaktion mit AP-1 (SPORN 1991).

Vereinzelt wurde eine Auslösung von **Apoptose** durch ATRA in Zelllinien beobachtet (CHIANTORE 1999, CLIFFORD 1999, FESUS 1996, MELINO 1997, ORIDATE 1996, PONZONI 1995, POOT 1999, ZHANG 1995). Sie wird in der Regel von einer Induktion der Gewebe-Transglutaminase (tTGA) begleitet (CHIANTORE 1999, FESUS 1996, MELINO 1997, ZHANG 1995), einem Enzym, welches im Rahmen des Apoptoseprozesses auftreten kann und ein cross-linking von Proteinen bewirkt. Apoptose und Induktion der tTGA sind im Trachealepithel an den RAR $\alpha$ -Rezeptor geknüpft (FESUS 1996, ZHANG 1995), in Neuroblastom-Zelllinien müssen RAR $\alpha$  und RAR $\gamma$  zusammen aktiviert werden (MELINO 1997).

Schließlich können Retinoide die **Angiogenese** hemmen (LOTAN 1996, OIKAWA 1989) und modulierend auf das **Immunsystem** wirken (FORMELLI 1996). Über die Regulation von Wachstumsfaktoren können sie auch **Zellwachstum stimulieren**. So reagieren kleinzellige Bronchialkarzinom-Zelllinien bei intaktem RA-Rezeptorweg auf ATRA mit einem Anstieg von GRP und dadurch mit Tumorwachstum (RAVI 1998).

### 1.2.2.3 Regulation des IGF-Systems durch Retinoide

Insulin-like Growth Factors, IGF-I und IGF-II, gehören zu den wichtigsten Wachstumsfaktoren. Sie wirken sowohl endokrin als auch parakrin und autokrin. Neben der Stimulation des Zellwachstums und der Differenzierung sind sie für die Transformation von Zellen nötig und können vor Apoptose schützen (BASERGA 1995, BASERGA 1997, JONES 1995). Somit spielen Insulin-like Growth Factors eine wichtige Rolle in der Tumorigenese und im Tumorwachstum (BASERGA 1995) und stellen auch für Bronchialkarzinomzellen autokrine Wachstumsfaktoren dar (HAVEMANN 1990).

Die Wirkungen dieser Peptidhormone werden im wesentlichen über den IGF-I-Rezeptor, einen Tyrosinkinase-Rezeptor, vermittelt. IGF-I und IGF-II binden mit hoher Affinität an den IGF-I-Rezeptor (JONES 1995). Der IGF-II-Rezeptor hingegen ist identisch mit dem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor. Seine Funktion im IGF-System ist bisher nicht so gut verstanden wie die des IGF-I-Rezeptors. Er reguliert über die Bindung von IGF-II dessen Konzentration und ist bedeutsam in der Embryonalentwicklung (JONES 1995). Jedoch wird auch ein Teil der mitogenen (SCHARDT 1993) oder hemmenden (KANG 1997) Wirkung von IGF-II über den IGF-II-Rezeptor vermittelt (JONES 1995).

In das IGF-System greifen nun IGF-Bindungsproteine (IGFBP) ein. Es handelt sich dabei um cysteinreiche Proteine, die eine hohe Affinität zu IGF-I und IGF-II zeigen. Derzeit sind sechs IGFBPs beschrieben; sie bilden mit den in den letzten Jahren entdeckten und klassifizierten IGFBP-related Peptides eine Superfamilie (zur Übersicht HWA 1999). Die IGFBPs besitzen eine höhere Affinität zu den IGFs als deren Rezeptoren und modulieren auf diese Weise die Verfügbarkeit der Wachstumsfaktoren und deren Rezeptorinteraktion. Neben ihrer Funktion als Transportproteine für IGFs im Serum und Mitwirkung bei deren Kapillardurchtritt besitzen sie teilweise eigenständige Wirkungen (CLEMMONS 1998, HWA 1999, JONES 1995, KELLEY 1996). So kann IGFBP-3 Apoptose induzieren (GUCEV 1996, HAN 1997, NICKERSON 1997, OH 1995) und an Rezeptoren auf der Oberfläche von Mammakarzinomzellen binden (OH 1993, RAJAH 1997). Die Konzentration der IGFBPs wiederum wird durch spezifische Proteasen reguliert (RAJAH 1995).

Insulin-like-Growth-Factor-Bindungsproteine werden neben anderen Zelllinien auch von Bronchialkarzinomzellen exprimiert und sekretiert (JAQUES 1989, KIEFER 1991, REEVE 1992a). Kleinzellige Bronchialkarzinom-Zelllinien produzieren außer IGFBP-4 und IGFBP-5 vor allem IGFBP-2 (KIEFER 1991, WEGMANN 1993). Dieses unglykosylierte Protein weist eine Größe von 34 kDa auf (SHIMASAKI 1991). In Lungentumoren und fetalem Gewebe findet sich neben dem reifen Transkript von 1,4 kb ein zweites mRNA-Transkript von 4 kb (REEVE 1992a). IGFBP-2 bindet über seine RGD-Sequenz an die Zellmembran (KELLEY 1996, MENOUNY 1998, SHIMASAKI 1991). Dieses zellmembranassoziierte IGFBP-2 stellt bei SCLC-Zellen möglicherweise den Hauptbindungspartner für IGF dar (REEVE 1993). Zudem kann IGFBP-2 an die extrazelluläre Matrix (CLEMMONS 1998) sowie innerhalb der Basalmembran an Heparin (ARAI 1996) binden. Der Umsatz von IGFBP-2 erfolgt schnell mit einer Halbwertszeit von ca. 90 Minuten (JONES 1995, RAJARAM 1997). Proteasen sind in Serum und Liquor vorhanden (RAJARAM 1997), eine der spezifischen Proteasen wurde inzwischen als CathepsinD identifiziert (CLAUSSEN 1997). Der Serumspiegel von IGFBP-2 zeigt kaum tageszeitliche Schwankungen; der höchste Gehalt tritt während der Fetalzeit, postnatal und im Alter auf. Eine Erhöhung ist auch bei Diabetikern und während des Fastens zu sehen (BLUM 1993, RAJARAM 1997). Der IGFBP-2-Spiegel wird invers zur Konzentration von IGF, Insulin und IGFBP-3 reguliert (BLUM 1993, RAJARAM 1997, REEVE 1992a). IGFBP-2 ist beim Erwachsenen vor allem im ZNS und in Reproduktionsgewebe zu finden, insbesondere Prostata und Prostatakarzinom enthalten viel IGFBP-2 (KELLEY 1996, RAJARAM 1997).



IGFBP-2 kann über die Bindung von IGFs sowohl mitogen als auch wachstumshemmend wirken (JONES 1995, KELLEY 1996, RAJARAM 1997). Bei Lungenstammzellen *in vitro* ist IGFBP-2 einerseits mit einer Wachstumshemmung assoziiert (MOUHIEDDINE 1996, NABEYRAT 1998), andererseits finden sich auch zahlreiche Beispiele einer mitogenen Funktion (ADAMO 1995, CHEN 1994, MENOUNY 1998, SLOOTWEG 1995). Möglicherweise vermittelt das an die Zellmembran gebundene IGFBP-2 die mitogene Wirkung (KELLEY 1996). Entsprechend seiner Bedeutung während der Fetalzeit scheint IGFBP-2 bei der Lungenentwicklung eine wichtige Rolle zu spielen (WALLEN 1997). IGFBP-2 ist bei einer Reihe von Tumoren im Serum der Patienten erhöht (BLUM 1993, COHEN 1994, RAJARAM 1997, REEVE 1993), so auch bei Lungentumoren (LEE 1999b, REEVE 1992a); seine Verwendung als Tumormarker wurde daher diskutiert.

Retinoide können die Expression und Sekretion der IGF-Bindungsproteine verändern. Bezogen auf IGFBP-2 bedeutet dies, daß im Rahmen der Wachstumshemmung oder Differenzierungsinduktion durch all-trans-Retinsäure die Konzentration von IGFBP-2 sinkt (BABAJKO 96, BERNARDINI 94, CHAMBERY 98, SHEIKH 1993). Die Regulation erfolgt posttranskriptionell über eine Verringerung der mRNA-Halbwertszeit oder über die Proteinexpression (BERNARDINI 1994, CHAMBERY 1998, SHEIKH 1993). Eine verringerte Proteinsekretion von IGFBP-2 durch ATRA ist jedoch auch bei stimulierender Wirkung von all-trans-Retinsäure in Lungenstammzellen oder einer Neuroblastom-Zelllinie zu sehen (MENOUNY 1997, NABEYRAT 1998).

Ein weiteres Beispiel, wie Retinoide in das System der IGFs eingreifen können, ist der Weg über die Proteolyse von IGF-II. Insulin-like-Growth-Factor-II schützt Neuroblastome vor c-myc-induzierter Apoptose. All-trans-Retinsäure erhöht nun die Expression des Insulin-degrading Enzyme (IDE), welches IGF-II spaltet und auf diese Weise die Apoptoseinduktion durch ATRA ermöglicht (MELINO 1996).

Eine bis dahin noch nicht beschriebene Wechselwirkung eines Retinoids mit den IGFs stellten Kang et al. (1993) fest. Sie zeigten die Bindung von all-trans-Retinsäure an den IGF-II-Rezeptor über eine eigene Bindungsstelle. Dies führte durch eine Verstärkung der Rezeptorwirkungen zu einer erhöhten Degradation von IGF-II, einer gesteigerten lysosomalen Aktivität, die über Mannose-6-Phosphat reguliert wird und schließlich zu einer vermehrten Bindung und Aktivierung von TGF- $\beta$ , welcher ebenfalls eine Bindungsstelle am IGF-II-Rezeptor besitzt. Die Überexpression des IGF-II-Rezeptors in einer gegen ATRA resistenten Zelllinie HL-60R induzierte eine Wachstumshemmung und Apoptose durch ATRA. Ob dies durch die Interaktionen mit den anderen

Bindungspartnern oder durch einen eigenen Wirkungsmechanismus von ATRA verursacht wird, konnte in der Arbeit von Kang et al. (1993) nicht geklärt werden.

Es existiert somit eine Vielzahl von Wechselwirkungen zwischen den wachstumshemmenden und Differenzierung induzierenden Retinoiden einerseits und dem IGF-System, welches für Tumorproliferation und Transformation entscheidend ist, andererseits. Die IGFBPs gewinnen dabei zunehmend an Bedeutung.

#### 1.2.2.4 Retinoide in der Chemoprävention des Bronchialkarzinoms

Eine der Beobachtungen, die dazu beitrug, daß Retinoide Eingang in die Forschung und Therapie des Bronchialkarzinoms fanden, war die Tatsache, daß Vitamin A-Mangel Plattenepithelmetaplasien im oberen Atemtrakt auslöst, ähnlich den Präkanzerosen im Epithel von Rauchern (ZHANG 1994, ZOU 1998b). Zudem erhöht Vitamin A-Mangel das Lungenkrebsrisiko (LOTAN 1997a, ZOU 1998b). Mitte der siebziger Jahre entwickelte Sporn eine Organkultur aus tracheobronchialen Epithelzellen und testete daran die Wirkungen von Retinoiden. Die durch Retinol-Mangel hervorgerufene Hyperkeratinisierung der Zellen und die Plattenepithelmetaplasien waren nach Zugabe von Retinoiden, insbesondere von all-trans-Retinsäure, reversibel; auch die starke Basalzellproliferation war rückläufig (SPORN 1991). Die anti-carcinogene Fähigkeit der Retinoide zeigte sich auch im Tiermodell: ATRA verhinderte die Transformation von Ratten-Tracheobronchialepithel durch Benzo-a-pyren oder die Induktion von Metaplasien in Hamster-Trachealaepithel (LOTAN 1997b).

Retinoide bewirken die Veränderungen im Zellwachstum und die Differenzierungsinduktion über eine Beeinflussung der Konzentration von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, aber auch über eine Regulation von Onkogenen (LOTAN 1997a). Die myc-Familie zählt beispielsweise zu diesen für die Genese des kleinzelligen Bronchialkarzinoms wichtigen Onkogenen. Hier kann ATRA die Expression von c-myc senken und von L-myc erhöhen; dies entspricht hinsichtlich des Wachstumsverhaltens einem Übergang vom varianten zum klassischen Subtyp (DOYLE 1989, KALEMKERIAN 1994, OU 1996). Die Reduktion von c-myc kann den spontanen Übergang von SCLC-Zellen zu solchen mit Eigenschaften von NSCLC-Zellen verhindern (KALEMKERIAN 1994).

Retinoide entwickeln ihre größte chemopräventive Wirkung bei Präkanzerosen und der Verhinderung von Zweittumoren, wohingegen sie in der Therapie solider maligner Tumoren weniger erfolgreich sind (ALBERTS 1995, LOTAN 1997b, MAYNE 1997).

Bekanntestes Beispiel der Retinoidwirkung ist die Behandlung der akuten Promyelozyten-Leukämie mit all-trans-Retinsäure. Nach anfänglich sehr guten Erfolgen kommt es jedoch meist zu einer Therapieresistenz aufgrund des induzierten Katabolismus von ATRA (ADAMSON 1994, BREITMAN 1994, DETHE 1996).

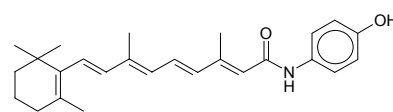
Der Einsatz von Retinoiden wird durch zwei Umstände beeinträchtigt: Zum einen ist ihre Wirkung an die ständige Einnahme gebunden, da nach Absetzen der Effekt reversibel ist (LOTAN 1996). Schwerer wiegen die toxischen Nebenwirkungen, die häufig zum Abbruch der Behandlung führen. Diese können von trockener Haut mit Schuppungen, Cheilitis, Konjunktivitis, Kopfschmerzen und gastrointestinalen Beschwerden über einen Anstieg der Leberenzyme und des Triglyceridspiegels bis hin zum Retinsäure-Syndrom reichen (BENNER 1995, DEPALO 1995). Letzteres tritt bei bis zu 50% der Patienten mit akuter Promyelozyten-Leukämie auf und umfaßt Fieber, Lungeninfiltrationen, Pleura- und Perikardergüsse sowie Multi-Organ-Versagen (WARRELL 1994). Außerdem wurde ein teratogener Effekt nachgewiesen (LOTAN 1996).

Das häufige Auftreten von schweren Nebenwirkungen veranlaßte die Suche nach synthetischen Retinoiden, die durch möglichst hohe Rezeptor-Selektivität eine optimale Wirkung bei geringen Nebenwirkungen bieten sollten. Zu diesen Substanzen, die seit einiger Zeit in der Forschung und in klinischen Studien verwendet werden, zählt Fenretinid.

### 1.2.3 Fenretinid, *N*-(4-hydroxyphenyl)retinamid

Fenretinid gehört in die Gruppe der synthetischen Retinoide. Es wurde bereits Ende der sechziger Jahre von R. Gander hergestellt und Mitte der siebziger Jahre von Sporn und Newman pharmakologisch charakterisiert (COSTA 1995).

Mittlerweile wurden etwa 1500 synthetische Retinoide entwickelt. Durch eine möglichst hohe Rezeptorselektivität sollen die Nebenwirkungen der Substanzen gering gehalten werden. Insbesondere RAR $\gamma$ -selektive Retinoide und solche, die nur mit dem Transkriptionsfaktor AP-1 interagieren, zeigen günstige Eigenschaften (FANJUL 1994, LI 1997, LI 1999, SUN 1997). Inzwischen liegen auch Versuchsergebnisse mit Derivaten der Muttersubstanz 4-HPR vor. Dabei zeigen *N*-(4-hydroxyphenyl)-retinamid-O-glucuronid (4-HPROG) und *N*-(4-hydroxyphenyl)-retinamidobenzyl-glucuronide (4-HPRCG) (ABOU-ISSA 1999, CURLEY 1996) bzw.



*N*-(4-hydroxyphenyl)retinamid

Carboxy/Methoxy-Phenylretinamide (CLIFFORD 2001, SUN 2001) bessere Wirkungen als die Ausgangssubstanz 4-HPR.

### 1.2.3.1 Pharmakokinetik und Pharmakodynamik

Fenretinid wird über den Darm aufgenommen und im Plasma über das Retinol-Bindungsprotein (RBP) transportiert. Innerhalb der Zelle konnte keine Bindung an zelluläre Retinol-Bindungsproteine (CRBP) oder zelluläre Retinsäure-Bindungsproteine (CRABP) gefunden werden (BERNI 1999, SANI 1995). Hauptmetabolit von 4-HPR ist das lipophile N-(4-methoxyphenyl)retinamid (MPR), dazu kommen stärker polare Substanzen wie 4-HPR-O-glucuronid. Sechzig Prozent der Abbauprodukte werden nach ungefähr fünf Tagen über die Faeces ausgeschieden, die polaren Metabolite gelangen in den Urin (FORMELLI 1996). Fenretinid wird nicht in der Leber gespeichert; es kann sich jedoch in Gewebe, insbesondere Fettgewebe und Brustdrüse, um das Zehnfache gegenüber dem Serum anreichern (FORMELLI 1996, NAIK 1995). Zudem ist Fenretinid plazentagängig, eine Anreicherung im Embryo konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (FORMELLI 1998).

Interessanterweise ist die Anreicherung von 4-HPR im Epithel zu finden, während sein Hauptmetabolit MPR im Fettgewebe und Stroma akkumuliert (FORMELLI 1996, MEHTA 1991). Die Wirksamkeit von MPR wird kontrovers diskutiert. In der überwiegenden Anzahl der Untersuchungen konnte keine Wirkung des Metaboliten festgestellt werden (DELIA 1995, DELIA 1997, FANJUL 1996, MEHTA 1998, ORIDATE 1997, SHEIKH 1995, PERGOLIZZI 1999), lediglich Kazmi et al. (1996) und Gadgeel et al. (1999) berichten von einer schwachen Hemmung durch MPR. Wiederholt wurde jedoch für 4-HPR wie auch für ATRA beschrieben, daß nur in sensitiven Zellen Metaboliten wie z.B. MPR entstehen (MEHTA 1998, TAKATSUKA 1996). Dies könnte einerseits bedeuten, daß Wirkung und Metabolismus der Retinoide über den gleichen Rezeptor oder Rezeptorkombinationen vermittelt würden, andererseits würde 4-HPR möglicherweise über einen Metaboliten wirken. Mehta et al. (1988) entdeckten einen unbekannteten Metaboliten, der zusammen mit 4-HPR im Epithel gespeichert wurde und im Gegensatz zu 4-HPR auch an CRABP binden kann. Inwiefern dieser Metabolit zwischenzeitlich identifiziert wurde und eventuell mit einer der glucuronierten Verbindungen identisch ist, ist in der Literatur nicht beschrieben.

Die Halbwertszeit von 4-HPR liegt zwischen 13 und 16 Stunden, die von MPR bei 22 Stunden. Nach einer Einzeldosis von 300 mg 4-HPR wird nach ungefähr vier Stunden

ein maximaler Plasmaspiegel von 1,3  $\mu\text{M}$  erreicht (FORMELLI 1996, NAIK 1995). Plasmaspiegel und Halbwertszeiten sind auch nach fünfjähriger Anwendung stabil und sinken nach dem Absetzen der Droge rasch ab (FORMELLI 1993). Vergleichbare Daten liegen ebenfalls von Kindern vor (BAGNIEWSKI 1999).

Fenretinid kann an Retinsäure-Rezeptoren binden. Eine Transaktivierung findet vorwiegend mit  $\text{RAR}\gamma$  und  $\text{RAR}\beta$ , Transrepression mit  $\text{RAR}\alpha$ ,  $\text{RAR}\beta$  und  $\text{RXR}\alpha$  statt (FANJUL 1996). Fanjul et al. arbeiteten allerdings mit Konzentrationen von 10-25  $\mu\text{M}$ , die damit weit über dem Bereich lagen, in dem bereits Wirkungen an den untersuchten Zellen auftraten. Autoren, die weniger hohe Konzentrationen von 4-HPR verwendeten, sahen eine nur schwache Aktivierung der bekannten Retinsäure-Rezeptoren (KAZMI 1996, SHEIKH 1995, SUN 1999a). Trotz der teilweise gefunden Induktion des  $\text{RAR}\beta$ -Rezeptors (JOHANNING 2001) scheint kein direkter Zusammenhang zwischen Rezeptorregulation und Hemmwirkung zu bestehen (LIU 1998, SUN 1999a, WEBBER 1999, ZOU 1998b). Fenretinid kann ebenso wie ATRA mit AP-1 interagieren (FANJUL 1996, PIEDRAFITA 1997).

Die unerwünschten Nebenwirkungen von 4-HPR sind deutlich schwächer ausgeprägt als die der klassischen Retinoide. Dies zeigte sich auch in einer begleitenden Untersuchung zu einer Langzeitstudie (CAMERINI 2001). Die wichtigste Beeinträchtigung ist die Entwicklung einer Nachtblindheit, die durch das Absinken des Plasmaretinolspiegels auf ca. 30% erklärt wird (FORMELLI 1993, NAIK 1995). Dieser Effekt ist jedoch vollständig reversibel. Bereits nach dreitägiger Unterbrechung steigt der Retinol-Spiegel auf 60% an und nach einem Monat sind die Patienten beschwerdefrei. Die Reduktion des Retinolgehalts verläuft darüber hinaus bei der Hälfte der Patienten asymptomatisch (DECENSI 1994a). Die dermatologischen Beschwerden wie Hautschuppung, Juckreiz, Cheilitis, Mundtrockenheit oder Alopezie verlaufen in der Regel milde (DEPALO 1995, NAIK 1995). Es kommt zum Anstieg der Leberenzyme und des Triglyderidspiegels. Über eine mögliche Teratogenität liegen nur wenige Daten vor (NAIK 1995).

### 1.2.3.2 Wirkungen

In der Art der Wirkungen weist Fenretinid viele Gemeinsamkeiten mit all-trans-Retinsäure auf, obgleich sein genauer Wirkmechanismus noch unbekannt ist. Ein wichtiger Unterschied liegt jedoch in der Induktion von Apoptose, die 4-HPR in einer Vielzahl von Zellen auslöst, welche nicht auf ATRA reagieren. Inhibition von Apoptose ist ein

wichtiger Schritt in der Carcinogenese, da die meisten Tumorzellen durch Mutationen Unsterblichkeit erwerben. Durch Chemotherapeutika, die Schäden an der DNA setzen, kann so das Risiko steigen, zusätzliche Mutationen hervorzurufen, die Tumorprogression bedeuten (WYLLIE 1997). Daher sind Therapeutika, die Apoptose in Tumorzellen bewirken können, besonders attraktiv für den klinischen Einsatz. Im folgenden sollen die bislang bekannten Wirkungen von Fenretinid kurz dargestellt werden.

Fenretinid ruft in zahlreichen untersuchten Zelllinien eine **Reduktion der Zellzahl** hervor, die durch unterschiedliche Vorgänge bewirkt werden kann. Außer Apoptose, Differenzierung und Regulation von Onkogenen, die weiter unten besprochen werden sollen, kommen auch Wechselwirkungen mit Wachstumsfaktoren und Eingriffe in den Zellzyklus in Frage. Es existieren sowohl Ergebnisse, die gegen eine Veränderung der Zellzyklusphasen (DELIA 1993, DIVINCI 1994, PONZONI 1995, PUDUVALLI 1999, SUPINO 1996) als auch für einen Arrest in bestimmten Phasen (DIPIETRANTONIO 1996, HSIEH 2000, IGAWA 1997, ROBERSON 1997) sprechen. So scheint bei Mammakarzinom-Zelllinien bzw. Lymphomzellen eine Wachstumshemmung mit einer Dephosphorylierung von Retinoblastom-Protein und einem Zellzyklusarrest einherzugehen (HSIEH 2000, PANGIONE 2000). In Prostatakarzinomzellen scheint ein Teil der Wirkung von 4-HPR über eine Induktion des Wachstumsfaktors TGF $\beta$ 1 zu erfolgen (ROBERSON 1997). Auch in das System der IGF-Wachstumsfaktoren kann 4-HPR eingreifen. Es senkt in Mammakarzinomzellen die IGF-I-Sekretion sowie die Zahl der IGF-I-Rezeptoren und reduziert die Sekretion von IGFBP-1, IGFBP-4 und IGFBP-5 (FAVONI 1998). Eine Absenkung des IGF-I Serumspiegels sowie einen Anstieg des IGFBP-3 Gehaltes stellten Decensi et al. (2001) bei Patientinnen fest, die im Rahmen einer Brustkrebsstudie mit Fenretinid behandelt wurden. IGFBP-related-Peptide-1 (Synonyme mac25 und IGFBP-7) wird eine Rolle als Tumorsuppressorgen zugeschrieben. Es akkumuliert in seneszenten normalen Zellen, während es im Laufe der Tumorprogression zurückgeht (BURGER 1998, OH 1996). Durch 4-HPR oder ATRA konnte eine Hochregulation seiner Expression in normalen Zellen erreicht werden (HWA 1998, SWISSHELM 1995). Inwieweit die Veränderungen im IGF-System direkt durch 4-HPR hervorgerufen werden oder ein indirekter Einfluß vorliegt, ist bislang nicht geklärt.

**Differenzierung**, wie sie häufig von ATRA induziert wird, tritt bei 4-HPR seltener auf. Keine Anzeichen für eine Erhöhung von Differenzierungsmarkern finden sich bei SCLC-Zelllinien (KALEMKERIAN 1995), Leukämie-Zelllinien (DELIA 1993) oder Neuroblastomen (PONZONI 1995). In anderen Zelllinien hingegen steigen beispielsweise

LamininB1 und  $\beta$ 1-Integrin an, während Tumorprogressionsmarker wie p185/HER2 oder EGF-Rezeptor sinken (CLIFFORD 1999, PELLEGRINI 1995). Das Metastasierungspotential von Prostatakarzinomzellen oder Lymphomzelllinien wird durch Fenretinid reduziert (KIM 1995, TANABE 2000, VACCARI 2000, WEBBER 1994). Die differenzierende Wirkung von 4-HPR scheint durch Retinsäure-Rezeptoren vermittelt zu werden (CLIFFORD 1999).

Die **Apoptoseinduktion** durch 4-HPR ist ein in vielen Tumor-Zelllinien verbreiteter Effekt. Außer in kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien (KALEMKERIAN 1995) läßt sich Apoptose in NSCLC-Zelllinien (SUN 1999b, ZOU 1998b), HNSCC-Zelllinien (EICHER 1996, ORIDATE 1996, SCHER 1998), Gliomen (PUDUVALLI 1999, SAITOH 1999), Prostatakarzinom-Zelllinien (HSIEH 1997, ROBERSON 1997, SHEN 1999, SUN 1999a, WEBBER 1999), T-Zell-Lymphomen (CHAN 1997a, PIEDRAFITA 1997), myelischen Leukämiezellen (DELIA 1997, DIPIETRANTONIO 1996), Melanom-Zelllinien (MONTALDO 1999), Mammakarzinom-Zelllinien (PELLEGRINI 1995, SHEIKH 1995, WANG 1996), Neuroblastomen (PONZONI 1995, REYNOLDS 1997, DIVINCI 1994), Zervixkarzinom-Zelllinien (ORIDATE 1995) und Ovarialkarzinom-Zelllinien (GURUSWAMY 2001, SABICHI 1998, SUPINO 1996) beobachten. Fenretinid kann auch in solchen Zellen Apoptose auslösen, die gegen ATRA resistent sind oder in denen Apoptose nur nach sehr hohen Dosen ATRA oder langer Einwirkdauer stattfindet (CHIANTORE 1999, CLIFFORD 1999, DIVINCI 1994, EICHER 1996, ORIDATE 1995, ORIDATE 1997, PONZONI 1995, POOT 1999).

Der Mechanismus, über den Fenretinid Apoptose auslöst, ist, wie bereits erwähnt, nicht geklärt. Retinsäure-Rezeptoren sind vermutlich nicht direkt beteiligt, da Apoptose auch in Anwesenheit von Retinsäure-Rezeptor-Antagonisten (KITAREEWAN 1999, ORIDATE 1997, SUN 1999a, SUN 1999b) oder in rezeptordefizienten Zellen auftritt (CLIFFORD 1999, GIANDOMENICO 1999, KITAREEWAN 1999). Neuere Ergebnisse zeigen, daß sich während des Apoptoseprozesses reaktive oxidative Substanzen (ROS) bilden können; durch Zugabe von Reduktionsmitteln läßt sich die Apoptose unterdrücken (CLIFFORD 1999, DELIA 1997, MAURER 1999, ORIDATE 1997, SUN 1999a). Da ROS Apoptose induzieren können, aber auch durch unterschiedliche Stimuli während apoptotischer wie nekrotischer Prozesse entstehen (GREEN 1998, WYLLIE 1997), bleibt die Frage nach der Kausalität offen.

Den Einsatz in der Onkologie verdankt Fenretinid seiner **anti-carcinogenen Wirkung**, die sich *in vitro* ebenso zeigte wie in Tierversuchen oder klinischen Studien. Auf molekularbiologischer Ebene kann 4-HPR die Expression des Proto-Onkogens c-myc, eines

Transkriptionsfaktors, der auch in SCLC-Zelllinien eine wichtige Funktion in der Zellproliferation innehat, herunterregulieren (DELIA 1995, IGAWA 1994, PIEDRAFITA 1997, SUN 1999a).

*In vivo* verhinderte 4-HPR die Transformation von Ratten-Trachealepithel durch Benzo-a-pyren (STEELE 1990), reduzierte die durch MNU induzierte Tumorzinzidenz in Ratten (RODRIGUEZ-BURFORD 1999) und verringerte die Tumorzanzahl und -inzidenz sowie die Latenz in chemisch induzierten Mammakarzinomen von Ratten und Mäusen (ALSHAFIE 1999, BEDNAREK 1999, MOON 1997). Die durch N-ethyl-N-nitrosurea verursachte Lymphombildung bei Mäusen wurde durch 4-HPR verzögert, die Mortalität letztlich aber nicht beeinflusst (MCCORMICK 1996). Viral-induzierte T-Zell-Lymphome bei Mäusen wurden ebenfalls von 4-HPR unterdrückt (CHAN 1997b). In Kolonepithel schließlich verringerte Fenretinid die Zahl der durch Azoxymethan gebildeten Tumoren und aberranten Kryptenfoci und erhöhte den Apoptoseindex (ZHENG 1997, ZHENG 1999). In Lungentumoren dagegen konnte 4-HPR die Tumorzinzidenz in Mäusen nach Behandlung mit einem tabakspezifischen Carcinogen nicht reduzieren (CONAWAY 1998). Teilweise trat sogar eine Stimulation des Tumorzuchstums in der Lunge in Abhängigkeit von der Darreichungsform von 4-HPR auf (LOTAN 1996). Ähnliches war bei der Induktion von Ösohaguskarzinomen an Ratten zu beobachten (GUPTA 2001). Weitere Ergebnisse aus Tiermodellen werden in der Übersicht von Ulukaya und Wood (1999) genannt.

Kleinere Studien mit Patienten zeigten widersprüchliche Wirkungen von 4-HPR. So wiesen Probebiopsien aus Bronchialschleimhaut von starken Rauchern keine Veränderung chromosomaler Marker wie p53 oder Ki67 nach einer Behandlung mit 200 mg 4-HPR täglich auf (HITTELMAN 1999). In der Therapie von oralen Leukoplakien (CHIESA 1993, TRADATI 1994) erzielte Fenretinid dagegen einen Behandlungserfolg; allerdings handelte es sich dabei um sehr geringe Fallzahlen. Eine Reduktion zervikaler Dysplasien (CIN-I und CIN-II) ergab sich nach der Anwendung von 4-HPR (LOTAN 1996). Klinische Studien, in denen Fenretinid verwendet wird, sind im nachfolgenden Kapitel aufgeführt.

Zum Abschluß soll noch eine Reihe weiterer, durch 4-HPR hervorgerufener Effekte genannt werden. Fenretinid kann über eine Synthesehemmung von PGE<sub>2</sub> oder COX-1 **antiinflammatorisch** wirken (ELATTA 1991, PARRETT 1999) sowie über eine Stimulation der Makrophagenfunktion und der Aktivität Natürlicher Killerzellen das **Immun-**



**system** modulieren (FORMELLI 1996, VILLA 1993). Schließlich unterdrückt das Retinoid die **Angiogenese** in Prostatakarzinomen von Ratten (NAIK 1995, PIANTA 1995).

#### 1.2.4 Klinische Studien mit Retinoiden

Dieses Kapitel beinhaltet eine Auswahl klinischer Studien mit Retinoiden. Vorgestellt werden Studien mit Fenretinid oder solche, die auf Chemoprävention von Bronchialkarzinomen oder Tumoren im Kopf-Hals-Bereich abzielen.

Retinoide zeigten insgesamt in der Verringerung von Sputumatypen kaum Wirkung. Lediglich Etrétinate, ein Retinsäure-Derivat, war in einer unkontrollierten Studie erfolgreich (LOTAN 1996, MCLARTY 1995).

Aufgrund der Beobachtung, daß eine obst- und gemüsereiche Ernährung, die viel  $\beta$ -Carotin enthält, möglicherweise das Lungenkrebsrisiko senkt, wurde die CARET-Studie ( $\beta$ -Carotene and Retinol Efficacy Trial) durchgeführt. Über 18.000 Menschen aus einer Hochrisiko-Gruppe für Bronchialkarzinome erhielten täglich  $\beta$ -Carotin und Retinol. Die Studie mußte jedoch vorzeitig abgebrochen werden, da im Behandlungsarm die Bronchialkarzinom-Inzidenz und die Mortalität deutlich über der der Kontrollgruppe lagen (OMENN 1996). Vergleichbare Ergebnisse erbrachte die ATPC-Studie (Alpha-Tocopherol-Beta-Carotene Cancer Prevention Study) aus Finnland (ALBANES 1996).

Dagegen senkte Retinyl-Palmitate die Anzahl der Zweittumoren von Patienten nach Resektion eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms Stadium-I und erhöhte die Latenzzeit (PASTORINO 1993). Auch Isotretinoin (13-cis-Retinsäure) konnte die Rate der Zweittumoren im Kopf-Hals-Bereich reduzieren, ohne allerdings Lokalrezidive zu verhindern (zur Übersicht LIPPMAN 1995). Derzeit werden vom National Cancer Institute (NCI) eine Phase-III-Studie mit Isotretinoin zur Prävention von Zweittumoren nach Resektion eines NSCLC-Stadium-I sowie eine Phase-II-Studie in Kombination mit Interferon- $\alpha$  zur Behandlung von Plattenepithelkarzinomen der Lunge, Kopf-Hals, Zervix und Penis durchgeführt. All-trans-Retinsäure wird ebenfalls in einer NCI-Studie Phase-II in Kombination mit Interferon- $\alpha$  an fortgeschrittenem NSCLC getestet. In der Behandlung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms wurde ATRA zusammen mit Cisplatin und Etoposid eingesetzt. Aufgrund der toxischen Nebenwirkungen des Retinoids mußte die Studie abgebrochen werden (KALEMKERIAN 1998); eine parallele

Phase-II-Studie am NCI bei fortgeschrittenem NSCLC ergab eine leicht erhöhte Überlebenszeit durch die Behandlung (THIRUVENGADAM 1995).

Die Studienergebnisse mit Fenretinid fallen sehr unterschiedlich aus. Die besten Erfolge erzielt 4-HPR im dermatologischen Bereich. Aufgrund vielversprechender Ergebnisse in der Behandlung oraler Leukoplakien (COSTA 1995, CHIESA 1993) und aktinischer Keratinose (MOGLIA 1996) wurden am NCI mehrere Phase-II-Studien gegen orale Leukoplakie, dysplastisches Naevi-Syndrom und aktinische Keratinose begonnen. Ergebnisse liegen noch nicht vor, ebensowenig wie aus der Basalzellkarzinom-Studie des Istituto Nazionale Tumori in Mailand (COSTA 1995).

In einer kleinen Phase-II-Studie aus Mailand konnte 4-HPR die Zahl der aneuploiden Zellen verringern, die sich bei Patienten mit einem superfiziellen Blasenkarzinom im Blasenspülwasser befanden (COSTA 1995, DECENSI 1994b). Weitere Studien zur Therapie des Blasenkarzinoms mit 4-HPR werden zur Zeit in Phase II wie auch Phase III am NCI unternommen.

Eine große Studie zur Prävention von kontralateralem Brustkrebs nach Resektion eines stage-I Mammakarzinoms oder eines duktales Carcinomas in situ wurde kürzlich in Mailand beendet. Die Tumorraten zwischen Placebo- oder Verum-Gruppe unterschied sich insgesamt nicht; zwar sank bei prä-menopausalen Frauen durch die Fenretinid-Gabe die Tumorzinidenz, bei post-menopausalen Patientinnen stieg aber das Tumorrisko unter 4-HPR um das 1,2fache an (VERONESI 1999). Fenretinid wird am NCI zur Behandlung von Mammakarzinomen in Kombination mit Tamoxifen in mehreren Studien eingesetzt (s. auch CONLEY 2000).

Trotz guter Erfolge von 4-HPR *in vitro* in der Wachstumshemmung von Prostatakarzinom-Zelllinien konnten Studienergebnisse an Patienten bisher nicht überzeugen (PIENTA 1997, URBAN 1999). Ergebnisse aus den NCI-Studien liegen noch nicht vor.

Dies gilt auch für eine Phase-I-Studie des NCI, in der verschiedene solide maligne Tumoren einschließlich Lungenkarzinome auf ihr Ansprechen auf 4-HPR getestet werden oder eine Phase-II-Studie, in der die Reversibilität von Metaplasien und Dysplasien des Bronchialepithels von Rauchern untersucht wird. Kürzlich wurde eine Phase-II-Studie am National Cancer Institute begonnen, die den Effekt von Fenretinid in der Behandlung von Patienten mit Rezidiv eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms untersuchen soll; vor dem Hintergrund der Thematik dieser Arbeit sicher die interessanteste Studie.

Schließlich findet derzeit eine Phase-III-Studie am NCI zur Wirksamkeit von Fenretinid bei zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) Grad 2-3 statt.

Während die bisherigen Studienergebnisse den Einsatz von Fenretinid in der Dermatologie unterstützen, waren seine Effekte im onkologischen Bereich trotz vielversprechender Versuche im Tiermodell enttäuschend. Ob sich Einsatzmöglichkeiten von 4-HPR bei bestimmten Tumorentitäten ergeben, müssen die aktuellen Studien zeigen.

### 1.3 Fragestellungen der Arbeit

Fenretinid besitzt die Fähigkeit, in kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien und anderen Tumorzelllinien eine Wachstumshemmung über Apoptose und Differenzierung hervorzurufen. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob die Zellzahlreduktion durch Fenretinid in einer größeren Anzahl von kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien auftritt oder ein vereinzelt Phänomen bleibt. Da Wachstumshemmung durch unterschiedliche Mechanismen bewirkt werden kann, sind die Zelllinien auf das Auftreten von Apoptose oder auf morphologische Veränderungen im Sinne von Differenzierung hin zu untersuchen.

Von all-trans-Retinsäure und Fenretinid ist bekannt, daß sie modulierend auf das autokrine Wachstumsfaktorsystem der Insulin-like-Growth-Factors (IGF) und deren Bindungsproteine (IGFBP) wirken können und auf diese Weise direkt oder indirekt ihre wachstumshemmende Wirkung vermitteln. Daher soll festgestellt werden, ob Fenretinid, wie bei all-trans-Retinsäure bereits beobachtet, die Expression oder Sekretion des für SCLC-Zelllinien wichtigen IGFBP-2 verändert.

Hinsichtlich einer Übertragbarkeit der *in vitro*-Ergebnisse auf die Situation *in vivo* ist es von Bedeutung, ob die Inhibition durch Fenretinid eine Abhängigkeit vom Serumgehalt zeigt.

Des weiteren ist im Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Einsatz von Fenretinid zu untersuchen, ob die zytostatische Wirkung nach Absetzen des Retinoids reversibel ist und ob sich die Effekte durch eine Kombination von Fenretinid und all-trans-Retinsäure verstärken lassen.

Da sich eine klinische Verwendung über einen längeren Zeitraum erstrecken würde, sollen die Zelllinien schließlich auf die Stabilität der Hemmwirkung sowie auftretende morphologische Veränderungen nach konstanter Fenretinidexposition untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

- Zentrifugen
  - Hermle ZK364 (Hermle, Gosheim)
  - Biofuge B (Heraeus, Hanau)
  - Zytozentrifuge Cytospin2 (Shandon, GB)
- Zellzahlbestimmung
  - Coulter Counter (Coulter Counter Electronics, Krefeld)
  - Titertek Multiskan Photometer (Titertek, USA)
  - Neubauer-Kammer (Planoptik)
- Mikroskopie
  - Mikroskop Leitz Fluovert (Leitz, Wetzlar)
  - Leitz Orthoplan Phasenkonstrastmikroskop (Leitz, Wetzlar)
  - NPL Fluotar 10, Phaco 1 (Leitz, Wetzlar)
  - Mikroskop-Kameraaufsatz WILD MPS 12
  - Kamera Vario-Orthomat (Leitz, Wetzlar)
  - Rasterokular L-Plan (Leica, Wetzlar)
- Durchflußzytometrie
  - FACScan (Becton Dickinson)
- PCR
  - Peltier Thermal Cyclers (MJ Research, USA)

#### 2.1.2 Labormaterialien

- Gewebekulturflaschen 250 ml und 50 ml (Greiner, Frickenhausen)
- 24well-Platten (Greiner, Frickenhausen)
- 96well-Platten (Nunc, Dänemark)
- Filter Millex-GV, 0.22 µm (Millipore, Bedford, USA)

### 2.1.3 Chemikalien, Reagenzien

- $\alpha$ -Aminocapronsäure (Sigma, München)
- Agarose Ultrapure (Gibco BRL, Eggenstein)
- All-trans-Retinsäure (ATRA) (Sigma, München)
- Aqua ad injectabilia (Braun, Melsungen)
- Bovines Serum Albumin (BSA) (Sigma, München)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Roth, Karlsruhe)
- Dithiothreitol (DTT) (Sigma, München)
- Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS) (Sigma, München)
- EDTA, 0.02% in PBS ohne Ca, Mg (Boehringer, Mannheim)
- Ethanol absolut (Apotheke Universitätskliniken Marburg)
- Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe)
- Isopropanol (Merck, Darmstadt)
- MTT Vitalfarbstoff Thiazylolblau 98% (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) (Sigma, München)
- N-(4-Hydroxyphenyl)-Retinamid (Fenretinid, 4-HPR) (Sigma, München)
- Na-Selenit (Sigma, München)
- Na-Selenit, Insulin, Transferrin (SIT) (Sigma, München)
- PBS (phosphate buffer saline) (Boehringer, Mannheim)
- Reverse Transkriptase (Superskript) (Gibco BRL, Eggenstein)
- RNAzol (Wak Chemie, Bad Homburg)
- Taq Polymerase (Boehringer, Mannheim)
- Transferrin, human, 98% eisenfrei (Sigma, München)
- Trypanblau 0.01% (w/v) (Apotheke Universitätskliniken Marburg)
- Trypsin-Lösung 2.5% ohne Ca, Mg (Boehringer, Mannheim)

### 2.1.4 Nukleinsäuren, Nukleotide, Primer

- 2'-Deoxynucleoside-5'-Triphosphate (Gibco BRL, Eggenstein)
- Low Mass DNA-Ladder (Gibco BRL, Eggenstein)
- OligodT<sub>12-18</sub> Primer (Gibco BRL, Eggenstein)
- Oligonukleotide:

Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (Dr. Krause, IMT, Marburg)

GAPDH (5'): CGT CTT CAC CAC CAT GCA GA  
 GAPDH (3'): CCGG CCAA TCA CGC CAC AGT TT  
 IGFBP-2 (MWG-Biotech, Ebersberg)  
 hBP-2 (5'): CTC AAG TCG GGT ATG AAG GAG C  
 hBP-2 (3'): TGC CCG TTC AGA GAC ATC TTG C

### 2.1.5 Pufferlösungen für Western-Ligand-Blot und Elektrophorese

- SDS-Elektrophorese-Puffer  
 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,5% SDS
- Kathodenpuffer  
 25 mM Tris-Base, 40 mM  $\alpha$ -Aminocapronsäure, 20% Ethanol
- Anodenpuffer I/II  
 20 mM / 300 mM Tris-Base, 20% Ethanol
- 10 x TAE-Puffer  
 0,9 M Tris HCl, pH 8,3, 0,9 M Essigsäure, 3 mM EDTA

### 2.1.6 Apoptose-Kits

- ApoDETEC® (Enzo Diagnostics, USA)
- Simply Sensitive® Detection Kit (Enzo Diagnostics, USA)
- AnnexinV FITC® Kit (Oncogene Research Products, USA)

### 2.1.7 Zellkulturmedien

- Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) mit 2 mM L-Glutamin (Gibco BRL, Eggenstein)
- Fötale Kälberserum (FCS), 30 Minuten bei 56 °C hitzeinaktiviert, steril filtriert (Gibco BRL, Eggenstein)
- R10-Medium: RPMI 1640 mit FCS-Zusatz 10%
- ST-Medium: RPMI 1640 + 5,2 ng/ml Na-Selenit + 5  $\mu$ g/ml Transferrin
- SIT-Medium: RPMI 1640 + 5,2 ng/ml Na-Selenit + 5  $\mu$ g/ml Transferrin + 5  $\mu$ g/ml Insulin
- Dialysiertes FCS, MG 10.000 bzw. MG 1.000 (Sigma, München)

### 2.1.8 Zelllinien

Die in den Versuchen verwendeten kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Zelllinie	Suptyp	Herkunft	Literatur
NCI-H60	klassisch	NCI	Carney 1985
NCI-H69	klassisch	NCI	Carney 1985
NCI-H146	klassisch	NCI	Carney 1985
NCI-H209	klassisch	NCI	Carney 1985
NCI-510	klassisch	NCI	Carney 1985
SW210.5	klassisch	Dana Faber Cancer Institute	Bepler 1988
SCLC-24H	transient	ZIM Marburg	Bepler 1987a,b
SCLC-86M1	transient	ZIM Marburg	Bepler 1987a,b
DMS79	variant	DMS	Pettengill 1980
NCI-H82	variant	NCI	Carney 1985
NCI-H526	variant	NCI	Carney 1985
NCI-H841	variant	NCI	Carney 1985

**Tab 2.1** Verwendete SCLC-Zelllinien, Herkunft und Eigenschaften.

Dana Faber Cancer Institute, Boston Mass.; bezogen über DKFZ Heidelberg

DMS: Department of Pathology, Dartmouth Medical School, Hanover, New Hampshire,

NCI: National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, USA

ZIM Marburg: Zentrum für Innere Medizin, Marburg

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 7% CO<sub>2</sub>. Die Zelllinien wurden ein- bis zweimal wöchentlich in R10-Medium bzw. SIT-Medium geteilt und in maximal 20 Passagen umgesetzt. Nur getestete mykoplasmenfreie Zelllinien wurden für die Versuche verwendet.

Zum Teilen der in Suspension wachsenden Zellen wurde das Kulturmedium über den sedimentierten Zellen abgesaugt und anschließend die Zellsuspension auf zwei bis drei Zellkulturflaschen in jeweils 25 ml Medium verteilt. Die adhärent wachsende Zelllinie NCI-H841 wurde vor dem Umsetzen mit 5 ml EDTA abgelöst und 1:4 geteilt.

Die gegen Fenretinid resistenten Züchtungen NCI-H82-HPR und SCLC-24H-HPR wuchsen in R10-Medium mit 4-HPR-Zusatz in einer Endkonzentration von 10 µM. Ausgangszelllinien waren NCI-H82, Passage 101, und SCLC-24H, Passage 39. Das Medium in den 50 ml Kulturflaschen wurde wöchentlich gewechselt, die Teilung erfolgte in Abhängigkeit von der Zelldichte wöchentlich (NCI-H82-HPR) bzw. alle 10-14 Tage (SCLC-24H-HPR). Die Zellen wurden bis zur Passage 11 (NCI-H82-HPR) bzw. Passage 8 (SCLC-24H-HPR) kultiviert, dann bei -80 °C eingefroren und nach dem Auftauen bis zur Passage 18 bzw. 12 weitergeführt.

### 2.2.2 Wachstumsversuche

Um die Wirkung der Retinoide auf die Proliferation der SCLC-Zelllinien zu untersuchen, wurden die Zellen sechs Tage in 24well-Platten unter Zusatz verschiedener Retinoid-Konzentrationen kultiviert. Allen für Versuche verwendeten Kulturflaschen wurde am Vortag frisches Kulturmedium zugesetzt, um die Zellen vergleichbar in ihrer optimalen Wachstumsphase einzusetzen.

Die Zellen wurden zu Versuchsbeginn mit RPMI 1640 gewaschen, gezählt und in 24well-Platten (1ml pro well) in einer Endkonzentration von 5×10<sup>4</sup> Zellen/ml bzw. 10<sup>4</sup> Zellen/ml (NCI-H82) eingesät. Für die Auswertung mit dem MTT-Assay wurden die Zellen in gleicher Dichte in 96well-Platten (100 µl pro well) ausgesät.



Dem Kulturmedium wurden die Retinoide ATRA oder 4-HPR in ansteigenden Konzentrationen von 0,01  $\mu\text{M}$  bis 10  $\mu\text{M}$  zugesetzt. Dazu wurde eine Stammlösung von Fenretinid in einer Konzentration von 10 mM mit reinem Ethanol hergestellt und Aliquote unter Lichtschutz bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die weitere Verdünnung auf 1 mM erfolgte mit Ethanol, danach mit dem jeweiligen Kulturmedium. Die Stammlösung für all-trans-Retinsäure wurde jeweils mit Ethanol in einer Konzentration von 1 mM frisch hergestellt.

Als Kontrolle diente das Kulturmedium mit 1% Ethanol-Zusatz; dies entsprach dem maximalen Ethanolgehalt bei einer Retinoidkonzentration von 10  $\mu\text{M}$ .

### 2.2.3 Zellzahlbestimmung

In einem Proliferationsassay sollte die Wirkung von Fenretinid und all-trans-Retinsäure auf das Wachstum der kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien untersucht werden. Dazu wuchsen die Zellen sechs Tage unter Zusatz der Retinoide, im Anschluß daran wurde die Zellzahl bestimmt.

#### 2.2.3.1 Neubauer-Zählkammer

Zur Einstellung der Zellzahl vor den Versuchen wurde ein Aliquot der Zellsuspension 1:6 mit 0,01% Trypanblau verdünnt und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Trypanblau ist ein Vitalfarbstoff und wird nur von toten Zellen aufgenommen, so daß eine Unterscheidung zwischen toten und vitalen Zellen möglich ist.

#### 2.2.3.2 Coulter Counter

Die Zellzahl aus den Wachstumsversuchen wurde mit einem elektronischen Zellzählgerät (Coulter Counter) ermittelt. Dazu wurde alle Zellen aus einem well in Eppendorfcups überführt, 10 Minuten bei 2000 rpm (400xg) zentrifugiert, das Pellet mit 1 ml RPMI 1640 und 0.075% Trypsin aufgenommen und wieder in die 24well-Platte überführt. Nach 1 Stunde Inkubation bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurde die absolute Zellzahl in einer Verdünnung von 1:100 mit dem Coulter Counter gemessen.

### 2.2.3.3 MTT-Assay

Für einige Zelllinien wurde die Zellzahl mithilfe eines MTT-Assays ermittelt. Am Ende der Inkubationszeit wurde dem Inhalt der Wells (100  $\mu$ l) 10  $\mu$ l 2,5 mg/ml MTT-Reagenz (Thiazolylblau) zugesetzt. Dieses Tetrazoliumsalz reagiert mit der mitochondrialen Dehydrogenase in stoffwechselaktiven Zellen und bildet violette Farbkristalle. Nach einer Reaktionszeit von einer Stunde wurden die Platten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und durch Zugabe von DMSO die Farbkristalle gelöst. Die Messung der Farbintensität erfolgte nach 15 Minuten mit dem Platten-Photometer bei einer Wellenlänge von 560 nm.

### 2.2.4 Wachstumskinetik, Reversibilitätsversuche

Der Einfluß der Retinoide auf das Wachstumsverhalten der Zelllinien sollte in Abhängigkeit von der Zeit untersucht werden. Um außerdem zu ermitteln, ob die Wirkung der Retinoide hinsichtlich der Zellzahl reversibel ist, wurden Zellen mit ATRA und 4-HPR vorbehandelt und anschließend die Wachstumskinetik im drogenfreien Medium bestimmt.

Die Zellen der Linie NCI-H82 wurden in einer 24well-Platte in 5  $\mu$ M 4-HPR, 5  $\mu$ M ATRA oder R10-Medium mit 1% Ethanol in einer Zelldichte von  $10^4$  Zellen/ml eingesät. Zur Ermittlung der Wachstumskinetik wurden die Zellzahlen täglich vom zweiten bis zum sechsten Tag mit dem Coulter Counter gemessen.

Für die Reversibilitätsversuche wurden Kulturflaschen mit den verschiedenen retinoidhaltigen Kulturmedien sowie unbehandelte Kontrollen angelegt. Nach 6 Tagen wurden die Zellen aus diesen Kulturflaschen zweimal mit R10-Medium gewaschen, in reinem R10-Medium in der Ausgangskonzentration von  $10^4$  Zellen/ml aufgenommen und jeweils 1 ml in 24well-Platten ausgesät. Im Anschluß wurden die Zellzahlen vom 2. bis 6. Tag mit dem Coulter Counter bestimmt. Als Parameter wurde die Zellzahlverdopplungszeit (pdt) herangezogen (s. 2.2.8.3.).

## 2.2.5 Apoptosetests

### 2.2.5.1 TUNEL-Assay

Der TUNEL-Assay beruht auf dem Nachweis der DNA-Fragmentierung, wie sie während der Apoptose zu beobachten ist. In einem ersten Schritt wird biotinyliertes d-UTP durch Terminale Transferase an die 3'-OH-Enden der DNA-Fragmente angehängt. Zum Detektieren der Reaktionsprodukte wird Biotin mit Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase markiert und mit DAB als Substrat entwickelt.

Die Zellen wurden 48 Stunden in Kulturflaschen in einer Zelldichte von  $2 \times 10^5$ /ml mit  $5 \mu\text{M}$  4-HPR,  $5 \mu\text{M}$  ATRA oder R10-Medium mit 1% Ethanol inkubiert. Anschließend wurden Cytospin-Präparate mit  $5 \times 10^4$  -  $10^5$  Zellen angefertigt. Die Präparate wurden über Nacht luftgetrocknet und danach 10 Minuten mit kaltem Aceton fixiert. Bis zur Verwendung wurden die Präparate bei  $4^\circ\text{C}$  trocken gelagert. Danach wurde der Test entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Unter dem Phasenkontrastmikroskop wurden die Zellen ausgewertet und mit einem Rasterokular gezählt. Die apoptotischen Zellen wiesen dunkel gefärbte, dicht gepackte Kernfragmente auf. Pro Präparat wurden drei Gesichtsfelder à ca. 1000 Zellen ausgezählt. Die Angabe erfolgte in Prozent der ausgezählten Gesamtzellzahl.

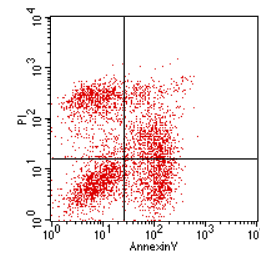
### 2.2.5.2 AnnexinV-Assay

In der Frühphase der Apoptose kommt es zur Translokation von Phosphatidylserin, einem Bestandteil der Zellmembran, von der Innenseite auf die Außenseite der Zellmembran. AnnexinV bindet in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen spezifisch an Phosphatidylserin und kann, z.B. mit FITC markiert, zum Nachweis dieses frühen Apoptosestadiums herangezogen werden. In Verbindung mit Propidiumiod, welches nur die Zellmembran nekrotischer Zellen durchdringt, kann zwischen Apoptose und Nekrose differenziert werden.

Die Zellen wurden gezählt und  $10^6$  Zellen in R10-Medium unter Zugabe von  $10 \mu\text{M}$  4-HPR oder ATRA bzw. 1% Ethanol 24 Stunden kultiviert. Im Anschluß wurden die Zellen 5 Minuten bei 800 rpm ( $200 \times g$ ) zentrifugiert und 5 Minuten in RMPI 1640 mit 0.075% Trypsin vereinzelt. Die Zellzahl wurde nach Zählung in der Neubauer-Zählkammer auf  $10^6$ /ml eingestellt, 0,5 ml entnommen und  $1,25 \mu\text{l}$  AnnexinV-FITC sowie

10 µl Bindungsreagenz zugesetzt. Nach 15 Minuten Reaktionszeit im Dunkeln wurden die Zellen erneut 10 Minuten bei 1500 rpm (400xg) zentrifugiert und mit 10 µl Propidiumiodid und 500 µl Bindungspuffer, der eine ausreichende Ca<sup>2+</sup>-Konzentration gewährleistet, versetzt. Die Messung der markierten Zellen wurde mittels Durchflußzytometrie innerhalb der folgenden halben Stunde durchgeführt. AnnexinV-FITC wurde auf dem FL1-Kanal (FITC-Detektor) bei 518 nm gemessen, das Propidiumiodid-Signal bei 620 nm auf FL2 (Phycoerytrin Fluoreszenz). Auf der x-Achse wurde der Logarithmus des AnnexinV-Signals, auf der y-Achse logarithmisch die Propidiumiodid-Fluoreszenz dargestellt. Für die Quadranten (s. Abb.) ergibt sich somit folgende Einteilung:

Linker unterer Q.:	unmarkierte Zellen
Rechter unterer Q.:	AnnexinV-positive Zellen
Linker oberer Q.:	Propidiumiodid-positive Zellen
Rechter oberer Q.:	Propidiumiodid- und AnnexinV-positive Zellen



### 2.2.6 Western Ligand-Blot

Zur Untersuchung der Sekretion von IGFBP-2 in konditionierte Medien wurde ein Western-Ligand-Blot durchgeführt.

Die Zellen der Linien NCI-H82, NCI-H82-HPR und SCLC-24H wurden fünf Tage in ST-Medium unter Zusatz von 1 µM ATRA oder 10 µM 4-HPR bzw. 1% Ethanol als Kontrolle stimuliert. Nach einer Zellzählung wurden die Proben mit 1500 rpm (400xg) zentrifugiert und die zellfreien Überstände gerntet.

#### 2.2.6.1 Präzipitation der Proteine mit Trichloressigsäure

Zur Ankonzentrierung der Proteine aus den konditionierten Medien wurde eine Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt. 4 ml der eiskalten Überstände wurden mit 2 ml eiskalter 21% TCA versetzt, gemischt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 15 min bei 4000 rpm (3000xg), 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Präzipitate getrocknet. Die Pellets wurden in 50 µl zweifach nicht reduzierendem Probenpuffer aufgenommen und mit 2 µl 3M Tris,

pH 8,5, neutralisiert, zur Denaturierung 2 min gekocht und elektrophoretisch aufgetrennt.

#### 2.2.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine wurden die Mini-Protein-II-Dual-Elektrophorese-Einheiten der Firma Biorad verwendet. Die Zusammensetzung der Trenngele (12%) und Sammelgele (4%) ergibt sich aus der untenstehenden Auflistung. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in SDS-Elektrophoresepuffer bei einer konstanten Spannung von 150 V. Als Größenstandard wurde ein „rainbow marker“ (Amersham) mit Molekulargewichten in den Bereichen 14,3 bis 200 kD verwendet.

	Trenngel [ml]	Sammelgel [ml]
<b>H<sub>2</sub>O dest</b>	3,35	3,05
<b>1,5 M Tris pH 8,8</b>	2,5	-
<b>0,5 M Tris pH 6,8</b>	-	1,25
<b>10% SDS</b>	0,1	0,05
<b>20% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid</b>	4,0	0,65
<b>10% Ammoniumperoxisulfat</b>	0,05	0,025
<b>TEMED</b>	0,005	0,005

#### 2.2.6.3 Blotten der Proteine

Zum Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf eine PVDF-Membran (Amersham) wurde eine Graphit-Elektroblot-Apparatur (Semi-Dry-Blotter Pegasus, Fa. Phase) benutzt. Die Membran mußte zunächst in Methanol aktiviert werden. Filterpapiere, Gel und Membran wurden in den jeweiligen Puffern getränkt und folgendermaßen zusammengesetzt:

Anode ⇒ 3 Filterpapiere in Anode-II-Puffer ⇒ 3 Filterpapiere in Anode-I-Puffer ⇒ Blot-Membran in Anode-I-Puffer ⇒ Proteingel in Kathodenpuffer ⇒ 3 Filterpapiere in Kathodenpuffer ⇒ Kathode

Die einzelnen Schichten wurden luftblasenfrei aufeinandergelegt und bei einer Stromstärke von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  1,5 Stunden geblottet. Die Blotfolien wurden anschließend in TBS-Puffer mit 3% BSA über Nacht geblockt, um unspezifische Bindungen zu vermeiden.

#### 2.2.6.4 Western-Ligand Blot

Die gesättigten Blotfolien wurden mit 20000 cpm [ $^{125}\text{I}$ ]-IGF-I pro ml in 0,05 M Natrium-Phosphat-Puffer auf einem Schüttler fünf Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, danach dreimal mit PBS, einmal mit PBS und 0,05% NP-40 und nochmals mit PBS gewaschen. Die getrockneten Blots wurden 14 Tage bei  $-70^\circ\text{C}$  autoradiographiert.

#### 2.2.7 Reverse Transkriptase-PCR

Um die Expression von IGFBP-2 mRNA der kleinzelligen Bronchialkarzinomlinien in Anwesenheit von Retinoiden zu untersuchen, wurde eine RT-PCR durchgeführt.

Ungefähr  $4 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz wurden 24 Stunden in R10-Medium entweder mit  $10 \mu\text{M}$  4-HPR oder  $1 \mu\text{M}$  ATRA bzw. 1% Ethanol als Kontrolle inkubiert, danach zweimal mit PBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Nicht sofort weiterverarbeitete Proben wurden in Aliquoten zu je  $2 \times 10^6$  Zellen bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Nach Extraktion der RNA wurde diese in einem Kontrollgel elektrophoretisch aufgetrennt, die optische Dichte der RNA photometrisch bestimmt und aus der mRNA im nächsten Schritt cDNA transkribiert. Die so erhaltene cDNA wurde zunächst in einer PCR mit GAPDH-Primern verwendet und die eingesetzten Mengen der cDNA soweit angeglichen, daß vergleichbare Bandenintensitäten nach elektrophoretischer Trennung resultierten. Mit diesen cDNA Mengen wurde dann die PCR auf IGFBP-2 durchgeführt, um eine semiquantitative Aussage über einen Vergleich der densitometrisch bestimmten Bandenintensitäten treffen zu können.

##### 2.2.7.2 RNA-Extraktion aus Zellen

Jeweils  $2 \times 10^6$  Zellen wurden nach einer Zentrifugation in 1 ml RNazol aufgenommen und in sterile Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von  $100 \mu\text{l}$  Chloro-

form wurden die Proben 15 Sekunden gevortext, 5 min auf Eis inkubiert und 15 min bei 13000 rpm (12000xg) und 4 °C zentrifugiert. Es bildeten sich zwei Phasen; von der oberen wässrigen Phase wurden 450 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumenanteil Isopropanol versetzt und 90 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (15 min, 13000 rpm (12000xg), 4 °C) wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit 500 µl eiskaltem Ethanol (70%) aufgenommen und 8 min bei 7000 rpm (4500xg) und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit Zellstoff und an der Luft getrocknet, mit 50 µl H<sub>2</sub>O (Aqua ad injectabilia) aufgenommen und 10 min im Heizblock bei 57 °C gelöst.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte mit einem UV-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Zur Bestimmung des Reinheitsgrades wurde zusätzlich die optische Dichte (OD) bei 280 nm gemessen und der Quotient aus OD 260 nm zu OD 280 nm gebildet. Er sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Bei der Zelllinie NCI-H82 wurden Proben aus drei, bei der Zelllinie SCLC-24H aus zwei unabhängigen Stimulationsansätzen verwendet.

#### 2.2.7.2 cDNA-Synthese (Reverse Transkription)

4 µg RNA wurden mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 10,0 µl eingestellt, mit 1,0 µl Oligo-dT (0,5 µg/µl) versetzt, 10 min bei 70 °C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Danach wurden pro Probe 9 µl des folgenden Reagenziengemisches zugegeben:

5 x first strand buffer [4,0 µl]

DTT 0,1 M [2 µl]

dNTPs 10 mM [1 µl]

RNAse Inhibitor [1 µl]

Superscript Reverse Transcriptase [1 µl]

Dieser Ansatz wurde 2 h bei 41 °C inkubiert, danach die Reverse Transkriptase 10 min bei 95 °C inaktiviert und die cDNA mit 40 µl H<sub>2</sub>O ergänzt. Die Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt. Die cDNA-Synthese wurde zweimal mit Aliquoten der RNA-Proben durchgeführt.

## 2.2.7.3 PCR

Zunächst wurde eine PCR mit GAPDH-Primern durchgeführt. Pro Ansatz mit 1  $\mu$ l cDNA wurden 99  $\mu$ l des folgenden Reaktionsmixes verwendet:

- 10 x PCR-Puffer [10  $\mu$ l]
- dNTP 10 mM [2,0  $\mu$ l]
- H<sub>2</sub>O [84,5  $\mu$ l]
- 5'-Primer 50 pmol/ $\mu$ l [1,0  $\mu$ l]
- 3'-Primer 50 pmol/ $\mu$ l [1,0  $\mu$ l]
- Taq-Polymerase 5U/ $\mu$ l [0,5  $\mu$ l]

PCR-Bedingungen GAPDH (22 Zyklen):

	Temperatur	Erster Zyklus, Dauer in Minuten	Folgende Zyklen, Dauer in Minuten
Denaturierung	94 °C	03:00	00:45
Annealing	60 °C	01:00	01:00
Elongation	74 °C	01:00	01:00

Die eingesetzte cDNA-Menge wurde solange variiert, bis die densitometrische Bandenintensität der GAPDH-Produkte im Gel vergleichbar war. Mit dieser cDNA-Menge wurde die IGFBP-2-PCR durchgeführt. Hierfür wurde der gleiche Reaktionsmix eingesetzt, jedoch mit den entsprechenden BP-2 Primer in der Konzentration 50 pmol/ $\mu$ l [1,0  $\mu$ l]; das Gesamtvolumen der PCR lag bei 100  $\mu$ l.

PCR-Bedingungen IGFBP-2 (35 Zyklen):

	Temperatur	Erster Zyklus, Dauer in Minuten	Folgende Zyklen, Dauer in Minuten
Denaturierung	94 °C	03:00	00:45
Annealing	58 °C	01:00	01:00
Elongation	74 °C	01:00	01:00

## 2.2.7.4 Elektrophoretische Trennung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem 1,5% Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetrennt. Dazu wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 1xTAE-Puffer gelöst und 4  $\mu$ l Ethidiumbromid zugegeben. 15  $\mu$ l der Proben wurden mit 3  $\mu$ l Ladepuffer versetzt, aufgetragen und bei 120 V getrennt. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde ein DNA-Größenmarker eingesetzt.



## 2.2.8 Auswertung der Daten

### 2.2.8.1 Wachstumsversuche

Die Messung der Zellzahl erfolgte in Vierfachbestimmung, im MTT-Assay in Achtfachbestimmung. Aus diesen Daten wurde Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient berechnet. Ergebnisse, deren Variationskoeffizient oberhalb 20% lag, wurden nicht verwertet. Die Zellzahl der behandelten Proben wurde in der Regel in Prozent zur Zellzahl der Kontrolle angegeben. Die Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und ein repräsentatives Ergebnis ausgewählt.

Die Daten aus den Proliferationsversuchen wurden auf Normalverteilung (Programm SPSS, Vers. 8.0) untersucht und mit einem zweiseitigen Student's t-Test auf Verschiedenheit der Mittelwerte mit einem Signifikanzniveau von  $p=0,05$  getestet.

### 2.2.8.2 Synergistische Wirkung der beiden Retinoide

Zur Unterscheidung zwischen synergistischen, additiven oder antagonistischen Effekten zweier Drogen kann der Kombinationsindex (CI) herangezogen werden (CHOU 1994, SACKS 1995), der sich nach folgender Gleichung berechnet:

$$CI = D_1/D_{x1} + D_2/D_{x2} + (\alpha \cdot D_1 \cdot D_2) / (D_{x1} \cdot D_{x2})$$

mit CI = Kombinationsindex;  $D_{x1}$  = Dosis von Substanz 1, die eine gegebene Inhibition von x als Einzelsubstanz hervorruft;  $D_1$  = Dosis von Substanz 1, die eine gegebene Inhibition von x in Kombination mit Substanz 2 hervorruft;  $D_2$  und  $D_{x2}$  entsprechend für Substanz 2.

Der Term  $\alpha$  ist gleich Null, wenn der Wirkungsmechanismus der Substanzen gleich ist,  $\alpha = 1$  bei unterschiedlichem Wirkungsmechanismus. Ist CI kleiner als 1, liegt ein synergistischer Effekt zugrunde, bei CI = 1 ein additiver, bei CI > 1 ein antagonistischer Effekt.

Die Werte für  $D_{x1}$  und  $D_{x2}$  wurden mittels linearer Regressionsanalyse (SigmaPlot, Vers. 4.0, Jandel Scientific) aus einem ‚median effect plot‘ ermittelt, dessen Daten aus Dosis-Wirkungs-Kurven für die Einzelsubstanzen stammten. Die ‚median effect‘-Gleichung:

$$fa/fu = (D/Dm)^m$$

mit  $f_a$ : Inhibitionsfraktion;  $f_u$ : Überlebensfraktion;  $D$ : Dosis,  $D_m$ : Dosis für Inhibitionsfraktion von 0,5;  $m$ : Sigmoidizitätskoeffizient der Dosis-Wirkungs-Kurve

läßt sich umformulieren zu  $D = D_m \cdot [f_a/f_u]^{1/m}$  und logarithmisch als ‚median effect-plot‘ darstellen mit  $\log [f_a/f_u]$  gegen  $\log D$ .

### 2.2.8.3 Berechnung der Zellzahlverdopplungszeit $pdt$

Die Zellzahlverdopplungszeit ( $pdt$ ) wurde zwischen dem zweiten und vierten Tag, der Phase des exponentiellen Wachstums, wie folgt berechnet (s. auch BEPLER 1987b):

$$pdt = 48 \text{ h} \times \log 2 / \{ \log (\text{Zellzahl 4. Tag}) - \log (\text{Zellzahl 2. Tag}) \}$$

Trägt man die Dosis-Wirkungs-Kurve halblogarithmisch auf, entspricht dies der Steigung der Geraden.

### 2.2.8.4 Densitometrische Bestimmung der Bandenintensität

Die densitometrischen Berechnungen und graphische Bearbeitung der Gele wurden mit den Programmen GelScan 3D und GelScript (BioSciTec, Science Group, Marburg) durchgeführt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Vergleich der Zellzahlbestimmungsmethoden

Die in den obigen Versuchen eingesetzte elektronische Zellzählungsmethode mit einem Coulter Counter sollte dahingehend überprüft werden, ob apoptotische, also sehr kleine dichte Zellen, miterfaßt werden und inwiefern dadurch die verwendete Zellzahlbestimmungsmethode den Wirkungsvergleich zwischen den beiden Retinoiden all-trans-Retinsäure und Fenretinid beeinflusst. Zum Vergleich wurde die Zellzählung mittels Neubauer-Zählkammer bzw. MTT-Assays herangezogen.

#### 3.1.1 Coulter Counter versus Neubauer-Zählkammer

Die im Coulter Counter gemessene Zellzahl wurde auf zwei verschiedenen Wegen mit der durch die Auszählung von Trypanblau-gefärbten Zellen in der Neubauer-Zählkammer erhaltenen verglichen.

Im ersten Ansatz wurden Zellen der Zelllinien NCI-H82 und SCLC-24H nach 48 Stunden Wachstum in R10-Medium oder 5 µM Fenretinid mit Trypanblau gefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Dabei wurde zwischen vitalen und nicht-vitalen unterschieden, die Gesamtzellzahl danach einheitlich auf  $10^6$  Zellen/ml einschließlich nicht-vitaler Zellen eingestellt. Anschließend wurde dieser Ansatz mit einem Coulter-Counter gemessen. Das Ergebnis zeigt Tabelle 3.1.

Obwohl sich der Anteil der vitalen Zellen in den Kontrollen und den behandelten Proben deutlich voneinander unterscheidet, wird im Coulter Counter in allen Fällen die gleiche Zellzahl gemessen; die nicht-vitalen kleineren Zellen werden somit vom Coulter Counter erfaßt.

Zelllinie	Ansatz	Zellzählung mit Neubauer-Zählkammer	Zellzählung mit Coulter Counter
NCI-H82	R10-Medium	95% vitale Zellen 5% nicht-vitale Zellen	10 <sup>6</sup> Zellen/ml
	4-HPR	13% vitale Zellen 87% nicht-vitale Zellen	10 <sup>6</sup> Zellen/ml
SCLC-24H	R10-Medium	78% vitale Zellen 22% nicht-vitale Zellen	10 <sup>6</sup> Zellen/ml
	4-HPR	45% vitale Zellen 55% nicht-vitale Zellen	10 <sup>6</sup> Zellen/ml

**Tab. 3.1** Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer oder mit einem Coulter Counter. Die unbehandelten oder 48 Stunden mit 5 µM 4-HPR behandelten Zellen zweier Zelllinien wurden mit Trypanblau gefärbt und in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt; die Zellzahl wurde dann in allen Ansätzen auf 10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt und im Coulter Counter gemessen.

In einem zweiten Versuch wurde ein Proliferationsassay der Zelllinie SCLC-24H nach sechs Tagen mit einem Coulter Counter ausgewertet und parallel dazu die Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

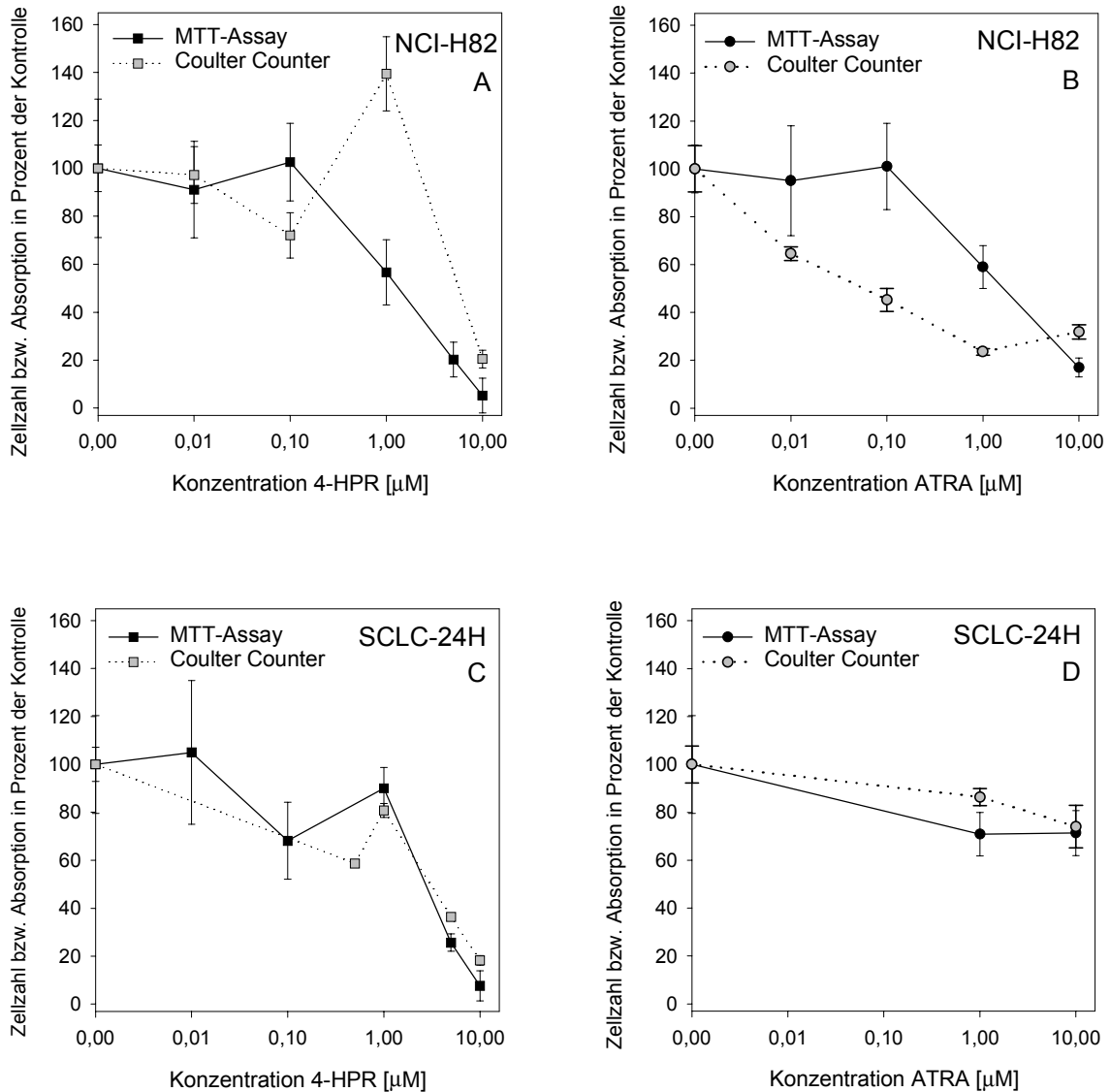
Nach Zellzählung mit einem Coulter Counter ergibt sich für die Konzentration von 5 µM Fenretinid eine Zellzahl von 50% der Kontrolle. Das gleiche Ergebnis erhält man bei Auszählung aller Zellen in der Neubauer-Zählkammer. Werden jedoch nur die vitalen Zellen aufeinander bezogen, beträgt die Zellzahl in der 4-HPR-Probe 22% der Kontrolle.

### 3.1.2 Coulter Counter versus MTT-Assay

Bei zwei Zelllinien, NCI-H82 und SCLC-24H, wurde ein MTT-Assay wie in 2.2.3.3 beschrieben durchgeführt. Im MTT-Assay wird der Farbstoff nur von stoffwechselaktiven Zellen umgesetzt, bei der Zellzählung werden also apoptotische Zellen vermindert erfaßt. In Abbildung 3.1.a-d sind die Ergebnisse aus dem MTT-Assay mit Zellzahlbestimmungen mittels Coulter Counter verglichen worden.

Die Zellzahlreduktion durch maximale Fenretinidkonzentrationen (10 µM und 5 µM) ist im MTT-Assay etwas deutlicher zu sehen als im jeweiligen Vergleichsversuch (Abb. 3.1.a und c), in den niedrigeren Konzentrationen gleichen sich die Ergebnisse an. Allerdings tritt bei der Zelllinie NCI-H82 im MTT-Assay keine Wachstumstimulation bei 1 µM 4-HPR auf. Das Ausmaß der Wirkung von ATRA auf die Zelllinie SCLC-24H

ist mit beiden Zellzählungsmethoden vergleichbar (Abb. 3.1.d), während die Zelllinie NCI-H82 mit dem MTT-Assay gemessen eine schwächere Hemmung in niedrigen Konzentrationen aufweist.

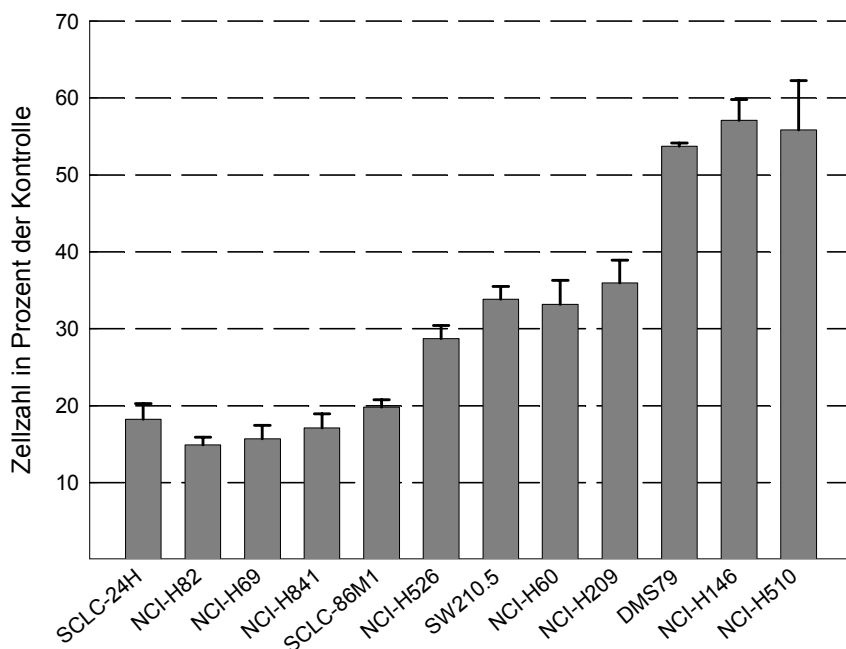


**Abb. 3.1** Proliferation zweier Zelllinien, NCI-H82 und SCLC-24H, unter verschiedenen Konzentrationen von Fenretinid oder all-trans-Retinsäure. Die Zellzahl wurde nach sechs Tagen entweder mit einem Coulter Counter oder mittels MTT-Assay bestimmt und prozentual zur Zellzahl bzw. zur Absorption der Kontrolle angegeben. Die Versuche wurden jeweils dreimal durchgeführt, dargestellt sind die Mittelwerte aus 4 (Coulter Counter) bzw. 8 (MTT) Parallelen und deren Standardabweichungen. **A** NCI-H82 mit Fenretinid. **B** NCI-H82 mit ATRA. **C** SCLC-24H mit Fenretinid. **D** SCLC-24H mit ATRA.

## 3.2 Proliferation von SCLC-Zelllinien unter Retinoiden

### 3.2.1 Einfluß von Fenretinid auf das Zellwachstum

Um das Wachstumsverhalten kleinzelliger Bronchialkarzinom-Zelllinien in Anwesenheit von Fenretinid zu untersuchen, wurden zwölf SCLC-Zelllinien sechs Tage in R10-Medium mit ansteigenden Konzentrationen 4-HPR inkubiert; anschließend wurde die Zellzahl mit einem Coulter Counter bestimmt.



**Abb. 3.2** Proliferation von zwölf SCLC-Zelllinien in R10-Medium unter dem Einfluß von 10 µM Fenretinid. Die Zellzahl wurde nach sechs Tagen mit einem Coulter Counter bestimmt. Die Angabe erfolgte in Prozent zur Kontrolle (R10-Medium plus 1% Ethanol), dargestellt wurden die Mittelwerte aus vier Versuchsp parallelen mit der Standardabweichung. Aus drei unabhängigen Versuchen wurde ein repräsentativer Versuch ausgewählt.

Die Abbildung 3.2 gibt im Überblick die Zellzahl unter der maximal eingesetzten Fenretinidkonzentration von 10 µM, bezogen auf die Kontrolle, wieder. In allen untersuchten Zelllinien ist eine Hemmung der Proliferation zu beobachten. Insbesondere Zelllinien mit einer niedrigen Zellzahlverdopplungszeit, also die varianten und transienten Zelllinien SCLC-24H, NCI-H82, NCI-H841, SCLC-86M1, werden in ihrem Wachstum durch 4-HPR bis auf unter 20% der Kontrolle gehemmt.

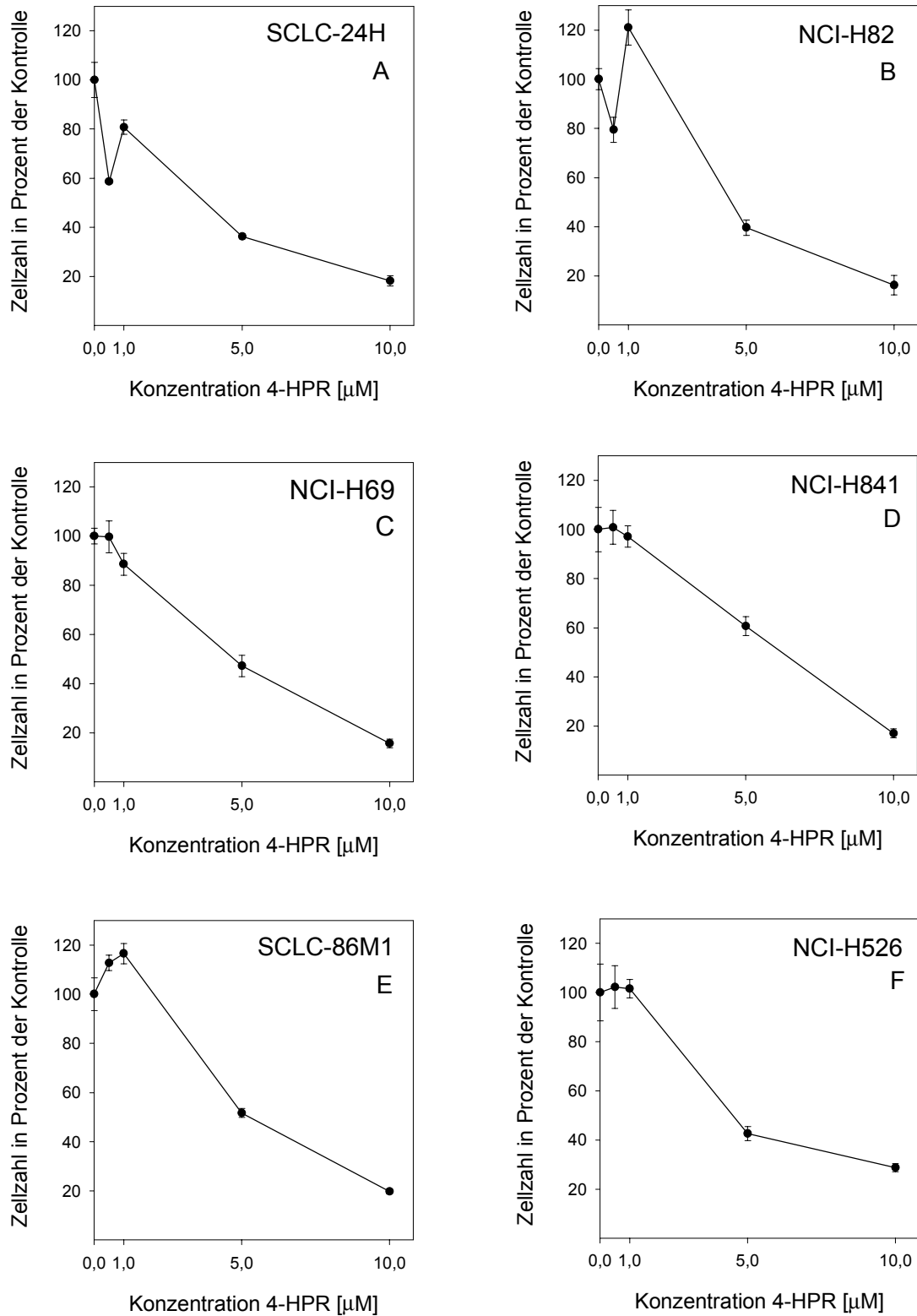
In Tabelle 3.2 sind die Konzentrationen für eine fünfzigprozentige Inhibition (IC<sub>50</sub>) aufgeführt. Die Berechnung erfolgte in Annäherung mittels linearer Regression (Regressionskoeffizient  $r > 0,85$ ) aus den Dosis-Wirkungs-Kurven der einzelnen Zelllinien (Abb. 3.3). Die Zelllinien NCI-H146, NCI-H510 und DMS79 erreichen im eingesetzten Konzentrationsbereich von maximal 10  $\mu\text{M}$  4-HPR keine Inhibition von 50%, während sich für die empfindlichsten Zelllinien SCLC-24H, NCI-H82 und NCI-H69 ein IC<sub>50</sub> von 4,5 bis 5,5  $\mu\text{M}$  ergibt.

Zelllinie	Zelliniensubtyp	IC <sub>50</sub> in $\mu\text{M}$
SCLC-24H	transient	4,5
NCI-H82	variant	5,5
NCI-H69	klassisch	5,5
NCI-H841	variant	6,0
SCLC-86M1	transient	6,5
NCI-H526	variant	6,5
SW210.5	klassisch	7,5
NCI-H60	klassisch	7,5
NCI-H209	klassisch	7,5
DMS79	variant	> 10,0
NCI-H146	klassisch	> 10,0
NCI-H510	klassisch	> 10,0

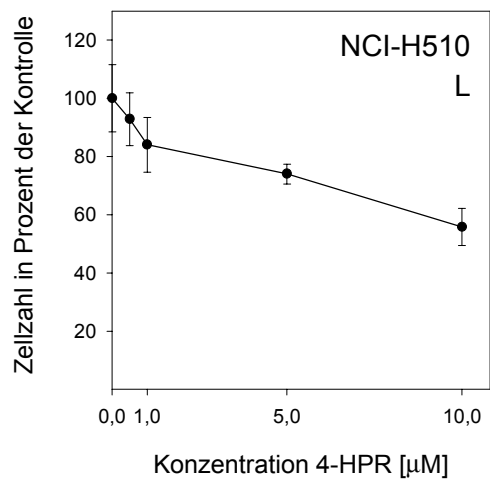
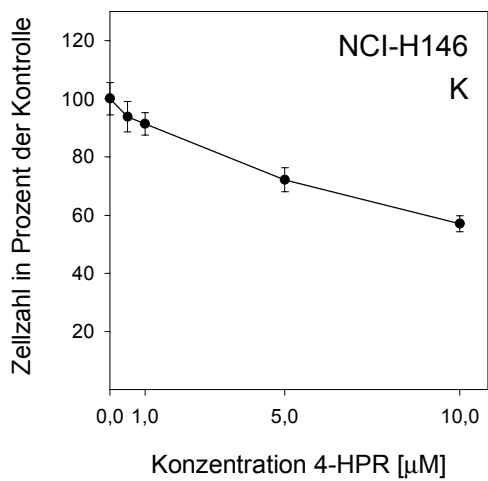
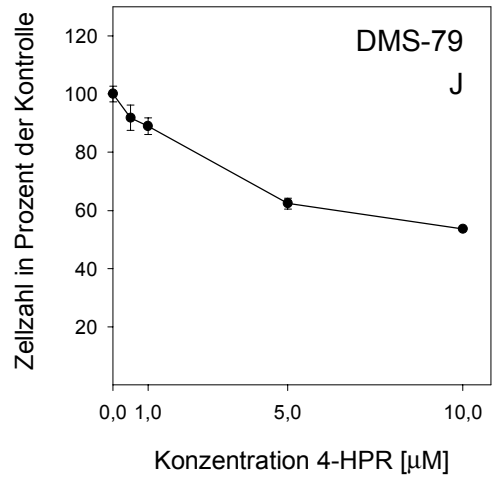
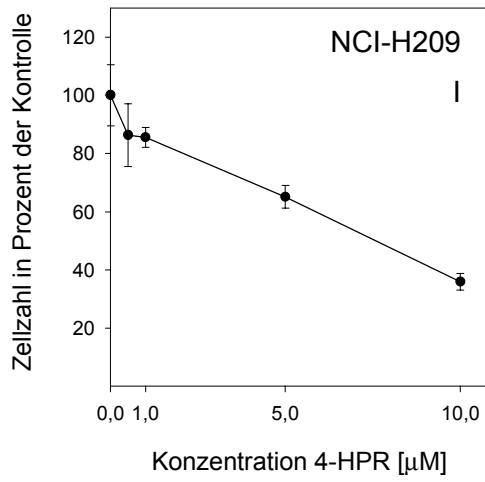
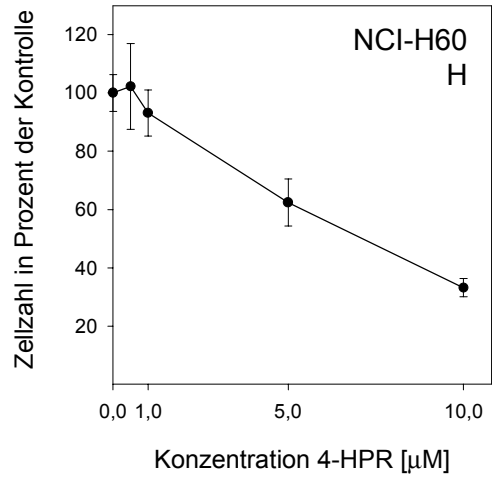
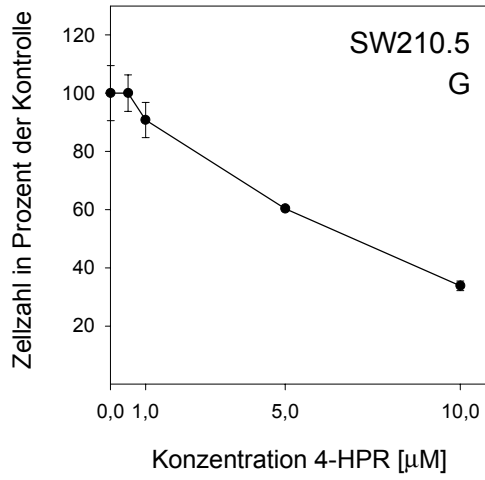
**Tab. 3.2** Zelliniensubtypen und IC<sub>50</sub> der untersuchten SCLC-Zelllinien. Der IC<sub>50</sub> wurde mittels linearer Regressionsanalyse aus den Dosis-Wirkungs-Kurven errechnet ( $r > 0,85$ ).

Die Wachstumshemmung der einzelnen Zelllinien ist konzentrationsabhängig im eingesetzten Konzentrationsbereich von 0,5  $\mu\text{M}$ , 1,0  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Fenretinid (Abb. 3.3). Allerdings zeigen die Zelllinien NCI-H82 und SCLC-24H auch eine signifikante Stimulation bzw. einen Wiederanstieg der Zellzahl bei 1  $\mu\text{M}$  4-HPR.

**Abb. 3.3.A-L** Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung von zwölf SCLC-Zelllinien in R10-Medium unter Fenretinid in den Konzentrationen 0,5  $\mu\text{M}$ , 1,0  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ . Die Zellzahl wurde nach sechs Tagen mit einem Coulter Counter bestimmt. Die Angabe erfolgt in Prozent bezogen auf die Kontrolle (R10-Medium plus 1% Ethanol), dargestellt werden die Mittelwerte aus vier Parallelen mit der Standardabweichung. Aus drei unabhängigen Versuchen wurde ein repräsentativer Versuch ausgewählt.



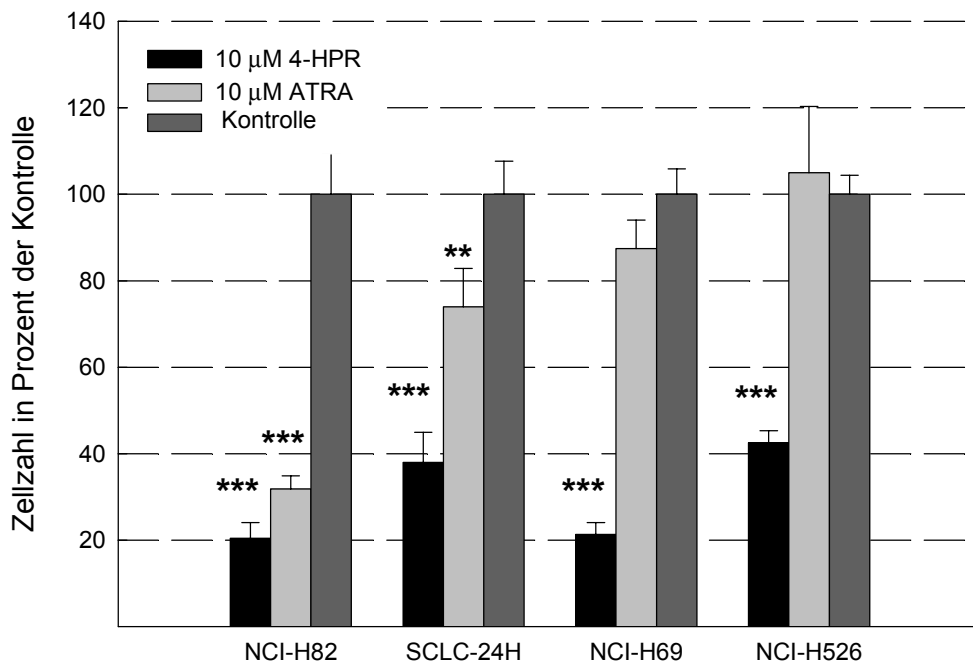




### 3.2.2 Vergleich der Wirkung von Fenretinid mit all-trans-Retinsäure

Vier der zwölf Zelllinien sollten auf eine Wachstumshemmung durch all-trans-Retinsäure getestet werden, um deren Wirksamkeit mit Fenretinid zu vergleichen. Dazu wurden die Zelllinien NCI-H82, SCLC-24H, NCI-H69 und NCI-H526, die alle sehr empfindlich auf 4-HPR reagieren, sechs Tage lang entweder mit ATRA oder 4-HPR in steigenden Konzentrationen inkubiert und im Anschluß die Zellzahl bestimmt.

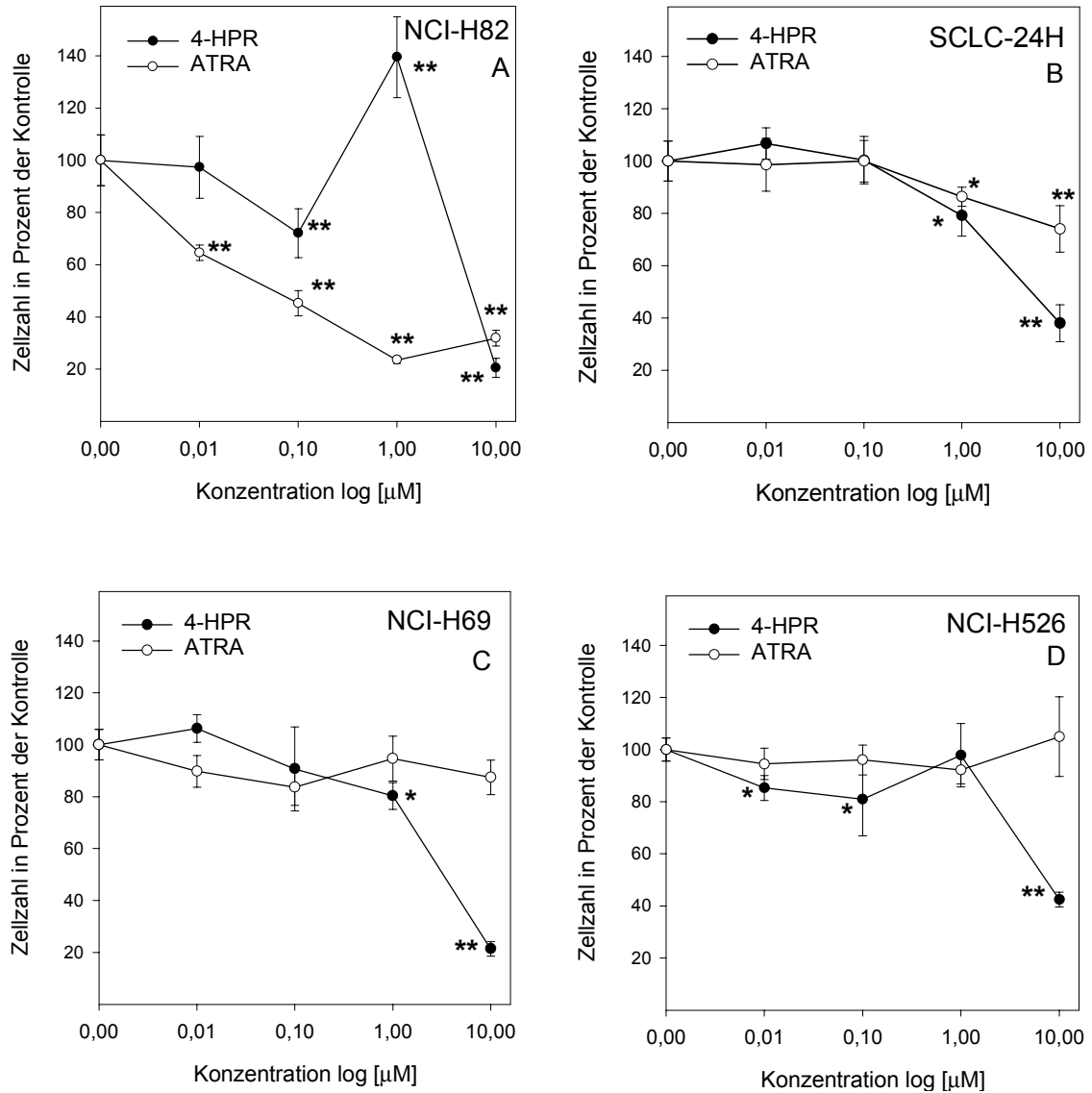
Die Abbildung 3.4 zeigt im Vergleich die Überlebensfraktion unter der jeweiligen Maximalkonzentration 10  $\mu\text{M}$  ATRA oder 10  $\mu\text{M}$  4-HPR. Lediglich die Zelllinie NCI-H82 weist eine ähnlich gute Hemmung durch all-trans-Retinsäure wie durch Fenretinid auf, während die Zelllinien SCLC-24H schwach ( $p < 0,01$ ), NCI-H69 und NCI-H526 nicht signifikant durch ATRA gehemmt werden (Abb. 3.5).



**Abb. 3.4** Wachstum von vier SCLC-Zelllinien unter dem Einfluß von 10  $\mu\text{M}$  4-HPR bzw. 10  $\mu\text{M}$  ATRA. Als Kontrolle diente R10-Medium mit 1% Ethanol. Nach sechs Tagen wurde die Zellzahl mit einem Coulter Counter gemessen. Die Angabe der Mittelwerte erfolgt prozentual zur Kontrolle, die Balken stellen die Standardabweichung aus vier Parallelen dar (\*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ ). Jeder Versuch wurde dreimal unabhängig durchgeführt und ein repräsentatives Beispiel ausgewählt.

Die Überlebensfraktion der Zelllinie NCI-H82 (Abb. 3.5.a) beträgt bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  ATRA 32%, unter 10  $\mu\text{M}$  4-HPR 20%. Bereits ab einer

Konzentration von 0,01  $\mu\text{M}$  ATRA sinkt die Zellzahl auf 65%, während mit Fenretinid eine Hemmung erst bei 0,1  $\mu\text{M}$  auftritt ( $p < 0,01$ ). Zudem ist ein Anstieg der Zellzahl auf 140% bei 1  $\mu\text{M}$  4-HPR zu sehen.



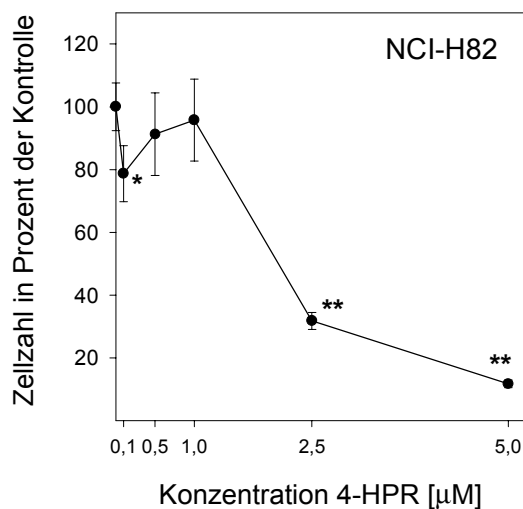
**Abb. 3.5.A-D** Wachstum von vier SCLC-Zelllinien unter dem Einfluß von 4-HPR bzw. ATRA in den Konzentrationen 0,01, 0,1, 1 oder 10  $\mu\text{M}$  (logarithmische Auftragung). Als Kontrolle diente R10-Medium mit 1% Ethanol. Nach sechs Tagen wurde die Zellzahl mit einem Coulter Counter gemessen. Die Angabe der Mittelwerte erfolgt prozentual zur Kontrolle, die Balken stellen die Standardabweichung aus vier Parallelen dar (\*:  $p < 0,025$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ). Jeder Versuch wurde dreimal unabhängig durchgeführt und ein repräsentatives Beispiel ausgewählt.

Eine schwache, aber signifikante Hemmung auf 86% bzw. 74% tritt bei der Zelllinie SCLC-24H unter 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  ATRA auf ( $p < 0,025$  bzw.  $p < 0,01$ ) (Abb. 3.5.b),

unter 10  $\mu\text{M}$  4-HPR beträgt die Zellzahl jedoch 38% der Kontrolle. Weder bei der Zelllinie NCI-H69 (Abb. 3.5.c) noch bei NCI-H526 (Abb. 3.5.d) ist eine signifikante Wirkung von all-trans-Retinsäure zu beobachten, während sich unter 10  $\mu\text{M}$  4-HPR die Zellzahl der Zelllinie NCI-H526 auf 43%, die der Zelllinie NCI-H69 auf 21% reduziert.

### 3.2.3 Wachstumstimulierende Wirkung von Fenretinid

In der Zelllinie NCI-H82 und teilweise auch in der Zelllinie SCLC-24H tritt bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  4-HPR eine Stimulation des Zellwachstums auf, während gleichzeitig eine Wachstumshemmung bei niedrigeren und höheren Konzentrationen zu beobachten ist (Abb. 3.3.a und b, Abb. 3.5.a). Daher wurde die Wirkung von 4-HPR auf die Zellzahl im Konzentrationsbereich von 0,1  $\mu\text{M}$  bis 5  $\mu\text{M}$  anhand der Zelllinie NCI-H82 untersucht. Die Zellzahl wurde nach sechs Tagen mit einem Coulter Counter ermittelt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.6 dargestellt und zeigt eine signifikante Hemmung unter 0,1  $\mu\text{M}$  4-HPR auf 78% ( $p < 0,025$ ) und ein Ansteigen der Zellzahl unter 0,5  $\mu\text{M}$  und 1,0  $\mu\text{M}$  auf nahezu 100% (nicht signifikant). Bei 2,5  $\mu\text{M}$  4-HPR fällt die Zellzahl auf 32% der Kontrolle ab.



**Abb. 3.6** Proliferation von NCI-H82 unter steigenden Konzentrationen von Fenretinid (0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$ ). Als Kontrolle diente R10-Medium mit 1% Ethanol-Zusatz. Die Zellzahlmessung erfolgte am sechsten Tag mit einem Coulter Counter. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier Parallelen mit den jeweiligen Standardabweichungen, berechnet in Prozent zur Kontrolle (\*:  $p < 0,025$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ). Der Versuch wurde dreimal unabhängig durchgeführt, abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis.

### 3.2.4 Abhängigkeit der Hemmung von der Zellzahl

Um einen Einfluß der Ausgangszellzahl auf die Wirkung von Fenretinid zu untersuchen, wurden Zellen der Zelllinie NCI-H82 in drei verschiedenen Zelldichten,  $5 \times 10^3$  Zellen/ml,  $10^4$  Zellen/ml und  $5 \times 10^4$  Zellen/ml, ausgesät. Die Zellen wuchsen sechs Tage in  $5 \mu\text{M}$  4-HPR bzw. R10-Medium und wurden danach mit einem Coulter Counter gezählt.

Es kann keine direkte Beziehung zwischen der Ausgangszellzahl und dem Ausmaß der Hemmung gefunden werden, die Ergebnisse sind daher nicht im einzelnen wiedergegeben. Die Zellzahl in den Kontrollen liegt nach sechs Tagen in vergleichbaren Größenordnungen, unabhängig von den Anfangsbedingungen.

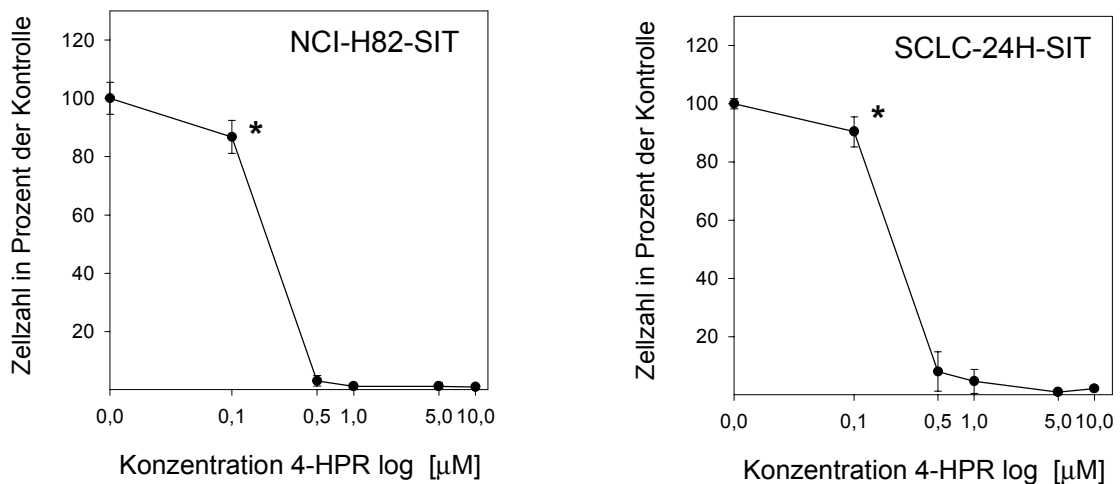
## 3.3 Wirkung der Retinoide in serumfreiem Medium

### 3.3.1 Wachstum der serumfreien Zelllinien NCI-H82-SIT und SCLC-24H-SIT unter Fenretinid

Um zu untersuchen, ob die Anwesenheit von Serum einen Einfluß auf die Wirkung von Fenretinid hat, wurden Wachstumsversuche in serumfreiem Medium durchgeführt. Von zwei Zelllinien (SCLC-24H und NCI-H82) existieren zwei Sublinien, die an diesem Institut in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Jaques über 20 Passagen an serumfreies SIT-Medium adaptiert wurden. Die Sublinien zeigen in der Zellkultur in serumfreiem Medium ein den Mutterlinien vergleichbares Wachstumsverhalten.

Diese beiden Zelllinien SCLC-24H-SIT und NCI-H82-SIT wuchsen sechs Tage in SIT-Medium mit Fenretinid-Zusatz zwischen  $0,1 \mu\text{M}$  und  $10 \mu\text{M}$ . Die Abb. 3.7 zeigt die prozentuale Zellzahl, gemessen mit einem Coulter Counter. Zur besseren Übersicht ist die Konzentration von 4-HPR logarithmisch abgetragen.

Bereits bei  $0,5 \mu\text{M}$  4-HPR sind in beiden Zelllinien fast keine vitalen Zellen mehr vorhanden, während unter  $0,1 \mu\text{M}$  Fenretinid nur eine schwache Hemmung auf ca. 90% der Kontrollzellzahl ( $p < 0,025$ ) feststellbar ist.

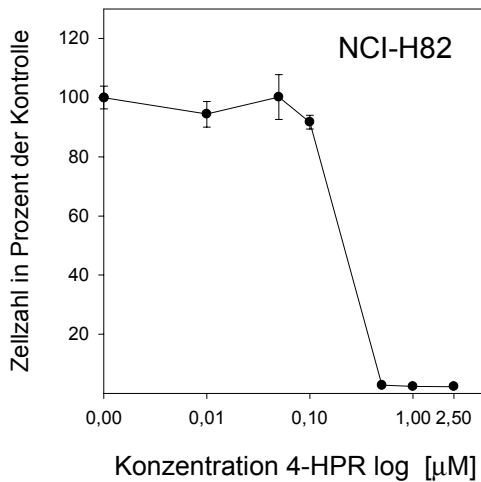


**Abb. 3.7** Wachstum von NCI-H82-SIT und SCLC-24H-SIT unter steigenden Konzentrationen von 4-HPR (0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M) in serumfreiem SIT-Medium. Die Zellzahl wurde nach sechs Tagen mit einem Coulter Counter gezählt und prozentual zur Kontrolle (SIT-Medium mit 1% Ethanol) angegeben. Die Konzentrationsangaben erfolgten logarithmisch. Der Versuch wurde dreimal unabhängig durchgeführt und ein repräsentatives Ergebnis ausgewählt (\*:  $p < 0,025$ ).

### 3.3.2 Wachstum der Zelllinie NCI-H82 in serumfreien Medium

Aufgrund der deutlich besseren Hemmwirkung von Fenretinid auf die Sublinien NCI-H82-SIT und SCLC-24H-SIT in serumfreiem Medium (s. 3.3.1.) sollte getestet werden, ob auch bei der Ausgangslinie NCI-H82 eine serumabhängige Wirkung zu beobachten ist.

Die Mutterlinie NCI-H82 wurde nach zweimaligem Waschen mit RPMI 1640 in SIT-Medium ausgesät und die Zellzahl nach sechs Tagen bestimmt. Der bisher eingesetzte Konzentrationsbereich von 4-HPR wurde verändert auf 0,01  $\mu$ M bis 2,5  $\mu$ M, um den Bereich des Wirkungseintrittes genauer zu untersuchen. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.8.



**Abb. 3.8** Wachstum von NCI-H82 unter steigenden Konzentrationen von 4-HPR (0,01 µM, 0,05 µM, 0,1 µM, 0,5 µM, 1 µM und 2,5 µM) in serumfreiem SIT-Medium. Die Zellen wurde nach sechs Tagen mit einem Coulter Counter gezählt und prozentual zur Kontrolle (SIT-Medium mit 1% Ethanol) angegeben. Die Konzentrationsangaben erfolgten logarithmisch. Der Versuch wurde dreimal unabhängig durchgeführt und ein repräsentatives Ergebnis ausgewählt.

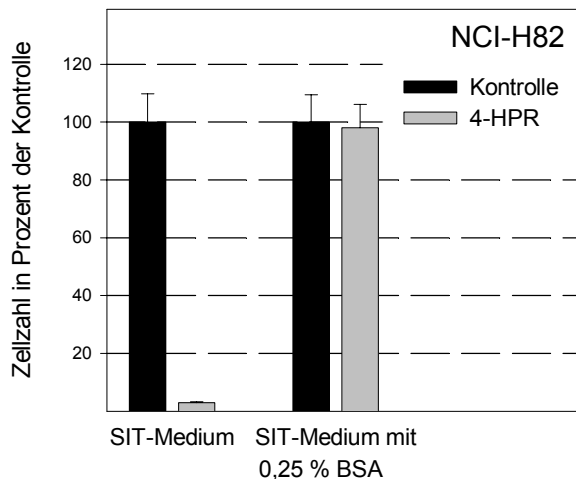
Ab einer Konzentration von 0,5 µM Fenretinid ist eine sehr starke Hemmung des Zellwachstums auf 3% der Kontrollzellzahl zu sehen, während bei einer Konzentration von 0,1 µM keine signifikante Hemmung auftritt.

### 3.3.3 Abhängigkeit der Retinoidwirkung von Serumalbumin

Um das unterschiedliche Ausmaß der Wachstumshemmung durch Fenretinid in serumhaltigem oder serumfreiem Medium weiter zu untersuchen, wurde SIT-Medium Rinder-Serumalbumin in der Konzentration 0,25% zugesetzt und das Wachstumsverhalten der Zelllinie NCI-H82 in SIT-Medium mit und ohne Zusatz von Rinder-Serumalbumin untersucht. Die gewählte Konzentration des Serumalbumins entspricht etwa dem Gehalt in 10prozentigem FCS mit einem Proteingehalt von 3-4% und ungefähr 60% Albuminfraktion.

#### 3.3.3.1 Fenretinidwirkung

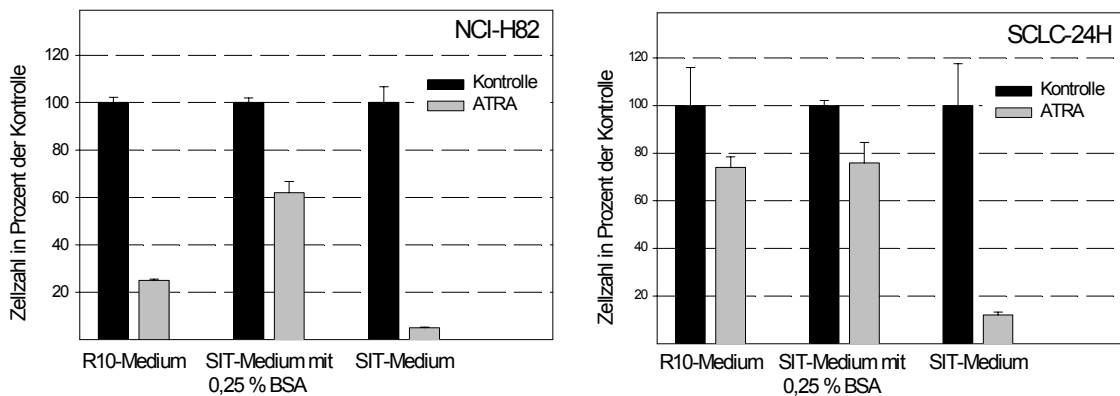
Die Zelllinie NCI-H82 reagiert unter 2,5 µM 4-HPR auf den Zusatz von Serumalbumin mit einem ausgeprägten Rückgang der Wachstumshemmung (Abb. 3.9). Während im SIT-Medium nach sechs Tagen nur noch 3% der Kontrollzellzahl zu finden sind, ist in dem Ansatz mit Serumalbumin keine Hemmung durch Fenretinid zu sehen.



**Abb. 3.9** Abhängigkeit der Wirkung Fenretinids von Serumalbumin. Die Zelllinie NCI-H82 wurde sechs Tage  $2,5 \mu\text{M}$  4-HPR in SIT-Medium mit oder ohne Zusatz von 0,25% Rinder-Serumalbumin (BSA) exponiert. Der Kontrolle wurde 1% Ethanol zugesetzt. Die Zellzahl wurde mit einem Coulter Counter ermittelt und in Prozent, bezogen auf die Kontrollzellzahl, errechnet. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen eines repräsentativen Versuches.

### 3.3.3.2 All-trans-Retinsäure-Wirkung

Die Zelllinie SCLC-24H reagiert in SIT-Medium nach Zugabe von  $10 \mu\text{M}$  all-trans-Retinsäure mit einem Rückgang der Zellzahl auf 12% der Kontrolle, in R10-Medium nur auf 74% der Kontrolle (Abb. 3.10). In Anwesenheit von Serumalbumin entspricht die Hemmwirkung derjenigen in R10-Medium.



**Abb. 3.10** Einfluß von  $10 \mu\text{M}$  all-trans-Retinsäure auf die Zellzahl von SCLC-24H und NCI-H82 in verschiedenen Medien. Die Zellen wuchsen sechs Tage in serumhaltigen R10-Medium, serumfreien SIT-Medium oder SIT-Medium mit 0,25% Serumalbumin (BSA) unter Zusatz von  $10 \mu\text{M}$  ATRA oder 1% Ethanol als Kontrolle. Die Zellzahl wurde mit einem Coulter Counter bestimmt. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt und ein repräsentatives Ergebnis abgebildet. Der Mittelwert errechnet sich aus vier Parallelen, die Balken stellen die Standardabweichung dar.

Auch bei der Zelllinie NCI-H82 ist eine signifikant stärkere Hemmung unter  $10 \mu\text{M}$  ATRA in serumfreiem Medium zu beobachten (5%) als in serumhaltigen Medium mit



25% der Kontrollzellzahl (Abb. 3.10). Wachsen die Zellen in SIT-Medium mit Zusatz von Serumalbumin, beträgt die Zellzahl nach sechs Tagen noch 62% der Kontrolle. Die Hemmung liegt somit unter der Inhibition in serumhaltigen Medium.

### 3.3.4 *Einfluß von dialysierten oder gestrippten Medien auf das Zellwachstum*

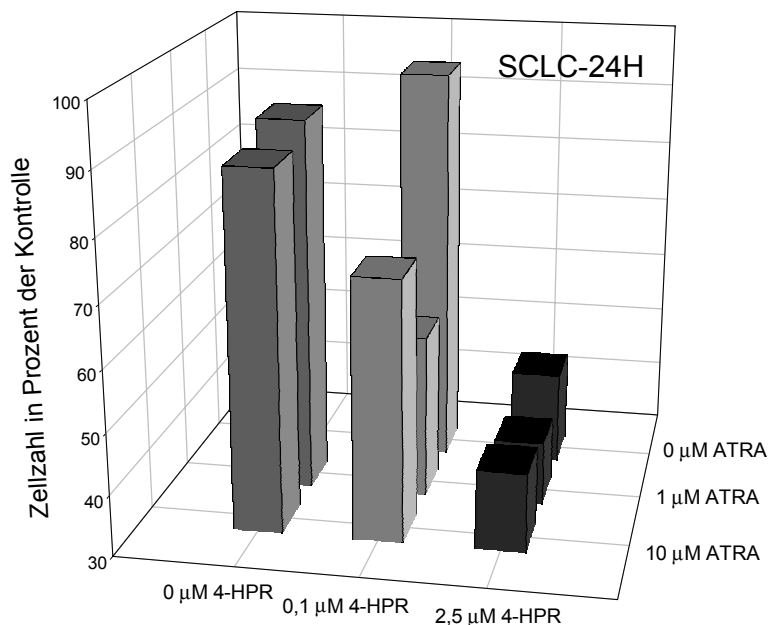
Da die schwächere Hemmung von Fenretinid in serumhaltigem Medium auf einen im Serum enthaltenen Faktor zurückzuführen sein könnte, wurden Wachstumsversuche mit den Zelllinien NCI-H82 und SCLC-24H in verschiedenen Medien durchgeführt. Zum einen wurde mit Kohle gestripptes FCS verwendet, aus dem so die lipophilen Substanzen wie Retinoide, Vitamin D3, Schilddrüsenhormone und andere entfernt wurden. Zum anderen standen zwei dialysierte Medien zur Verfügung mit Molekulargewichten bis 1.000 bzw. 10.000. Fenretinid wurde in der Konzentration 10 µM eingesetzt, die Ergebnisse wurden mit R10-Medium verglichen.

Die Überlebensfraktionen in den einzelnen Medien unterscheidet sich nicht von denjenigen im R10-Medium. Die Ergebnisse sind daher im einzelnen nicht dargestellt.

## 3.4 **Wirkung von Fenretinid in Kombination mit all-trans-Retinsäure**

Anhand zweier Zelllinien, NCI-H82 und SCLC-24H, sollte untersucht werden, ob durch Kombination von 4-HPR und ATRA eine synergistische oder additive Wirkung auf die Zellproliferation auftritt. Dazu wurde je eine schwach und eine mittelstark wirkende Konzentration der Retinoide ausgesucht, um nicht durch zu starke Inhibition eventuelle Effekte zu überdecken. Für Fenretinid waren dies 2,5 µM und 0,1 µM, für ATRA 10 µM und 1 µM bei der Zelllinie SCLC-24H bzw. 0,1 µM und 0,01 µM bei der gut reagierenden Zelllinie NCI-H82. Pro Zelllinie ergaben sich so vier Konzentrationskombinationen. Zusätzlich wurden als Kontrollansatz die Retinoide einzeln eingesetzt und zwar in den Konzentrationen 0,1, 0,5, 2,5 und 5 µM 4-HPR sowie 1 und 10 µM bzw. 0,01, 0,1, 1 und 10 µM ATRA. Die Zellzahl wurde jeweils auf unbehandelte Kontrollen bezogen.

Das Ergebnis des Kombinationsansatzes für die Zelllinie SCLC-24H zeigt Abbildung 3.11. Auf der z-Achse ist die prozentuale Zellzahl aufgetragen. Während sich bei den Einzelsubstanzen unter 2,5  $\mu\text{M}$  4-HPR die Zellzahl auf 45% reduziert, tritt unter 0,1  $\mu\text{M}$  4-HPR sowie unter 1  $\mu\text{M}$  oder 10  $\mu\text{M}$  ATRA keine signifikante Hemmung auf. Die Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  oder 1  $\mu\text{M}$  ATRA zu 2,5  $\mu\text{M}$  4-HPR (rechte Balkenreihe) verstärkt die Inhibition von Fenretinid nicht. Dagegen kommt es durch die Kombination von 10  $\mu\text{M}$  oder 1  $\mu\text{M}$  ATRA mit 0,1  $\mu\text{M}$  4-HPR zu einer Wachstumshemmung. Unter 10  $\mu\text{M}$  ATRA plus 0,1  $\mu\text{M}$  4-HPR reduziert sich die Zellzahl auf 72% der Kontrolle, unter 1  $\mu\text{M}$  ATRA plus 0,1  $\mu\text{M}$  4-HPR auf 57% (mittlere Balkenreihe).



**Abb. 3.11** Proliferationshemmung der Zelllinie SCLC-24H durch Kombination von 4-HPR und ATRA. Die Zellen wuchsen sechs Tage mit Zusatz der Retinoide in den Konzentrationen 0,1  $\mu\text{M}$  oder 2,5  $\mu\text{M}$  4-HPR, 1  $\mu\text{M}$  oder 10  $\mu\text{M}$  ATRA bzw. in den Kombinationen 0,1  $\mu\text{M}$  4-HPR plus 1  $\mu\text{M}$  ATRA, 0,1  $\mu\text{M}$  4-HPR plus 10  $\mu\text{M}$  ATRA, 2,5  $\mu\text{M}$  4-HPR plus 1  $\mu\text{M}$  ATRA, 2,5  $\mu\text{M}$  4-HPR plus 10  $\mu\text{M}$  ATRA. Als Kontrolle diente R10-Medium mit 1% Ethanol. Die Zellzahl wurde mit einem Coulter Counter gemessen und auf der z-Achse prozentual zur Kontrolle abgetragen. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt und ein repräsentatives Ergebnis abgebildet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier Parallelen.

Bei der Zelllinie NCI-H82 kann im Gegensatz zur Zelllinie SCLC-24H kein signifikanter Effekt festgestellt werden, die Resultate sind daher im einzelnen nicht wiedergegeben.

Um zu untersuchen, ob es sich bei dem beobachteten Effekt einer Wirkungsverstärkung von 0,1  $\mu\text{M}$  4-HPR durch 1  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$  ATRA um einen

synergistischen oder additiven Effekt handelt, wurden die Daten durch eine Berechnung des Kombinationsindex CI nach dem median-plot-Prinzip ausgewertet (CHOU 1994, SACKS 1995) (s. Kapitel 2.2.8.2):

$$CI = D_1/D_{x1} + D_2/D_{x2}$$

mit CI = Kombinationsindex;  $D_{x1}$  = Dosis von 4-HPR, die eine gegebene Inhibition von x als Einzelsubstanz hervorruft;  $D_1$  = Dosis von 4-HPR, die eine gegebene Inhibition von x in Kombination mit ATRA hervorruft;  $D_2$  und  $D_{x2}$  entsprechend für ATRA.

Wenn CI kleiner als 1, liegt ein synergistischer Effekt zugrunde, bei CI = 1 ein additiver, bei CI > 1 ein antagonistischer Effekt.

Von den Einzelsubstanzen wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt (Abb. 3.12.a). Fenretinid wurde in den Konzentrationen 0,1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M und 5  $\mu$ M, ATRA in 1  $\mu$ M und 10  $\mu$ M eingesetzt. In Abb. 3.12.b wurden diese Daten als median-effect plot dargestellt (CHOU 1994): auf der x-Achse ist logarithmisch die Dosis in  $\mu$ M abgetragen, auf der y-Achse logarithmisch das Verhältnis der Inhibitionsfraktion ( $f_a$ ) zur Überlebensfraktion ( $f_u$ ). Mittels linearer Regressionsanalyse ( $r^2 > 0,99$ ) ließ sich so die Konzentration der Einzelsubstanz für die Wirkung in der Kombination errechnen. Für all-trans-Retinsäure wurde darauf verzichtet, da die erzielten Wachstumshemmungen in der Kombination außerhalb der maximal eingesetzten Einzelkonzentration von 10  $\mu$ M lagen und eine Extrapolierung bei der geringen Anzahl von Datenpunkten nicht sinnvoll erschien.

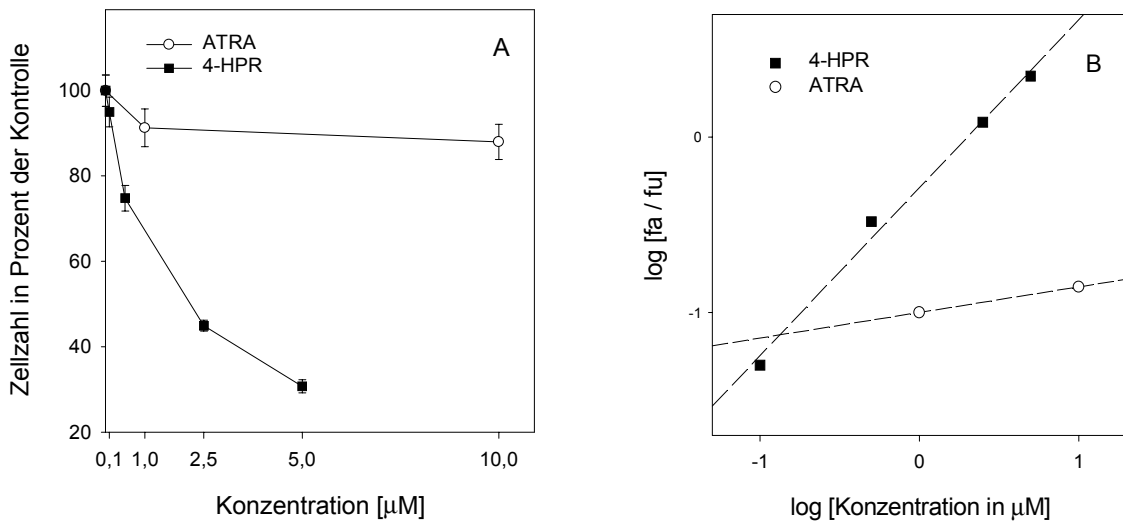
Man erhält für die Kombination von 0,1  $\mu$ M 4-HPR mit 10  $\mu$ M ATRA:  $D_1 = 0,1 \mu$ M und  $D_2 = 10 \mu$ M. Die Zellzahl liegt in der Kombination der beiden Retinoide bei 72% der Kontrolle (s. Abb. 3.11.), aus Abb. 3.12.b ergibt sich für Fenretinid als Einzelsubstanz eingesetzt eine Zellzahl von 72% bei der Konzentration von  $D_{x1} = 0,74 \mu$ M.  $D_{x2}$  kann aus den Versuchsdaten nicht ermittelt werden, muß aber um ein Vielfaches größer als  $D_2$  sein, so daß das Verhältnis  $D_2/D_{x2}$  in der Gleichung vernachlässigbar ist. Somit ist

$$CI = D_1/D_{x1} = 0,1 \mu\text{M} / 0,74 \mu\text{M} = 0,14$$

In Anlehnung daran errechnet sich für die Kombination von 0,1  $\mu$ M 4-HPR plus 1  $\mu$ M ATRA mit einer Zellzahl von 57%:  $D_1 = 0,1 \mu$ M und  $D_{x1} = 1,48 \mu$ M und

$$CI = D_1/D_{x1} = 0,1 \mu\text{M} / 1,48 \mu\text{M} = 0,068$$

In beiden Fällen liegt der Kombinationsindex CI deutlich unter 1, was auf einen synergistischen Effekt zwischen Fenretinid und all-trans-Retinsäure in niedrigen Konzentrationen hinweist.



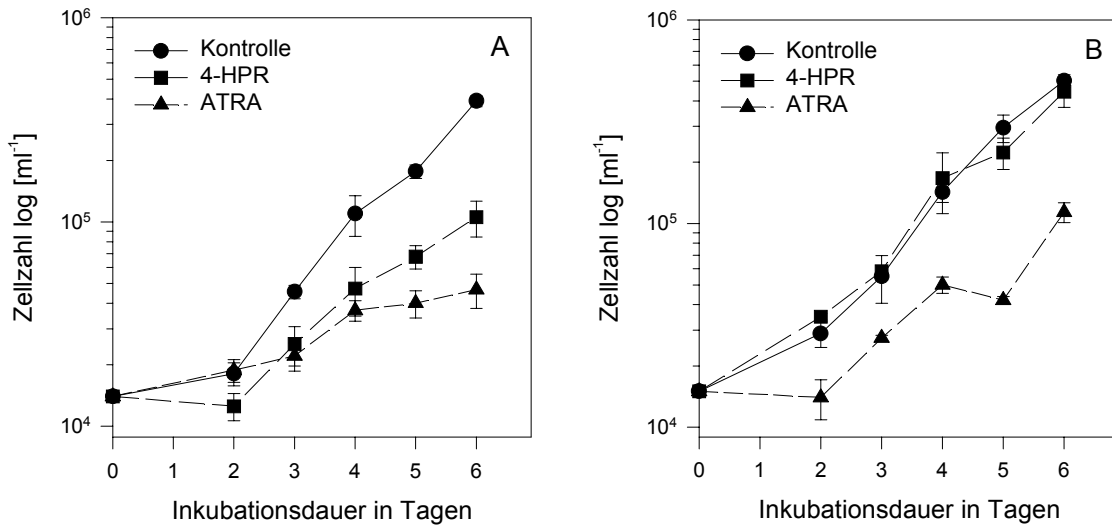
**Abb. 3.12.A** Dosis-Wirkungs-Kurve von 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  ATRA bzw. 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 2,5  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  4-HPR auf das Zellwachstum von SCLC-24H, gemessen am sechsten Tag. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier Parallelen mit den Standardabweichungen, die Zellzahl wurde prozentual zur unbehandelten Kontrolle (R10-Medium plus 1% Ethanol) wiedergegeben. **B** median effect plot der Dosis-Wirkungskurven von Fenretinid und ATRA als Einzelsubstanz. x-Achse: Logarithmus der Dosis [ $\mu\text{M}$ ], y-Achse: Logarithmus der Inhibitionsfraktion  $f_a$  zur Überlebensfraktion  $f_u$ . Zusätzlich sind die Regressionsgeraden ( $r^2 > 0,99$ ) eingetragen.

### 3.5 Reversibilität der Wirkung von Fenretinid und all-trans-Retinsäure

Um der Frage nachzugehen, ob die Proliferationshemmung durch Fenretinid oder all-trans-Retinsäure auch nach Entzug der Droge anhält, sollte zunächst die Wachstumskinetik der Zellen unter 4-HPR oder ATRA gemessen werden. Eine zweite Bestimmung der Wachstumskinetik wurde dann mit durch die Retinoide vorbehandelten Zellen in reinem R10-Medium wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben durchgeführt. Dazu wurde die Zelllinie NCI-H82 ausgewählt, da nur diese gut auf ATRA anspricht. Die Retinoide wurden in einer mittelstarken Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  eingesetzt, um irreversible zytotoxische Effekte zu vermeiden. Als Vergleichsparameter diente die Zellzahlverdopplungszeit (pdt) zwischen dem zweiten und vierten Tag, die einen guten Hinweis auf das Wachstumsverhalten in der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen gibt (zur Berechnung s. 2.2.8.3).

Die Abbildung 3.13.a zeigt das Wachstumsverhalten unter Zusatz der Retinoide. Die Kontrollgruppe weist mit 19 Stunden eine niedrige Zellzahlverdopplungszeit auf.

Unter dem Einfluß von Fenretinid geht die Zellzahl bis zum zweiten Tag leicht zurück, um dann weniger stark anzusteigen. Die Zellzahlverdopplungszeit (pdt) liegt mit 39 Stunden oberhalb der Kontrolle. Die stärkste Proliferationshemmung ist bei der mit ATRA behandelten Gruppe zu beobachten, hier errechnet sich eine Zellzahlverdopplungszeit von 49 Stunden.



**Abb. 3.13.A** Wachstumskinetik der Zelllinie NCI-H82 unter 5  $\mu\text{M}$  4-HPR oder 5  $\mu\text{M}$  ATRA bzw. der Kontrolle mit 1% Ethanol. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $10^4$  Zellen/ml ausgesät und die Zellzahl täglich zwischen dem zweiten und sechsten Tag mit einem Coulter Counter bestimmt. Die Auftragung erfolgte halblogarithmisch als Zellzahl  $\log [\text{ml}^{-1}]$  gegen die Inkubationsdauer. Die Zellzahlverdopplungszeit (pdt) wurde zwischen dem zweiten und vierten Tag in der Phase des stärksten Wachstums ermittelt. pdt (Kontrolle) = 19 Stunden, pdt (4-HPR) = 39 Stunden, pdt (ATRA) = 49 Stunden. **B** Wachstumskinetik der Zelllinie NCI-H82 in R10-Medium. Die Zellen wurden sechs Tage mit 5  $\mu\text{M}$  4-HPR oder ATRA bzw. R10-Medium vorbehandelt, der weitere Versuchsablauf entspricht dem unter Abb. 3.12.a. genannten. pdt (Kontrolle) = 21 Stunden, pdt (4-HPR) = 21 Stunden, pdt (ATRA) = 25 Stunden.

In Abbildung 3.13.b ist die Wachstumskinetik in R10-Medium von Zellen dargestellt, die sechs Tage mit 4-HPR oder ATRA vorbehandelt wurden. Bereits am zweiten Tag steigt die Zellzahl in der unbehandelten Kontrollgruppe und der mit Fenretinid vorbehandelten Gruppe an; die pdt liegt in beiden Gruppen bei 21 Stunden und erreicht somit beinahe die pdt der Kontrolle aus dem Vorversuch. Die Zellzahl der mit ATRA vorbehandelten Zellen stagniert bis zum zweiten Tag, steigt dann aber an mit einer pdt von 25 Stunden.

## 3.6 Effekte durch konstante Fenretinidexposition

### 3.6.1 Kultivierung resistenter Zelllinien unter Fenretinidzusatz

Auch nach mehrtägiger Exposition von Zellen unter einer Fenretinidkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  waren im Lichtmikroskop noch vitale Zellen zu sehen. Daher sollte beobachtet werden, ob Zellen von kleinzelligen Bronchialkarzinomlinien in Anwesenheit von 4-HPR zur Proliferation fähig sind. Die Zelllinien SCLC-24H und NCI-H82 wurden mit einer 4-HPR Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  in R10-Medium kultiviert und je nach Wachstumsgeschwindigkeit nach ein bis zwei Wochen geteilt. Zwischendurch wurde das Kulturmedium gegen frisches ausgetauscht.

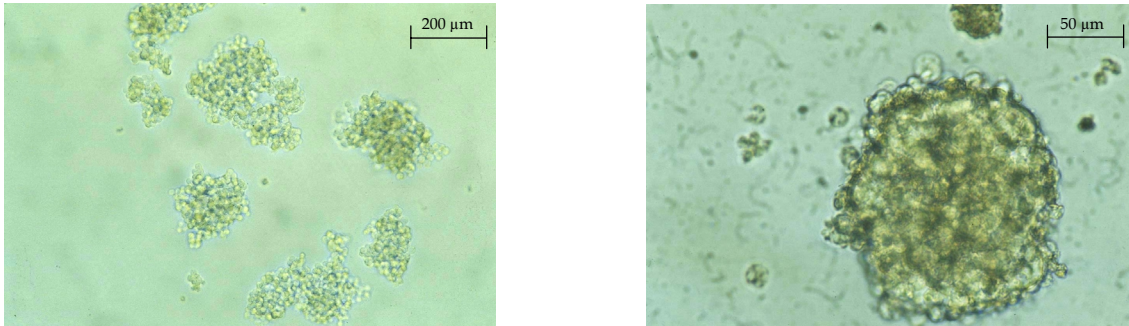
In beiden Zelllinien waren die Zellen auch nach 13 Passagen noch vital, die Proliferationsgeschwindigkeit hatte sich nach ca. vier Passagen auf ein langsames Wachstum als die Mutterlinien eingependelt; die Zellen der Linie NCI-H82 wurden wöchentlich geteilt, die der Zelllinie SCLC-24H acht- bis zwölftägig. Zur Überprüfung der Zellvitalität wurden die Zellen nach der Passage 10 (NCI-H82) bzw. Passage 8 (SCLC-24H) bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren und nach einigen Monaten wieder aufgetaut. Die anschließende Zellhaltung zeigte keine Veränderung im Proliferationsverhalten. Die beiden „resistenten“ Zelllinien sollen im weiteren mit NCI-H82-HPR und SCLC-24H-HPR bezeichnet werden.

### 3.6.2 Morphologische Veränderungen unter Fenretinid

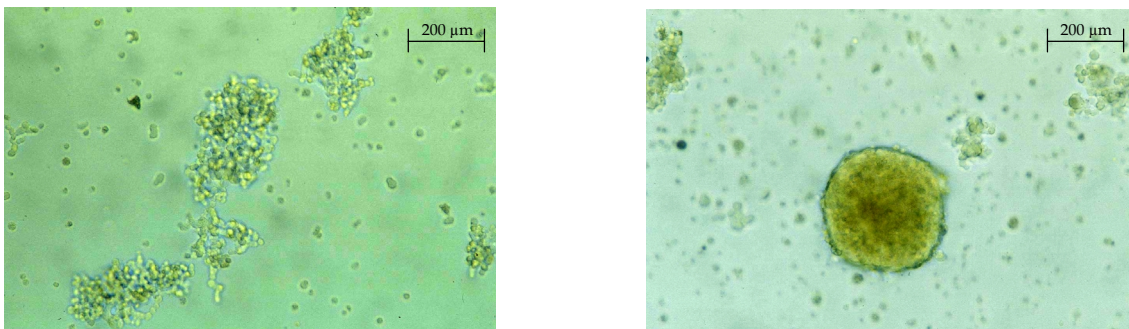
Die Zelllinien NCI-H82-HPR und SCLC-24H-HPR wurden in R10-Medium mit einem Zusatz von 10  $\mu\text{M}$  Fenretinid kultiviert (s. 3.5.1). Nach 13 bzw. 10 Passagen – etwa 18 Wochen entsprechend – waren die unten abgebildeten morphologischen Veränderungen zu beobachten (Abb. 3.14 und Abb. 3.15). Die Zelllinie NCI-H526 wurde über kurze Zeit ebenfalls in R10-Medium mit 10  $\mu\text{M}$  4-HPR gehalten. Hier trat bereits nach 10 Tagen eine veränderte Zellmorphie auf (Abb. 3.16).

In allen drei Zelllinien falten sich die lockeren Zellaggregate der Mutterlinien zu Kugeln, die hohl zu sein scheinen bzw. zentrale Nekrosen aufweisen könnten. Das Zellbild ähnelt der Wachstumsform vom klassischen Subtyp. Diese Veränderungen

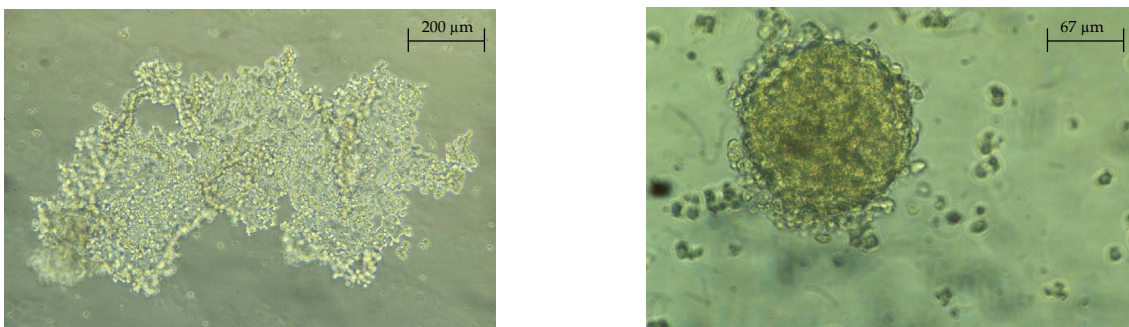
treten nur bei einem Teil der behandelten Zellaggregate auf, sind aber nicht bei den unbehandelten Zelllinien zu beobachten.



**Abb. 3.14** Links: Zellaggregate der Zelllinie NCI-H82 in R10-Medium (50x). Rechts: Zellaggregate der gegen Fenretinid resistenten Zelllinie NCI-H82-HPR Die Zellen wuchsen ca. 18 Wochen unter Zusatz von 10 µM 4-HPR (200x).



**Abb. 3.15** Links: Zellaggregate der Zelllinie SCLC-24H in R10-Medium (50x). Rechts: Zellaggregate der gegen Fenretinid resistenten Zelllinie SCLC-24H-HPR Die Zellen wuchsen ca. 18 Wochen unter Zusatz von 10 µM 4-HPR (50x).

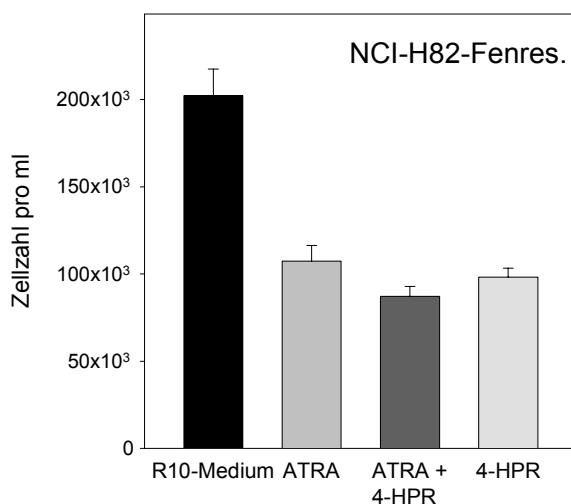


**Abb. 3.16** Links: Zellaggregate der Linie NCI-H526 in R10-Medium (50x). Rechts: Zellaggregate der Linie NCI-H526. Die Zellen wuchsen 10 Tage unter Zusatz von 10 µM 4-HPR. (150x).

### 3.6.3 Einfluß von *all-trans*-Retinsäure oder retinoidfreiem Medium auf NCI-H82-HPR

Da für die klinische Verwendung von Fenretinid die Frage nach der Stabilität einer Wachstumshemmung bedeutsam ist, wurden mit den Zellen der resistenten Sublinie NCI-H82-HPR nach 12 Passagen ein Proliferationsassay durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Reaktion der Zelllinie auf ATRA überprüft, da die Ausgangslinie NCI-H82 durch ATRA hemmbar ist, um so der Frage einer möglichen Kreuzresistenz nachzugehen.

Die in 10  $\mu\text{M}$  Fenretinid wachsende Zelllinie NCI-H82-HPR wurde zweimal mit RPMI 1640 gewaschen und sechs Tage in R10-Medium, 10  $\mu\text{M}$  ATRA, 10  $\mu\text{M}$  ATRA mit 10  $\mu\text{M}$  4-HPR oder 10  $\mu\text{M}$  4-HPR kultiviert. Danach wurde die Zellzahl mit einem Coulter Counter bestimmt.



**Abb. 3.17** Wachstum der gegen Fenretinid „resistenten“ Zelllinie NCI-H82-HPR in R10-Medium, 10  $\mu\text{M}$  ATRA, 10  $\mu\text{M}$  4-HPR mit 10  $\mu\text{M}$  ATRA oder 10  $\mu\text{M}$  4-HPR. Nach sechs Tagen wurde die Zellzahl im Coulter Counter gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus vier Parallelen mit den Standardabweichungen. Der Versuch wurde dreimal unabhängig durchgeführt, abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis.

In retinoidfreiem R10-Medium verdoppelt sich die Zellzahl von  $1,0 \times 10^5$  Zellen/ml unter 10  $\mu\text{M}$  4-HPR auf  $2,0 \times 10^5$  Zellen/ml (Abb. 3.17). Dagegen bleibt die Zellzahl unter 10  $\mu\text{M}$  ATRA mit  $1,1 \times 10^5$  Zellen/ml annähernd gleich. Eine sehr schwache Reduktion der Zellzahl auf  $0,9 \times 10^5$  Zellen/ml ist unter der Kombination von 10  $\mu\text{M}$  4-HPR mit 10  $\mu\text{M}$  ATRA zu sehen.



## 3.7 Nachweis von Apoptose

### 3.7.1 TUNEL-Test

Der Apoptosenachweis mit dem TUNEL-Test beruht auf einer Markierung der DNA-Fragmente, die während des Apoptoseprozesses entstehen. Biotinylierte d-UTPs werden an die 3'-OH-Enden der DNA-Fragmente eingebaut und in einem zweiten Schritt mit Meerrettich-Peroxidase und DAB detektiert.

Der TUNEL-Test wurde wie in 2.2.6. beschrieben mit Cytospinpräparaten der Zelllinien NCI-H82, SCLC-24H, DMS79 und NCI-H146 durchgeführt. Die ersten beiden Zelllinien sind gut durch Fenretinid hemmbar, die letzteren reagieren nur schwach (s. Abb. 3.3). Es wurde eine mittelstarke Konzentration von Fenretinid (5  $\mu$ M) gewählt, um zytotoxische und damit evtl. nekrotische Effekte gering zu halten. Zusätzlich wurden mit 5  $\mu$ M all-trans-Retinsäure behandelte Proben der Zelllinie NCI-H82, die auch durch ATRA inhibiert wird, untersucht sowie Proben der „resistenten“ Zelllinie NCI-H82-HPR unter 5  $\mu$ M 4-HPR. Die Einwirkzeit der Retinoide betrug 48 Stunden. Die gefärbten Zellen wurden mit einem Phasenkontrastmikroskop in einer 100x Vergrößerung ausgewertet. Pro Präparat wurden drei Gesichtsfelder à ca. 1000 Zellen ausgezählt.

Bei der Zelllinie NCI-H82 erhöht sich der Anteil der apoptotischen Zellen unter der Fenretinidbehandlung von 5% in der Kontrolle auf 45%, während durch den Zusatz von all-trans-Retinsäure kein Anstieg der apoptotischen Zellfraktion zu verzeichnen ist. Die „resistente“ Sublinie der NCI-H82 weist unter 5  $\mu$ M 4-HPR einen apoptotischen Zellanteil von 10% auf. Die Zelllinie SCLC-24H reagiert auf 4-HPR mit einer Verdoppelung der apoptotischen Zellzahl von 15% in der Kontrolle auf 30%. Die prozentuale Anzahl der apoptotischen Zellen liegt in den beiden Zelllinien, die schlechter durch Fenretinid hemmbar sind, dagegen nur bei 11% (DMS 79, Kontrolle 3%) bzw. bei 16% (NCI-H146, Kontrolle 10%).

Zelllinie	Apoptotische Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl		
	Kontrolle	5 $\mu$ M 4-HPR	5 $\mu$ M ATRA
NCI-H82	5%	45%	5%
NCI-H82-HPR	-	10%	-
SCLC-24H	15%	30%	-
DMS79	3%	11%	-
NCI-H146	10%	16%	-

**Tab. 3.4** Nachweis apoptotischer Zellen mit dem TUNEL-Test. Die Zelllinien NCI-H82, SCLC-24H, DMS79 und NCI-H146 wurden 48 Stunden mit R10-Medium plus 1% Ethanol (Kontrolle), 5  $\mu$ M 4-HPR oder 5  $\mu$ M ATRA inkubiert und aus den Zellen Cytospinpräparate hergestellt. Der TUNEL-Test wurde laut Herstellerprotokoll durchgeführt und die Präparate mit einem Phasenkontrastmikroskop ausgewertet. In drei Gesichtsfeldern pro Präparat wurde die Gesamtzellzahl und die Zahl der apoptotischen Zellen ermittelt.

### 3.7.2 AnnexinV-Assay

In der frühen Phase der Apoptose dreht sich das Phospholipid Phosphatidylserin, normalerweise an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert, auf die Außenseite der Zellmembran. Diese Translokation von Phosphatidylserin läßt sich durch AnnexinV, einem spezifisch an Phosphatidylserin bindenden Protein, nachweisen. Dazu wurde FITC-markiertes AnnexinV eingesetzt und die Zellen durchflußzytometrisch gemessen. Zusätzlich wurden die Zellen mit Propidiumiodid markiert, welches die Zellmembran nekrotischer Zellen durchdringen kann. Dadurch ist es möglich, zwischen früh-apoptotischen Zellen (AnnexinV-positiven), spät-apoptotischen (AnnexinV- und Propidiumiodid-positiven) und nekrotischen (Propidiumiodid-positiven) Zellen zu unterscheiden.

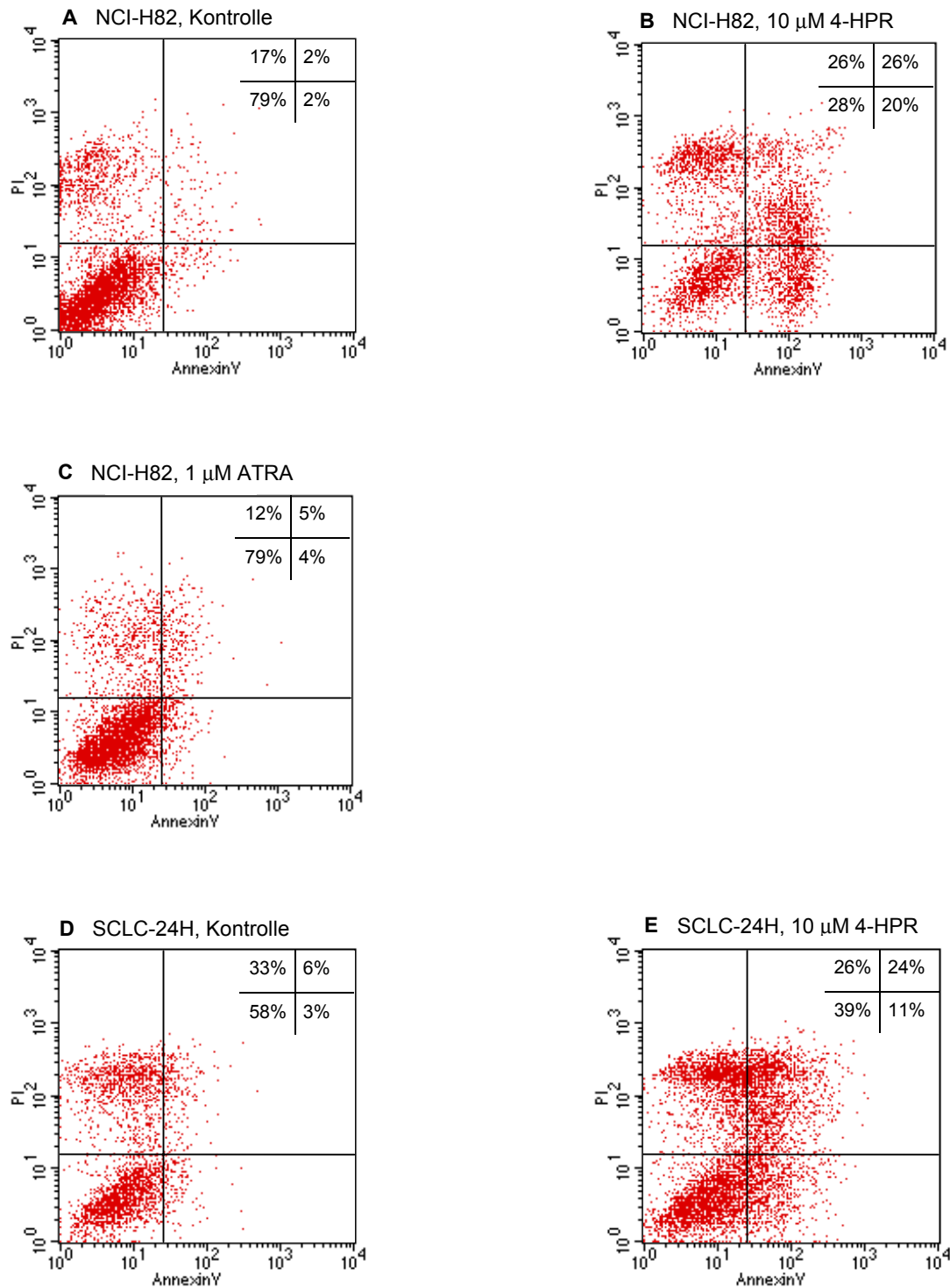
Die Zellen der Linien SCLC-24H und NCI-H82 wurden 24 Stunden mit R10-Medium, 10  $\mu$ M 4-HPR und 10  $\mu$ M ATRA (nur NCI-H82) inkubiert und im Anschluß mit AnnexinV und Propidiumiodid (PI) markiert. Innerhalb der nächsten halben Stunde erfolgte die Messung der Proben im Durchflußzytometer.

Zelllinie	Ansatz	Prozentualer Anteil an den Gesamtereignissen			
		-	AnnexinV	PI	PI +AnnexinV
SCLC-24H	Kontrolle	58,1%	3,3%	32,7%	5,9%
	10 $\mu$ M 4-HPR	38,6%	11,4%	25,7%	24,3%
NCI-H82	Kontrolle	78,7%	2,1%	17,0%	2,2%
	10 $\mu$ M 4-HPR	27,7%	20,6%	26,0%	25,7%
	10 $\mu$ M ATRA	78,9%	3,7%	12,5%	5,0%

**Tab. 3.3** Statistische Auswertung des AnnexinV-Assays (Abb. 3.18). Angegeben ist der prozentuale Anteil der einzelnen Fraktionen. PI: Propidiumiodid markiert, AnnexinV: AnnexinV-FITC markiert. Die Einteilung der Quadranten ergibt sich aus Abb. 3.18.

Sowohl bei der Zelllinie NCI-H82 als auch bei SCLC-24H steigt nach Fenretinid-Behandlung die Zahl der apoptotischen, AnnexinV-positiven Zellen verglichen mit der unbehandelten Kontrolle deutlich an (Abb. 3.18, Tab. 3.3). Während bei der Zelllinie SCLC-24H die AnnexinV-positiven Zellen der Kontrolle 3,3% ausmachen und die spät-apoptotischen PI- und AnnexinV-positiven 5,9%, steigt der Anteil der AnnexinV markierten Zellen unter 4-HPR-Behandlung auf 11,4%, derjenigen der AnnexinV- und PI-positiven auf 24,3%. Sowohl die unbehandelte wie behandelte Probe weisen viele PI markierte, nekrotische Zellen auf.

Die Kontrollprobe und die mit 10  $\mu$ M ATRA stimulierten Zellen der Zelllinie NCI-H82 zeigen eine ähnliche Verteilung der verschiedenen Zellfraktionen. Unter Zusatz von 4-HPR dagegen erhöht sich die Zahl der AnnexinV-positiven Zellen von 2,1% auf 20,6%, die der AnnexinV- und PI-positiven von 2,2% auf 25,7%.



**Abb. 3.18.A-E** Durchflußzytometrische Messung der Zelllinien SCLC-24H und NCI-H82. Die Zellen wuchsen 24 Stunden unter Zusatz von 10  $\mu$ M 4-HPR oder 10  $\mu$ M ATRA bzw. in R10-Medium plus 1% Ethanol als Kontrolle. Sie wurden vor der Messung mit AnnexinV-FITC und Propidiumiodid markiert. Die Einteilung der Quadranten ergibt sich wie folgt: Linker unterer Q.: unmarkierte Zellen. Rechter unterer Q.: AnnexinV-positive Zellen. Linker oberer Q.: Propidiumiodid-positive Zellen. Rechter oberer Q.: Propidiumiodid- und AnnexinV-positive Zellen. Im inset ist die prozentuale Verteilung der einzelnen Fraktionen angegeben.

## 3.8 Expression von IGFBP-2

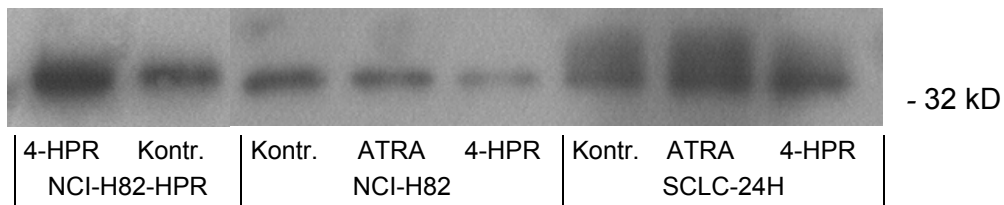
Die insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-I und IGF-II wurden in zahlreichen *in vitro* Zellsystemen als mitogen wirkende Faktoren beschrieben, so auch bei kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien. Eine wichtige Rolle zur Modulation der Wirkung von IGFs spielen die IGF-bindenden Proteine, für SCLC-Zelllinien ist dies insbesondere IGFBP-2. *In vitro* Studien haben gezeigt, daß die IGFBPs die Effekte der IGFs sowohl inhibieren als auch stimulieren können. Die Expression der IGFBPs wird durch eine Reihe von Faktoren, u.a. auch Retinoide, beeinflusst. Diese Regulation kann auf mRNA-Ebene ebenso wie auf Proteinebene stattfinden und soll im folgenden für IGFBP-2 mittels Western-Ligand-Blot und RT-PCR untersucht werden.

### 3.8.1 Sekretion von IGFBP-2

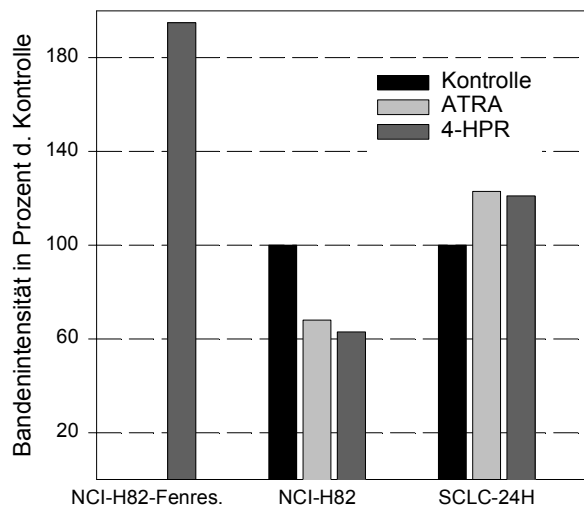
Die Wirkung von 4-HPR und ATRA auf die Proteinexpression von IGFBP-2 wurde an den Zelllinien NCI-H82, SCLC-24H und der Sublinie NCI-H82-HPR untersucht. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $5 \times 10^4$ /ml in ST-Medium ausgesät und 4-HPR oder ATRA in einer Endkonzentration von  $10 \mu\text{M}$  bzw.  $1 \mu\text{M}$  zugesetzt. Als Kontrolle diente 1% Ethanol, was der maximalen Konzentration des Lösungsmittels Ethanol in den Retinoidproben entsprach. Nach einer Inkubation von fünf Tagen wurden die konditionierten Medien abzentrifugiert, mittels TCA-Fällung ankonzentriert, elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und schließlich nach der Western Ligand Blot Methode analysiert.

Der Einfluß der beiden Retinoide all-trans-Retinsäure und Fenretinid ist stellvertretend für drei Versuchsdurchführungen in Abb. 3.19 dargestellt. Zelllinie NCI-H82 zeigt eine Abnahme von IGFBP-2 im Medium in Anwesenheit von ATRA oder 4-HPR, während bei der Zelllinie SCLC-24H ein leichter Anstieg des IGFBP-2 durch die Retinoide zu beobachten ist. Im Vergleich zur Ausgangszelllinie NCI-H82 weist die „resistente“ Sublinie NCI-H82-HPR eine deutliche Erhöhung von IGFBP-2 im Überstand auf. Zur Verdeutlichung wurde die Bandenintensität densitometrisch bestimmt (Abb. 3.20) und prozentual zum Wert der unbehandelten Kontrolle wiedergegeben. Da die Zellzahl in der mit Fenretinid behandelten Probe der Zelllinie NCI-H82 nach fünf Tagen nur noch 55% der Zellzahl in der Kontrolle betrug, wurde die errechnete Bandenintensität auf

die Zellzahl bezogen, um eine verringerte Proteinsekretion durch die geringere Zellzahl auszugleichen. Die Bandenintensität beträgt so in der Zelllinie NCI-H82 unter ATRA 68%, unter 4-HPR 63%. Dagegen steigt in der Sublinie NCI-H82-HPR die Bandenintensität verglichen mit einer unbehandelten Kontrolle auf 195% an. In der Zellen der Linie SCLC-24H liegt die Bandenintensität durch die Retinoidbehandlung bei 123% (ATRA) bzw. 121% (4-HPR).



**Abb. 3.19** Einfluß von Fenretinid und all-trans-Retinsäure auf die Sekretion von IGFBP-2: Western-Ligand-Blot von konditionierten Medien der Zelllinien NCI-H82 und SCLC-24H. Die Zellen wurden fünf Tage im ST-Medium mit 10  $\mu$ M 4-HPR, 1  $\mu$ M ATRA oder 1% Ethanol als Lösungsmittel-Kontrolle stimuliert. Die konditionierten Medien wurden nach der Western-Ligand-Blot-Methode mit [ $^{125}$ I]-IGF-I entwickelt und zeigten eine IGFBP-2 spezifische Bande bei 32 kD.

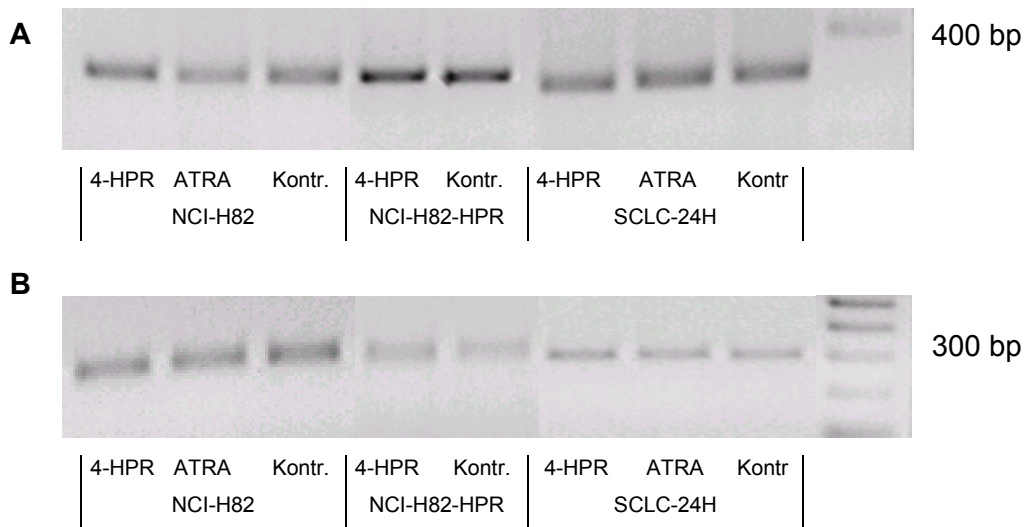


**Abb. 3.20** Densitometrische Analyse des in Abb. 3.19 dargestellten Western-Ligand-Blots. Die Werte wurden auf die Zellzahl der jeweiligen Kontrolle normiert und prozentual zur Bandenintensität der Kontrollprobe angegeben. Die Stimulation erfolgte fünf Tage in ST-Medium unter Zusatz von 10  $\mu$ M 4-HPR oder 1  $\mu$ M ATRA, als Kontrolle diente ST-Medium mit 1% Ethanol. Die Sublinie NCI-H82-HPR wurde mit 10  $\mu$ M 4-HPR stimuliert.

### 3.8.2 mRNA-Expression von IGFBP-2

Zur weiteren Untersuchung der Regulation von IGFBP-2 bei kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien wurde die Wirkung von all-trans-Retinsäure und Fenretinid auf dessen mRNA-Expression mittels einer RT-PCR getestet.

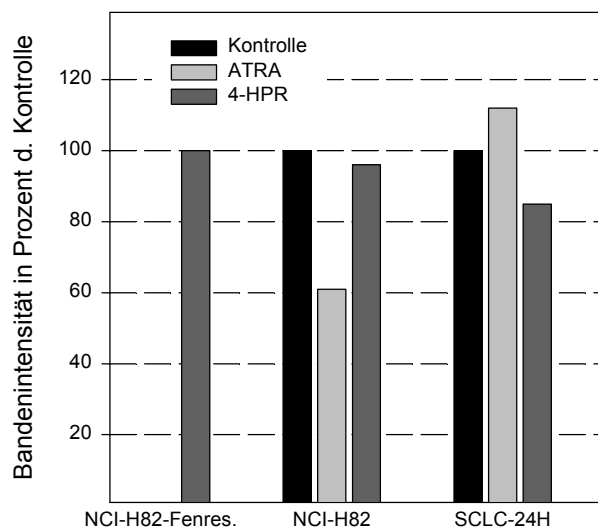
Die Zellen der Zelllinien NCI-H82, SCLC-24H sowie der „resistenten“ Sublinie NCI-H82-HPR wurde 24 Stunden in R10-Medium mit Zusatz von 10  $\mu$ M Fenretinid bzw. 1  $\mu$ M ATRA inkubiert. Anschließend wurde aus diesen Zellen RNA extrahiert, cDNA transkribiert und eine PCR mithilfe eines IGFBP-2 spezifischen Primer-Paares durchgeführt. Zur Normierung der verwendeten cDNA-Menge wurde zunächst eine PCR für GAPDH eingesetzt unter der Annahme, daß die Retinoide keinen Einfluß auf die Expression von GAPDH haben. Die cDNA-Menge, die zu vergleichbarer Bandenintensität in der GAPDH-PCR führte, wurde dann in der PCR für IGFBP-2 verwendet. Um eine Veränderung der Bandenintensitäten zu erfassen, wurden diese densitometrisch ausgewertet und das Ergebnis prozentual zur Intensität der unbehandelten Kontrollprobe dargestellt.



**Abb. 3.21** Untersuchung der mRNA-Expression mit RT-PCR von IGFBP-2 (**A**) bzw. GAPDH (**B**) der Zelllinien SCLC-24H sowie NCI-H82 und NCI-H82-HPR unter dem Einfluß von 10  $\mu$ M 4-HPR oder 1  $\mu$ M ATRA. Die Stimulation erfolgte 24 Stunden im R10-Medium, als Kontrolle diente R10-Medium mit 1% Ethanol. Die resistente Sublinie der NCI-H82 wurde mit 10  $\mu$ M 4-HPR stimuliert. Im Anschluß wurde eine RT-PCR mit IGFBP-2 spezifischem Primer-Paar durchgeführt, die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in einem Ethidiumbromid-gefärbten, 1,5prozentigem Agarosegel.

In Abbildung 3.21 sind repräsentative Banden der einzelnen Probenansätze (jeweils drei Versuchsdurchführungen) wiedergegeben. Bei der Zelllinie NCI-H82 läßt sich eine

Minderung der Bandenintensität in der mit 1  $\mu\text{M}$  ATRA behandelten Probe erkennen, während die Banden der Fenretinid-Probe und der Kontrolle vergleichbar in ihrer Intensität sind. Gleiches gilt für die resistente Sublinie, die unter 10  $\mu\text{M}$  4-HPR kultiviert wurde (s. 2.2.1). Die densitometrische Messung ergibt für mit ATRA behandelte Proben der Zelllinie NCI-H82 einen Wert von 61% der Kontrolle, die anderen Proben dieser Zelllinie liegen bei 100% (Abb. 3.22). Die Zelllinie SCLC-24H zeigt unter 4-HPR eine Bandendichte von 85% der Kontrolle, unter ATRA dagegen 112 % der Kontrolle.



**Abb. 3.22** Densitometrische Analyse der in Abb. 3.21 dargestellten RT-PCR Ergebnisse. Abgebildet ist die Bandenintensität der IGFBP-2 PCR-Produkte, prozentual zur Kontrollprobe. Die Stimulation erfolgte 24 Stunden in R10-Medium unter Zusatz von 10  $\mu\text{M}$  4-HPR oder 1  $\mu\text{M}$  ATRA, als Kontrolle diente R10-Medium mit 1% Ethanol. Die Zelllinie NCI-H82-HPR wurde mit 10  $\mu\text{M}$  4-HPR stimuliert.



## 4 Diskussion

### 4.1 Vergleich der Zellzahlbestimmungsmethoden

Die in dieser Arbeit verwendete elektronische Zellzählung mit einem Coulter Counter wurde mit den Ergebnissen aus einem MTT-Assay und der Neubauer-Zählkammer mit Trypanblau-Färbung verglichen.

Es zeigte sich, daß vom Coulter Counter auch die geschrumpften apoptotischen Zellen erfaßt wurden. Daher würde bei einer Auswertung mit Vitalfärbung und Zählung in der Neubauer-Zählkammer die von Fenretinid ausgelöste Wachstumshemmung größer ausfallen als mit dem Coulter Counter berechnet. Bei der Zelllinie NCI-H82 ergäbe sich beispielsweise unter der Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  4-HPR mit der Neubauer-Zählkammer gezählt eine Überlebensfraktion von ungefähr 20%, mit dem Coulter Counter errechnet sich eine Überlebensfraktion von 50%.

Die Ergebnisse aus den MTT-Assays unterschieden sich dagegen in ihrer maximalen Hemmung kaum von den Ergebnissen des Coulter Counters. In der Zelllinie NCI-H82 lagen die Resultate des MTT-Assays für eine Hemmung durch ATRA jedoch in den niedrigen Konzentrationen deutlich oberhalb der Zellzahlen des Coulter Counters. Zu erwarten wäre eigentlich umgekehrt eine reduzierte Stoffwechselaktivität der Zellen durch den zytostatischen Effekt der all-trans-Retinsäure und damit niedrigere Absorption im MTT-Assay.

Zusammenfassend ergibt sich, daß eine Vitalfärbung mit Trypanblau und Auswertung in der Neubauer-Zählkammer die genauesten Ergebnisse liefert. Die Methode ist jedoch für einen größeren Versuchsumfang mit vielen verschiedenen Zelllinien zu zeitaufwendig. Die Zellzählung mit einem Coulter Counter oder einem MTT-Assay liefert ungefähr äquivalente Resultate und ist daher für die hier vorliegende Fragestellung nach dem Auftreten von Wachstumshemmungen in einer größeren Zahl von Zelllinien geeignet.

## 4.2 Wirkung der Retinoide in serumhaltigem Medium

### 4.2.1 Hemmung des Zellwachstums durch Fenretinid

Von Fenretinid wurde bereits in zahlreichen Arbeiten nachgewiesen, daß es das Wachstum unterschiedlicher Zelllinie *in vitro* hemmen kann. Kalemkerian et al. (1995) untersuchten dies an einzelnen kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien. In dieser Arbeit sollte nun überprüft werden, ob eine Wachstumshemmung auch an einer größeren Anzahl von SCLC-Zelllinien zu beobachten ist und ob sich Unterschiede hinsichtlich der Empfindlichkeit auf das Retinoid ergeben. Daher wurden zwölf Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms unterschiedlichen Konzentrationen von 4-HPR ausgesetzt und nach sechs Tagen die Zellzahl bestimmt.

Fenretinid reduzierte in allen Zelllinien dosisabhängig die Zellzahl. Die IC<sub>50</sub>-Werte reichten von 4,5 µM bis 7,5 µM, drei Zelllinien konnten durch die eingesetzte maximale Konzentration von 10 µM 4-HPR nicht auf 50% der Kontrollzellzahl gehemmt werden. Die IC<sub>50</sub>-Werte lagen damit über dem in klinischen Studien erreichten Serumspiegel von 1-1,5 µM, welcher sich bei einer oralen Tagesdosis von 200 mg 4-HPR einstellt und nicht von nennenswerten toxischen Nebenwirkungen begleitet wird (FORMELLI 1993, NAIK 1995). Allerdings kann sich Fenretinid in verschiedenen Geweben, insbesondere in Epithel von lipophilem Gewebe wie z.B. der Brustdrüse, um den Faktor 10 bis 20 anreichern (FORMELLI 1993, NAIK 1995). Ob dies auch in Bronchialkarzinom-Epithel *in vivo* stattfindet, ist nicht bekannt.

Eine gute Wachstumshemmung der SCLC-Zelllinien durch Fenretinid wurde bereits von Kalemkerian et al. (1995) beschrieben. Die Autoren ermittelten jedoch deutlich niedrigere IC<sub>50</sub>-Werte von 0,1-3 µM in Zelllinien, die auch in dieser Arbeit eingesetzt wurden. Ein wichtiger Grund für diesen Unterschied dürfte in den verschiedenen Zellkulturbedingungen zu sehen sein. Der geringere Serumanteil des von Kalemkerian et al. verwendeten Mediums mit 5% FCS führt, wie in eigenen Versuchen gezeigt, zu einer ausgeprägten Steigerung der Hemmwirkung von Retinoiden (s. 3.3 und 4.3). Zusätzlich wurde die Zellzählung dort mit einer Neubauer-Zählkammer und Trypanblau-Färbung durchgeführt. Der Vergleich mit der Zählung im Coulter Counter ergab jedoch, daß auch nicht-vitale Zellen im Coulter Counter mitgezählt werden und die Inhibitionsfraktion dadurch unterschätzt wird (s. 3.1, 4.1).

Auffallend ist, daß insbesondere die varianten und transienten Subtypen gut durch Fenretinid gehemmt werden. Dies deckt sich mit Beobachtungen von Kalemkerian et al. (1995) und für ATRA mit Ergebnissen von Geradts et al. (1993). Ausnahmen stellen die Zelllinie NCI-H69, eine klassische Zelllinie, die sehr gut auf 4-HPR reagiert, sowie die Zelllinie DMS79 dar, die als varianter Subtyp keine fünfzigprozentige Hemmung im eingesetzten Konzentrationsbereich zeigt.

Die varianten Subtypen unterscheiden sich von den klassischen Zelltypen u.a. durch eine starke Überexpression oder Amplifikation des Proto-Onkogens c-myc. Retinoide können in die Expression von c-myc eingreifen. Eine Reduktion der Transkription durch Fenretinid (DELIA 1995, IGAWA 1994) sowie all-trans-Retinsäure (DOYLE 1989, KALEMKERIAN 1994, WEBER 1999) ist an kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien und anderen Zelllinien beschrieben, teilweise war jedoch auch eine Erhöhung durch Fenretinid in Prostatakarzinom-Zelllinien zu beobachten (SUN 1999a). Die Verringerung der c-myc Expression wird allgemein mit Proliferationshemmung oder Differenzierungsinduktion in Zusammenhang gebracht (SPENCER 1991). Andererseits ist von c-myc neben seinem mitogenen Effekt bekannt, daß es Apoptose induzieren kann (EVAN 1994, GREEN 1997, KAUFFMANN-ZEH 1997), welche durch bcl-2 unterdrückbar ist (FANIDI 1992). Zellen mit hoher c-myc-Expression könnten daher empfindlicher auf bestimmte Apoptose-Stimuli reagieren. Ein Rolle von c-myc bei dem guten Ansprechen der varianten und transienten Sublinien auf 4-HPR ist also nicht auszuschließen, die unterschiedliche zeitliche Kinetik der c-myc Regulation und des Apoptoseeintrittes durch 4-HPR macht aber zumindest einen direkten Zusammenhang nicht wahrscheinlich (DELIA 1995), sondern spricht eher für eine Regulation im Rahmen der Wachstumshemmung und Differenzierung. Das Ausmaß der c-myc-Expression ließe sich auch mit den beiden „Ausreißer-Zelllinien“ DMS79 und NCI-H69 vereinbaren: die variante Zelllinie DMS79, welche schlecht durch Fenretinid hemmbar ist, exprimiert wenig c-myc (HERRLINGER 1994, KIEFER 1987), ähnelt in dieser Hinsicht somit einem klassischen Typ, während die klassische Zelllinie NCI-H69 stark N-myc exprimiert. Die Funktion von N-myc ist derzeit noch nicht völlig verstanden, es scheint jedoch ähnliche Wirkungen wie c-myc zu besitzen.

Die stärkere Empfindlichkeit der varianten Zelllinien könnte sich teilweise auch methodisch erklären. Wie der Vergleich der Zellzählungsmethoden ergibt, werden vom Coulter Counter auch kleine apoptotische Zellen erfaßt (s. 3.1, 4.1). Dieser Anteil fällt bei den schnell wachsenden varianten Zelllinien weit weniger ins Gewicht als bei klassischen Zelllinien mit ihrer deutlich höheren Zellzahlverdopplungszeit. Die vari-

ante Zelllinie DMS79 fiel unter den Kulturbedingungen durch ein relativ langsames Wachstum auf, während die klassische Zelllinie NCI-H69 ausgesprochen schnell wächst. Die unterschiedliche Proliferationsgeschwindigkeit erklärt sicher nicht alleine den Unterschied zwischen varianten und klassischen Zelllinien, macht aber deutlich, wie wichtig die Wahl der Zellzahlbestimmungsmethode ist.

An dieser Stelle soll betont werden, daß die Zellzahl zur Messung der Proliferation nur ein Parameter unter anderen ist. Eine Analyse des Zellzyklus oder eine Bestimmung des [3H]-Thymidin-Einbaus wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Sacks et al. (1995) sahen jedoch in HNSCC-Zelllinien unter ATRA eine Zellzahlreduktion bei erhaltenem [3H]-Thymidin-Einbau und begründeten damit synergistische Effekte mit Chemotherapeutika. Für genauere Untersuchungen müßte die Bestimmung der Zellzahl daher um andere Parameter erweitert werden. Da diese Arbeit allerdings zunächst das Auftreten von Wachstumshemmung in einer größeren Anzahl von Zelllinien nachweisen will, ist die Zellzahl für diesen Zweck durchaus ein geeigneter Parameter.

#### 4.2.2 Vergleich der Hemmung durch Fenretinid mit all-trans-Retinsäure

Fenretinid kann in vielen Fällen eine Zellzahlreduktion und Apoptose in Zellen hervorrufen, welche nicht auf all-trans-Retinsäure reagieren. Auch kleinzellige Bronchialkarzinom-Zelllinien zeigen nur in einigen Zelllinien eine Hemmung durch ATRA (GERADTS 1993). Daher wurde die Wirkung von Fenretinid auf das Zellwachstum anhand vier ausgewählter, gut hemmbarer Zelllinien mit derjenigen von ATRA verglichen.

Lediglich die Zelllinie NCI-H82 wies eine sehr gute Reduktion der Zellzahl durch all-trans-Retinsäure auf. Die maximale Hemmung durch die beiden Retinoide bei 10  $\mu\text{M}$  unterschied sich kaum, die Wirkung von ATRA setzte jedoch bereits bei 0,01  $\mu\text{M}$  ein, die von 4-HPR erst eine Zehnerpotenz höher. Damit lag der Beginn der Wachstumsinhibition durch ATRA im Bereich des physiologischen Serumspiegels von 1-10 nM (HOULE 1993, TAKAHASHI 1995). Die Zelllinie SCLC-24H reagierte bei 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  mit einem schwachen Rückgang der Zellzahl, während die Zelllinien NCI-H60 und NCI-H526 keine signifikante Hemmung durch ATRA zeigte. Fenretinid inhibierte das Zellwachstum somit auch in Zelllinien, die nicht auf all-trans-Retinsäure ansprechen.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen aus der Literatur überein. Kleinzellige Bronchialkarzinom-Zelllinien sind im allgemeinen schlecht durch all-trans-Retinsäure hemmbar, nur von der Zelllinie NCI-H82 ist eine gute Inhibierbarkeit nachgewiesen (GERADTS 1993, KALEMKERIAN 1994). Insgesamt scheinen auch hier die varianten Zelllinien empfindlicher gegenüber ATRA zu sein (GERADTS 1993). Die hemmende Wirkung von Fenretinid auf Zelllinien, die gegenüber ATRA unsensibel sind, wurde an einer Vielzahl von Zelltypen beobachtet, z.B. NSCLC (ZOU 1998b), Melanom, Kolonadenokarzinom, Mammakarzinom (CHIANTORE 1999), Lymphome (DELIA 1993, KAZMI 1996), Zervixkarzinom (ORIDATE 1997), Neuroblastom (PONZONI 1995, REYNOLDS 1997), Mamma- karzinom (SHEIKH 1995), Prostatakarzinom (SUN 1999a) oder Ovarialkarzinom (SUPINO 1996).

Die Hemmung des Zellwachstums von SCLC-Zelllinien durch Fenretinid, nicht aber durch all-trans-Retinsäure, spricht für einen unterschiedlichen oder zusätzlichen Wirkungsweg. Im Gegensatz zu ATRA konnte 4-HPR in der Zelllinie NCI-H82 Apoptose auslösen (s. 3.7.1). 4-HPR interagiert zwar mit Retinoid-Rezeptoren (FANJUL 1996), aber zumindest die Induktion von Apoptose scheint nicht direkt über die Retinoid-Rezeptoren vermittelt zu sein, da Rezeptorantagonisten oder Rezeptornullvarianten eine Apoptoseinduktion bzw. eine Inhibition durch 4-HPR nicht aufheben konnten (CLIFFORD 1999, ORIDATE 1997, SUN 1999a, SUN 1999b). Es konnte auch kein Zusammenhang zwischen der Expression von Retinoid-Rezeptoren wie beispielsweise RAR $\beta$  und einer Reaktion auf 4-HPR festgestellt werden (SUN 1999a, ZOU 1998b). In einer kleinen klinischen Studie mit Prostatakarzinom-Patienten wurde ebenfalls keine Veränderung der RAR $\beta$ -Expression in der Prostata gefunden (LOTAN 2000).

An der Wachstuminhibition durch ATRA scheinen dagegen Retinoid-Rezeptoren beteiligt zu sein. In Bronchialkarzinom-Zelllinien trifft dies vor allem auf RAR $\beta$  zu (HOULE 1993, WEBER 1999), welcher vermutlich eine besondere Bedeutung in der Lungencarcinogenese besitzt (s. 1.2.2.1). Apoptoseinduktion durch ATRA wurde zwar von einigen Autoren in verschiedenen Zelllinien gefunden (CHIANTORE 1999, CLIFFORD 1999, ORIDATE 1995, ORIDATE 1996), war jedoch an das Vorhandensein von Retinoid-rezeptoren geknüpft (CLIFFORD 1999).

Zusammenfassend dürfte der entscheidende Grund für die Wachstumshemmung durch Fenretinid von Zelllinien, die unsensibel auf ATRA reagieren, die Induktion von Apoptose darstellen; zusätzlich Mechanismen lassen sich allerdings nicht ausschließen.

### 4.2.3 Wachstumstimulation durch Fenretinid

Bei der Zelllinie NCI-H82 und teilweise bei der Zelllinie SCLC-24H ist unter der Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  4-HPR eine Abweichung von der erwarteten Wachstumshemmung zu sehen. Während unter 0,1  $\mu\text{M}$  oder 0,5  $\mu\text{M}$  4-HPR bzw. 5  $\mu\text{M}$  die Zellzahl zurückgeht, kommt es bei 1  $\mu\text{M}$  zu einem Wiederanstieg der Zellzahl auf Werte der Kontrolle oder darüber hinaus im Sinne einer echten Stimulation (Abb. 3.2.a und b, Abb. 3.5.a). Dies ist besonders konstant bei der Zelllinie NCI-H82 zu beobachten. Um dieses Phänomen besser einzugrenzen, wurden Wachstumsversuche mit NCI-H82 in einem engeren Konzentrationsbereich durchgeführt. Auch hier ist ein signifikanter Rückgang der Zellzahl bei 0,1  $\mu\text{M}$  und 2,5  $\mu\text{M}$  4-HPR erkennbar, der Anstieg bei 0,5 und 1,0  $\mu\text{M}$  4-HPR ist jedoch nicht signifikant. Dennoch deuten die Ergebnisse auf eine stimulierende Wirkung von Fenretinid bei Konzentrationen um 1  $\mu\text{M}$  hin.

Ravi et al. (1998) konnten in SCLC-Zelllinien eine Induktion des Tumorwachstumsfaktors Gastrin-releasing Peptide (GRP) durch all-trans-Retinsäure nachweisen. GRP wurde in biologisch aktiver Form exprimiert und führte in den Zellen zu verstärktem Wachstum. Stimulierende Wirkungen von Retinoiden finden sich auch bei anderen Zelllinien. So stimuliert Fenretinid eine Mammakarzinom-Zelllinie bei 1  $\mu\text{M}$  (FAVONI 1998), eine Ovarialkarzinom-Zelllinie im Bereich 0,3-1,0  $\mu\text{M}$  (SUPINO 1996) oder in Kombination mit Tamoxifen eine Rektumkarzinom-Zelllinie (ZIV 1994). Für all-trans-Retinsäure und andere natürliche Retinoide sind Wachstumstimulationen bei einer Neuroblastom-Zelllinie (BABAJKO 1996) sowie bei zwei NSCLC-Zelllinien beschrieben, während man bei 4-HPR eine Inhibition beobachten konnte (GERADIS 1993, WAN 1997). Wan et al. (1997) führen die Stimulation auf eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 durch ATRA, welcher normalerweise von ATRA gehemmt wird, zurück.

Diese vereinzelt auftretende Förderung des Tumorzellwachstums durch Retinoide macht ihren klinischen Einsatz ambivalent.

## 4.3 Wirkung der Retinoide in serumfreiem Medium

Der Serumgehalt des verwendeten Kulturmediums nimmt einen wichtigen Einfluß auf die Wirkung der Retinoide, hinsichtlich ihrer Wirksamkeit ebenso wie hinsichtlich ihres Metabolismus (AVIS 1995, BABAJKO 1996, COHICK 1995, TAKATSUKA 1996,

TAKAHASHI 1995, WAN 1997, ZOU 1994, ZOU 1998b). Dies ist natürlich von besonderem Interesse bei der Übertragung der *in vitro* gefundenen Ergebnisse auf die Verhältnisse *in vivo*. Der Effekt von Fenretinid auf das Zellwachstum wurde daher in dieser Arbeit mithilfe zweier in serumfreiem SIT-Medium kultivierten Zelllinien, NCI-H82-SIT und SCLC-24H-SIT, auf eine Abhängigkeit vom Serum hin untersucht. Zusätzlich wurden an den Ausgangszelllinien Wachstumsversuche mit 4-HPR oder ATRA in serumfreiem Medium und in SIT-Medium mit 0,25% Serumalbumin durchgeführt.

Die hemmende Wirkung von Fenretinid auf die Zellzahl war in den serumfrei-adaptierten Zelllinien wie auch in der Ausgangszelllinie NCI-H82 viel stärker ausgeprägt als in serumhaltigem Medium. Bereits ab 0,5  $\mu\text{M}$  4-HPR waren nur noch vereinzelt vitale Zellen vorhanden, während unter 0,1  $\mu\text{M}$  4-HPR keine oder nur eine schwache Hemmung feststellbar war. Dieser Schwelleneffekt trat im Serum nicht auf. Im Vergleich dazu betrug in serumhaltigem Medium die Zellzahl unter 0,5  $\mu\text{M}$  4-HPR bei der Zelllinie NCI-H82 noch 80 % der Kontrolle. Eine Stimulation der Zelllinie NCI-H82 bei 1  $\mu\text{M}$ , wie im FCS-Medium beobachtet, entfiel dagegen in serumfreiem Medium. Auch die Hemmung durch ATRA wurde in SIT-Medium verstärkt, insbesondere die im Serum kaum sensible Zelllinie SCLC-24H reagierte mit einem Rückgang auf fast 10% der Kontrollzellzahl. Durch Zusatz von Serumalbumin wurde die Hemmung in beiden Zelllinien wieder aufgehoben. Die Ergebnisse mit dialysierten Medien oder mit Kohle gestripptem Medium hingegen unterschieden sich nicht von 10% FCS-Medium.

Eine gesteigerte Wirkung von Retinoiden im serumfreiem Medium wurde auch an anderen Zelllinien gesehen (BABAJKO 1996, TAKAHASHI 1995, TAKATSUKA 1996, WAN 1997, ZOU 1998b). Außerdem konnte die Wachstumsinhibition von SCLC-Zelllinien durch 13-cis-Retinsäure in serumfreiem Medium durch Serumalbumin rückgängig gemacht werden (AVIS 1995).

Für die unterschiedlich starke Wirkung der Retinoide im Serum und im serumfreien Medium sind drei Gründe denkbar: zum einen ein Konzentrationseffekt, zum anderen ein unterschiedlicher Wirkungsmechanismus, eventuell im Sinne einer veränderten Rezeptorexpression, und schließlich Faktoren im Serum mit antagonistischem oder schützendem Einfluß.

ATRA und 4-HPR binden an Serumalbumin (AVIS 1995), so daß sich die freie Konzentration und somit die Verfügbarkeit verringert. Versuche mit humanen Keratinozyten zeigten, daß freie all-trans-Retinsäure in kurzer Zeit von den Zellen aufgenommen,

aber auch metabolisiert wird, während an Albumin gebundene ATRA nur zu einem geringen Teil in die Zellen aufgenommen wird (HODAM 1996). Allerdings sinkt durch die Bindung auch die Abbaurate, die Anlieferung erfolgt langsam über einen längeren Zeitraum. Zusätzlich scheint die Expression der zellulären Bindungsproteine für ATRA, CRABP-II, in serumfreiem Medien verringert zu sein (ZOU 1994); diese Bindungsproteine spielen eine wichtige Rolle bei der Metabolisierung von ATRA. Dadurch würde ebenfalls die Verfügbarkeit von ATRA im serumfreien Medium ansteigen. Die Ergebnisse von Avis et al. (1995) machen die Bedeutung der Konzentration der freien Substanz deutlich: Nach Zugabe einer lipophilen Substanz, die 13-cis-Retinsäure aus ihrer Bindung an Serumalbumin verdrängt, stellt sich eine ähnliche Hemmung wie ohne Albumin ein. Dies könnte auch den Umstand erklären, daß die Ausgangszelllinie NCI-H82 in R10-Medium besser gehemmt wird als in Anwesenheit von Albumin: andere lipophile Faktoren verdrängen die all-trans-Retinsäure teilweise aus ihrer Bindung an Albumin oder Retinol-Bindungsprotein und erhöhen so die freie Konzentration.

Die deutliche Dosis-Schwelle von 4-HPR zwischen 0,1 und 0,5  $\mu\text{M}$  ist im serumhaltigen Medium nicht zu sehen. Unklar ist, ob der Schwelleneffekt lediglich überdeckt wird oder tatsächlich fehlt. Dies könnte für das Vorliegen eines anderen oder auch eines zusätzlichen Wirkmechanismus sprechen, wie zum Beispiel eines zytotoxischen Effektes, der ab einer bestimmten Konzentration auftreten könnte. Der vorherrschende Mechanismus bestünde dann nicht mehr in der Induktion von Apoptose, sondern von Nekrose.

Schließlich ist es denkbar, daß im Serum Faktoren enthalten sind, die Fenretinid hemmen oder die Zellen vor Apoptose schützen. Dies ist beispielsweise von IGF-1 bekannt, welches Apoptose, induziert durch Serumentzug oder c-myc, verhindern kann (BOYLE 1997, EVAN 1994, HARRINGTON 1994, JONES 1995). Die Verwendung von dialysierten FCS-Medien bis zum Molekulargewicht von 10.000 bzw. 1.000 ergab jedoch keinen Unterschied zum nicht-dialysierten FCS-Medium. Auch die Entfernung von lipophilen Substanzen aus dem Serum durch Kohle, die andere Retinoide, Vitamin D<sub>3</sub>, TSH und weitere mit Retinoiden interagierende Substanzen umfaßte, erbrachte keine Veränderung.

Von den drei diskutierten Möglichkeiten, die die stark gestiegene Inhibition in serumfreiem SIT-Medium erklären könnten, dürfte sicher die höhere freie Konzentration der Retinoide eine Rolle spielen. Ob dies alleine jedoch den deutlichen Schwelleneffekt in



der Wirkung von Fenretinid erklärt, scheint fraglich. Die Abhängigkeit vom Serumgehalt macht die Übertragung der *in vitro* erzielten Ergebnisse auf die Situation *in vivo* schwierig und könnte auch die teilweise enttäuschenden Studienergebnisse von Fenretinid miterklären.

#### 4.4 Synergistische Wirkung von Fenretinid und all-trans-Retinsäure

Retinoide, insbesondere die all-trans-Retinsäure und ihre Derivate, weisen unangenehme und toxische Nebenwirkungen auf, die ihren klinischen Einsatz limitieren. Darüber hinaus können nach einiger Zeit Resistenzen auftreten, wie beispielsweise in der Behandlung der Promyelozyten-Leukämie (ADAMSON 1994, BREITMAN 1994) gesehen. Eine Kombination zweier Retinoide, etwa ATRA und 4-HPR, die sich in ihrem Wirkungsprofil zu unterscheiden scheinen, könnte hier durch etwaige synergistische Wirkungen Therapievorteile erbringen. Daher wurden im folgenden an zwei Zelllinien, NCI-H82 und SCLC-24H, Fenretinid und all-trans-Retinsäure in Kombination eingesetzt, um mögliche synergistische oder antagonistische Effekte zu untersuchen.

Die Zelllinie SCLC-24H zeigte bei einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  4-HPR mit 1  $\mu\text{M}$  oder 10  $\mu\text{M}$  ATRA eine stärkere Hemmung als in den Einzelkonzentrationen, der Kombinationsindex liegt deutlich unter 1. Dies deutet auf einen synergistischen Effekt hin. Die Zelllinie NCI-H82 wies dagegen keine signifikante Veränderung auf.

Eine Schwierigkeit bei der Berechnung des Kombinationsindex ergab sich dadurch, daß mit den eingesetzten Konzentrationen der Einzelsubstanz ATRA keine Hemmung in der Größenordnung der Kombinationen erzielt werden konnte. Dies zwang zu der Annahme, daß die benötigte Einzeldosis für eine derartige Hemmung sehr hoch sein müßte und daher der zweite Term in der Berechnung des Kombinationsindex gegen Null gehe. Zusätzlich entfiel aus dem gleichen Grund die Möglichkeit, den Kombinationsindex alternativ nach der Gleichung für Drogen mit unterschiedlichem Wirkungsmechanismus zu berechnen (CHOU 1994, SACKS 1995). Dies erschien vertretbar, da der Kombinationsindex lediglich als Hinweis dienen sollte und mit Werten von 0,14 bzw. 0,068 deutlich unter der Grenze von 1,0 lag.

Die synergistische Wirkung ist interessanterweise nur in niedrigen Konzentrationen zu beobachten. Dies könnte daran liegen, daß Fenretinid in höheren Konzentrationen über

Apoptose inhibiert und so Wechselwirkungen mit ATRA, welches Differenzierung und Wachstumsstillstand induziert, überlagert werden. Dies wiederum macht eine Schwellenkonzentration zur Auslösung von Apoptose denkbar. Eher unwahrscheinlich ist dagegen, daß eine synergistische Wechselwirkung durch eine sehr starke Zellzahlreduktion lediglich vorgetäuscht wird: sinkt die Zelldichte zu weit unter den optimalen Bereich, ergäbe sich schon alleine durch die niedrige Zelldichte eine weitere Reduktion der Zellzahl, weil beispielsweise die Produktion autokriner Wachstumsfaktoren nicht mehr ausreichen würde. So könnte bei hohen Konzentrationen zweier stark wirkender Substanzen ein synergistischer Effekt nur vorgetäuscht werden. In diesem Fall lagen die Zellzahlen jedoch noch im optimalen Wachstumsbereich der Zelllinie SCLC-24H.

In der Literatur sind synergistische Effekte zwischen Fenretinid und ATRA beschrieben. So kann 4-HPR – auch hier wieder in Konzentrationen von 0,1 bis 1  $\mu\text{M}$  - in Kombination mit ATRA synergistisch bei der Differenzierung myeloischer Leukämie-Zelllinien wirken (TAIMI 1997, TAKAHASHI 1995), während es alleine kaum Differenzierung hervorruft (DELIA 1993, PONZONI 1995, TAKAHASHI 1995). Dabei erhöht 4-HPR die Retinoylierung (TAIMI 1997, TAKAHASHI 1995) und inhibiert den Katabolismus von all-trans-Retinsäure (TAIMI 1997). Die Retinoylierung von Proteinen durch ATRA ist wichtig bei der Differenzierung von Leukämiezellen (BREITMAN 1994). Zusätzlich könnte die Kombination der beiden Retinoide eine erhöhte Induktion des RAR $\beta$ -Rezeptors verursachen, der eine Rolle bei der Differenzierung und der Wachstums- hemmung spielt (FRANGIONI 1994, HOULE 1993, LIU 1996, PERGOLIZZI 1999, SABICHI 1998). Andererseits reagierten Ovarialkarzinom-Zelllinien auf eine Kombination von ATRA und 4-HPR nicht mit einem gesteigerten Rückgang der Zellzahl (ORIDATE 1997). Ein klinischer Einsatz der synergistischen Effekte mit ATRA wäre denkbar bei der Therapie der akuten Promyelozyten-Leukämie, wo sich nach großen Anfangserfolgen innerhalb kurzer Zeit durch vermehrten Katabolismus und Erhöhung der CRABPs eine Resistenz gegen all-trans-Retinsäure entwickelt (ADAMSON 1994, BREITMAN 1994). Ein weiterer interessanter Effekt wurde von Sacks et al. (1995) in der Kombination von ATRA mit Zytostatika gefunden. Nach Vorbehandlung von Plattenepithelkarzinom-Zelllinien mit ATRA war trotz Proliferationshemmung der Einbau von [3H]-Thymidin und der Anteil der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus unverändert oder sogar erhöht, so daß eine anschließende Chemotherapie mit Cisplatin oder 5-Fluoruracil synergistisch verstärkt wurde. Für 4-HPR sind synergistische Wirkungen mit Zyto-

statika bereits bei SCLC-Zelllinien mit Etoposide, Cisplatin und Paclitaxel (KALEMKERIAN 1999), mit Tamoxifen bei Mammakarzinom-Zelllinien (CORADINI 1997) und Kolonkarzinom-Zelllinien (ZIV 1994) oder Blasenkarzinom-Zelllinien mit  $\gamma$ -Bestrahlung (ZOU 1998a) beschrieben. Die relativ geringen toxischen Nebenwirkungen machen Fenretinid in der Kombinationstherapie attraktiv, allerdings sind auch tumorstimulierende Wirkungen *in vitro* bei Rektumkarzinom-Zelllinien bekannt (ZIV 1994).

## 4.5 Reversibilität der Wirkung von Fenretinid und all-trans-Retinsäure

Für den klinischen Einsatz einer Substanz ist es von entscheidender Bedeutung, ob ihre Wirkung nach Entzug noch anhält oder ob eine ständige Gabe nötig ist. Letzteres ist von all-trans-Retinsäure bereits bekannt und sollte nun auch für Fenretinid überprüft werden. Um eine Reversibilität der Wachstumshemmung durch Retinoide zu untersuchen, wurden Zellen der Linie NCI-H82 einer mittleren Konzentration von Fenretinid oder all-trans-Retinsäure ausgesetzt und die Wachstumskinetik mit der Zellzahlverdopplungszeit (pdt) bestimmt. Nach sechstägiger Behandlung mit den Retinoiden wuchsen die Zellen in retinoidfreiem Medium, und die Zellzahlverdopplungszeit wurde erneut berechnet.

Unter der Einwirkung der Retinoide, insbesondere von ATRA, stieg die Zellzahlverdopplungszeit sehr stark an. Nach Entzug von Fenretinid oder ATRA entsprach die Zellzahlverdopplungszeit wieder derjenigen der unbehandelten Kontrolle; das Wachstum der mit all-trans-Retinsäure vorbehandelten Zellen begann jedoch etwas verzögert verglichen mit Fenretinid oder der Kontrollbedingung.

Die Tatsache, daß die Inhibition durch Fenretinid reversibel ist, deutet darauf hin, daß ähnlich wie durch ATRA eine Zytostase verursacht wird, möglicherweise über den gleichen Mechanismus (s. auch 4.6.3). Die Zellen erholen sich von der Fenretinideinwirkung jedoch schneller. Die Ursache könnte in der geringeren Affinität von Fenretinid zur den Retinsäure-Rezeptoren, verglichen mit ATRA, liegen. Da aber ATRA ohne Apoptoseinduktion eine ähnlich starke Zellzahlreduktion wie 4-HPR in der Zelllinie NCI-H82 zu bewirken vermag, sind zusätzliche, rezeptorvermittelte Wirkmechanismen der all-trans-Retinsäure nicht auszuschließen. Die Apoptoseinduktion durch Fenretinid, die bereits innerhalb der ersten zwei Tage auftritt (s. 3.7.1), ist selbstver-

ständig nicht reversibel. Offensichtlich reagieren nicht alle Zellen einer Linie auf 4-HPR mit Apoptose (s. auch 4.6). Somit scheint 4-HPR zumindest zwei verschiedene Wirkungen auf Zellen auszuüben.

Auch in anderen Zelllinien kann die Hemmung durch 4-HPR (DELIA 1993, FAVONI 1998, SUPINO 1996) oder ATRA (LOVAT 1997) reversibel sein. Die Reversibilität des Fenretinideffektes muß bei einer Anwendung in der Chemoprävention berücksichtigt werden, da sie die ständige Einnahme der Droge erfordert.

## 4.6 Effekte durch kontinuierliche Fenretinidexposition

### 4.6.1 Kultivierung resistenter Zelllinien unter Fenretinid

Da im Rahmen der Reversibilitätsversuche nach sechstägiger Exposition gegen Fenretinid noch vitale Zellen existierten, sollte versucht werden, diese als Sublinien zu kultivieren und so der Frage nach der Dauer der Hemmwirkung und etwaiger weiterer Veränderungen nachzugehen. Von den Zelllinien NCI-H82 und SCLC-24H wurden daher die beiden Sublinien NCI-H82-HPR und SCLC-24H-HPR gezogen, die in 10 µM Fenretinid wuchsen und auch nach bis zu 18 Passagen noch vital waren und proliferierten. Die Zellen wurde zwischenzeitlich eingefroren und wuchsen nach dem Auftauen unverändert weiter.

Der Begriff ‚resistente Zelllinie‘ bezieht sich lediglich auf das Ausbleiben der Apoptose bei dieser Untergruppe der Zelllinien und ist daher nicht völlig korrekt. Eine Wachstumshemmung durch Fenretinid scheint gegeben, da die Wachstumsgeschwindigkeit in der Kulturhaltung verringert ist (s. auch 4.6.3). ‚Resistente Sublinien‘ gegen Fenretinid existieren auch von einer Mammakarzinom-Zelllinie (LEE 1999a), einer Neuroblastom-Zelllinie (LOVAT 2000), einer Ovarialkarzinom-Zelllinie (APPIERTO 2001) sowie einer RA-Rezeptor-defizienten Maus-Embryonalkarzinom-Zelllinie (CLIFFORD 1999). Die resistenten Sublinien könnten durch einen Vergleich mit der Ausgangslinie eventuell Aufschlüsse über die Wirkungsweise von 4-HPR geben. Wichtig wäre auch, die Quantifizierung des gegen Apoptose resistenten Anteils vorzunehmen.

### 4.6.2 Morphologische Veränderungen unter Fenretinid

Von all-trans-Retinsäure ist in der Literatur beschrieben, daß sie makroskopisch erkennbare Veränderungen der Zellmorphologie bewirken kann, die in der Regel Ausdruck einer Zelldifferenzierung sind. Es sollte deshalb untersucht werden, ob sich durch Fenretinid ebenfalls eine andere Zellmorphologie einstellt.

Nach längerer Einwirkung von 10 µM Fenretinid kam es bei den drei untersuchten Zelllinien, NCI-H526, NCI-H82-HPR und SCLC-24H-HPR, zu morphologischen Veränderungen. Die bisher in lockeren Aggregaten wachsenden, varianten Zellen formten dicht gepackte Kugeln, teilweise möglicherweise mit zentraler Nekrose. Diese Veränderungen traten bei der Zelllinie NCI-H526 bereits nach 10 Tagen auf, bei den resistenten Sublinien erst nach 10 bis 12 Passagen.

Die beschriebene neue Morphologie der Zellen ähnelt der Wuchsform Typ 1 nach Carney (CARNEY 1985), die bei klassischen Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms vorherrscht. Ähnliche morphologische Umwandlungen sind auch durch ATRA auslösbar, z.B. in der Zelllinie NCI-H82 (DOYLE 1989, HERRLINGER 1994, KALEMKERIAN 1994). Zu einer Expression neuroendokriner Marker im Sinne klassischer Subtypen kommt es dabei nicht (DOYLE 1989), wohl aber zur Expression klassischer Oberflächenantigene und einer Reduktion von c-myc sowie zu einer Expression von L-myc, welches sich bevorzugt in klassischen Subtypen findet (DOYLE 1989, HERRLINGER 1994, KALEMKERIAN 1994).

Die geschilderten Veränderungen der Wuchsform deuten über eine reine Wachstums- hemmung hinaus auf eine Induktion von Differenzierung hin. Über die Fähigkeit von 4-HPR zur Differenzierung liegen in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse vor. Keine oder sehr geringe Differenzierungsinduktion werden von Delia et al. (1993), Ponzoni et al. (1995) und bei SCLC-Zelllinien von Kalemkerian et al. (1995) beschrieben. In Mammakarzinom-Zelllinien dagegen erhöht 4-HPR Differenzierungsmarker wie LamininB1 und  $\beta$ 1-Integrin und senkt Tumorprogressionsmarker wie c-erb2-Rezeptor, EGF-Rezeptor und Laminin-Rezeptor, der mit Tumorzellinvasion in Verbindung gebracht wird (PELLEGRINI 1995). In Prostatakarzinomzellen senkt 4-HPR den Vimentin-Gehalt und damit verbunden Zellmotilität und Invasivität (KIM 1995, WEBBER 1994, s. auch TANABE 2000). Auch in Embryonalkarzinomzellen induziert 4-HPR ebenso wie ATRA LamininB1 und KollagenIV (CLIFFORD 1999); dies ist jedoch an das Vorhandensein funktioneller RA-Rezeptoren gebunden. Die Induktion von LamininB1 läßt sich durch die Anwesenheit eines RARE im Laminin-Promotor erklä-

ren, welches durch alle drei Retinsäure-Rezeptor-Typen induzierbar ist (SPORN 1991, VASIOS 1991). Andererseits induziert 4-HPR in Neuroblastomzellen Apoptose möglicherweise durch eine Reduktion der  $\beta$ 1-Integrin Expression, welches zur Anhaftung und somit zum Überleben der Zellen nötig ist (ROZZO 1997). Vergleichbares beobachteten Pangione et al. (2001) an Mammakarzinom-Zelllinien.

Interessanterweise wies die Zelllinie NCI-H526, die in eigenen Versuchen zwar durch 4-HPR, aber kaum durch ATRA hemmbar war, im Gegensatz zur ATRA-sensiblen NCI-H82 schon nach wesentlich kürzerer Zeit unter 4-HPR die morphologischen Umwandlungen auf. Dies könnte darauf hindeuten, daß Fenretinid die fragile Differenzierungsinduktion über andere Wege und Rezeptoren als ATRA bewerkstelligt oder aber eine höhere Wirksamkeit besitzt.

Ob die beobachteten morphologischen Veränderungen wirklich eine Differenzierung zum klassischen Zelltyp hin darstellen, sei es nun bezüglich der Oberflächeneigenschaften oder der neuroendokrinen Expression, müßte untersucht werden. Da der klassische Subtyp eine günstigere klinische Prognose zeigt (GAZDAR 1990, JOHNSON 1987, MINNA 1997), erscheint diese Fragestellung durchaus relevant, auch hinsichtlich einer möglicherweise veränderten Sensibilität auf Chemotherapeutika oder Bestrahlung. Zudem könnte ein erhöhter interzellulärer Kontakt, wie ihn die klassische Wuchsform aufweist, das Metastasierungspotential des varianten Subtyps positiv beeinflussen.

#### 4.6.3 *Einfluß von all-trans-Retinsäure oder retinoidfreiem Medium auf eine resistente Zelllinie*

Die Ergebnisse aus dem Reversibilitätsversuch zeigen, daß Fenretinid neben Apoptose eine Wachstumshemmung auslöst. Für einen therapeutischen Einsatz von Fenretinid ist die Stabilität dieser Wachstumshemmung über einen längeren Zeitraum hin natürlich von Interesse und sollte in einem Proliferationsassay mit R10-Medium gegen 4-HPR untersucht werden. Da die Zelllinie NCI-H82 auch durch ATRA in ihrer Proliferation inhibiert wird, sollte zudem der Frage nachgegangen werden, ob all-trans-Retinsäure in der resistenten Sublinie noch eine zusätzliche Hemmung hervorruft.

Die in 10  $\mu\text{M}$  Fenretinid wachsende Sublinie NCI-H82-HPR wurde in der zwölften Passage mit 10  $\mu\text{M}$  ATRA einzeln oder in Kombination mit 10  $\mu\text{M}$  4-HPR behandelt. Zusätzlich wurde das Wachstum der Zellen in reinem R10-Medium beobachtet.

Zwischen dem Zellwachstum in 4-HPR oder ATRA war kein Unterschied hinsichtlich der Zellzahl zu sehen. In der Kombination beider Retinoide sank die Zellzahl minimal, jedoch nicht statistisch signifikant. Ohne Retinoidzusatz dagegen verdoppelte sich die Zellzahl verglichen mit der 4-HPR-Probe.

Wie die deutlich höhere Zellzahl in R10-Medium zeigt, hält die Wachstumshemmung durch 4-HPR auch nach zwölf Passagen (ungefähr 16 Wochen) noch an und erfordert die kontinuierliche Anwesenheit der Substanz. Zumindest in dem hier untersuchten Zeitraum löst Fenretinid daher keine Resistenz gegen den zytostatischen Effekt aus. Im Gegensatz dazu kam es bei einer resistenten Ovarialkarzinom-Zelllinie, die in 5  $\mu\text{M}$  4-HPR kultiviert wurde, zu einem Ausbleiben der Wachstumshemmung, welches jedoch völlig reversibel war (APPIERTO 2001). Die Autoren fanden Hinweise auf einen nicht identifizierten Metaboliten von 4-HPR, so daß diese Form der Resistenz möglicherweise auf eine Änderung im Stoffwechsel zurückzuführen ist.

Das Phänomen der Kreuzresistenz zwischen zwei Retinoiden beschrieben Lee et al. (1999a) am Beispiel einer Mammakarzinom-Zelllinie. Die gegen 9-cis-Retinsäure resistente Zelllinie ließ sich nicht mehr durch 4-HPR hemmen, umgekehrt reagierte aber eine gegen 4-HPR resistente Mammakarzinom-Zelllinie noch auf 9-cis-Retinsäure. In dieser Arbeit tritt im Unterschied zur Ausgangslinie NCI-H82, die empfindlich auf ATRA reagiert, bei der Fenretinid-resistenten Sublinie keine zusätzliche Hemmung durch all-trans-Retinsäure auf. Dies läßt sich als ein Hinweis werten, daß die Zytostase in dieser Zelllinie bei beiden Substanzen durch den gleichen Mechanismus ausgelöst sein könnte.

## 4.7 Induktion von Apoptose durch Fenretinid

Eine Induktion von Apoptose durch Fenretinid wurde in zahlreichen Zelllinien gesehen; das synthetische Retinoid unterscheidet sich darin von der all-trans-Retinsäure. Da Apoptoseinduktion einen attraktiven Mechanismus in der Reduktion von Tumorzellen darstellt, sollte festgestellt werden, ob dieser Prozeß auch in SCLC-Zelllinien auftritt.

Dazu wurden zwei empfindliche Zelllinien (NCI-H82, SCLC-24H) und zusätzlich für den TUNEL-Test zwei der unempfindlicheren Zelllinien (NCI-H146, DMS79) sowie die resistente Sublinie NCI-H82-HPR ausgewählt. Der Nachweis von Apoptose in den Zelllinien, die mit Fenretinid oder ATRA behandelt wurden, erfolgte mittels AnnexinV-Assay 24 Stunden nach Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  4-HPR oder ATRA sowie zusätzlich eines TUNEL-Tests 48 Stunden nach Exposition von 5  $\mu\text{M}$  4-HPR oder ATRA.

Fenretinid erhöhte bei den Zelllinien NCI-H82 und SCLC-24H den Anteil der früh-apoptotischen Zellen (AnnexinV-positiv) sowie der spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen (AnnexinV und Propidiumiodid-positiven) um das circa Zehnfache. All-trans-Retinsäure veränderte die Verteilung der einzelnen Fraktionen nicht.

Die Translokation von Phosphatidylserin, an welches AnnexinV bindet, beginnt sehr früh im Apoptoseprozeß, noch vor der DNA-Fragmentierung und kurz nach Beginn der Caspasekaskade (ALLEN 1997, VAN ENGELAND 1998). Phosphatidylserin-Exponierung scheint spezifisch für Apoptose zu sein und tritt in vielen Zellen nach einer Vielzahl verschiedener Stimuli auf (MARTIN 1995). Fenretinid induziert somit im Gegensatz zu ATRA nach 24 Stunden Apoptose in den beiden untersuchten Zelllinien. Die Erhöhung der AnnexinV- und PI-positiven Fraktion kann sowohl primäre Nekrose als auch sekundäre Nekrose in der Folge von Apoptose bedeuten (ALLEN 1997). Ein zusätzlicher zytotoxischer Effekt durch Fenretinid, der zur Nekrose führen würde, kann also nicht ausgeschlossen werden. Nekroseinduktion durch 10  $\mu\text{M}$  4-HPR wurde auch für Neuroblastomzellen (MAURER 1999) und Maus-Embryonalkarzinom-Zelllinien (CLIFFORD 1999) beschrieben.

Die Ergebnisse des TUNEL-Tests bestätigen den AnnexinV-Assay. Hier wurde eine mittlere Konzentration der Retinoide gewählt, um zytotoxische und nekroseinduzierende Prozesse gering zu halten, da mit dieser Methode nicht sicher zwischen Apoptose und Nekrose unterschieden werden kann. Nach 48 Stunden war insbesondere in der Zelllinie NCI-H82 mit einer Erhöhung der Zahl der positiven Zellen von 5% auf 45% ein sehr starker Anstieg zu verzeichnen. In der gegen Fenretinid resistenten Zelllinie NCI-H82-HPR betrug die Zahl der apoptotischen Zellen dagegen nur 10%. Durch Behandlung mit ATRA veränderte sich der Apoptoseindex nicht. Der hohe Hintergrund an nekrotisch/ apoptotischen Zellen in der unbehandelten Probe der Zelllinie SCLC-24H ist für diese Zelllinie typisch und tritt auch unter normalen Kulturbedingungen auf. Dennoch verdoppelte sich durch Fenretinid die Zahl der positiven Zellen von 15% auf 30%. Auch in den beiden Zelllinien DMS79 und NCI-H146 stieg die



Zahl der apoptotischen Zellen an, allerdings geringer als in den empfindlicheren Zelllinien NCI-H82 und SCLC-24H.

Die Ergebnisse der Zelllinie NCI-H82-HPR scheinen zu bestätigen, daß ihre Resistenz gegen 4-HPR auf einer fehlenden Apoptoseinduktion beruht. Weitere Untersuchungen sollten folgen, um diesen Hinweis zu überprüfen. Die schwächere Reaktion der Zelllinien DMS79 und NCI-H146 auf 4-HPR kann ebenfalls mit einer geringeren Apoptoseinduktion zusammenhängen. Interessanterweise zeigte die Zelllinie SCLC-24H, deren Zellzahl in vergleichbarem Ausmaß wie bei der Zelllinie NCI-H82 durch 4-HPR reduziert wird, einen geringeren Apoptoseindex. Dies ließe sich durch eine stärkere zytostatische Wirkung von Fenretinid auf SCLC-24H erklären. Auch hier wären zusätzliche Versuche nötig, um den Beitrag der Apoptose und der Zytostase zur Zellzahlreduktion genauer zu bestimmen.

Fenretinid kann bei vielen Zelllinien Apoptose auslösen, wie zum Beispiel in SCLC-Zelllinien (KALEMKERIAN 1995), NSCLC-Zelllinien (SUN 1999b, ZOU 1998b), HNSCC-Zelllinien (EICHER 1996, ORIDATE 1996, SCHER 1998), Gliomen (PUDUVALLI 1999, SAITOH 1999), Prostatakarzinom-Zelllinien (HSIEH 1997, ROBERSON 1997, SHEN 1999, SUN 1999a, WEBBER 1999), T-Zell-Lymphomen (CHAN 1997a, PIEDRAFITA 1997), myelischen Leukämiezellen (DELIA 1997, DIPIETRANTONIO 1996), Melanom-Zelllinien (MONTALDO 1999), Mammakarzinom-Zelllinien (PELLEGRINI 1995, SHEIKH 1995, WANG 1996), Neuroblastom-Zelllinien (DIVINCI 1994, PONZONI 1995, REYNOLDS 1997), Zervixkarzinom-Zelllinien (ORIDATE 1995) und Ovarialkarzinom-Zelllinien (GURUSWAMY 2001, SABICHI 1998, SUPINO 1996). In diesen Zelllinien kann ATRA häufig keine Apoptose bewirken (DIVINCI 1994, EICHER 1996, ORIDATE 1997) oder nur in höheren Dosen und nach längerer Behandlungsdauer (CHIANTORE 1999, CLIFFORD 1999, ORIDATE 1995, PONZONI 1995, POOT 1999).

Der Mechanismus, über den 4-HPR Apoptose induziert, ist derzeit letztlich unbekannt. In der Literatur liegen widersprüchliche und wenig eindeutige Ergebnisse vor. Ein Zusammenhang zur Regulation über die bcl-2-Familie, welche anti-apoptotisch wirkt (FANIDI 1992, HARRINGTON 1994, ROWAN 1997), wird von einigen Autoren vermutet (SHEN 1999, WANG 1996), ist jedoch nicht immer zu beobachten (ORIDATE 1997, SUN 1999a, ZOU 1998b). An welcher Stelle einer kausalen Kette eine Herunterregulation der bcl-2 Expression steht, bleibt ungeklärt (DELIA 1995). Eine Veränderung der p53-Expression scheint keine direkte Rolle zu spielen (DELIA 1995, SUN 1999a, ZOU 1998b),

ebensowenig konnte eine Induktion des Fas-Apoptose-Weges beobachtet werden (CHEN 1999).

Die Induktion von Apoptose könnte für ATRA oder 9-cis-Retinsäure über RA-Rezeptoren vermittelt werden (FESUS 1996, LIU 1996, LIU 1998, MEHTA 1996). Die vermuteten beteiligten RA-Rezeptoren variieren jedoch in den unterschiedlichen Zelllinien. 4-HPR interagiert mit RAR $\beta$  und RAR $\gamma$  (Transkription) und mit RAR $\alpha$ , RAR $\beta$  und RXR $\alpha$  (Transrepression) (FANJUL 1996) und kann in einigen Zellen RAR $\gamma$  oder RAR $\beta$  hochregulieren (FANJUL 1996, KAZMI 1996, SABICHI 1998). Es finden sich aber nur schwache Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen RAR $\beta$ -Expression und Hemmung durch 4-HPR (SABICHI 1998, SUN 1999a, ZOU 1998b); zudem wird in den meisten Arbeiten nicht Apoptose, sondern lediglich die Zellzahl als Parameter bestimmt. RAR $\gamma$  wird ebenfalls in Verbindung mit Apoptoseinduktion gebracht. Inzwischen wurde eine Reihe von RAR $\gamma$ -selektiven, synthetischen Retinoiden getestet, die Apoptose auslösen können (LU 1997, LU 1999). Ob wirklich die Wechselwirkungen mit RAR $\gamma$  dafür verantwortlich sind, bleibt fraglich. In einer Reihe von Zelllinien ergab sich kein Zusammenhang zwischen der RA-Rezeptor-Expression und einer Reaktion auf 4-HPR oder anderer synthetischer Retinoide (SUN 1997, SUN 1999a, ZOU 1998b). Apoptose konnte nicht durch RA-Rezeptorantagonisten verhindert werden (ORIDATE 1997, KITAREEWAN 1999, SUN 1999a, SUN 1999b) und trat auch in rezeptordefizienten Zellen auf (CLIFFORD 1999, GIANDOMENICO 1999, KITAREEWAN 1999). In Neuroblastom-Zelllinien allerdings konnte die Apoptoserate durch RAR $\beta$ - und RAR $\gamma$ -Antagonisten gesenkt werden (LOVAT 2000). Es scheint somit zumindest ein zusätzlicher Weg der Apoptoseauslösung durch 4-HPR zu existieren, der unabhängig von RA-Rezeptoren verläuft.

Der von 4-HPR ausgelöste Apoptoseweg bewirkt eine Induktion von Caspasen (DIPIETRANTONIO 2000, PUDUVALLI 1999, PIEDRAFITA 1997) und kann durch einen Pancaspase-Inhibitor unterdrückt werden (MAURER 1999). Auch Ceramide wurden nach einer Behandlung mit Fenretinid erhöht (DIPIETRANTONIO 1998, MAURER 1999, MAURER 2000, PANGINONE 2001, REED 1999). Sie kennzeichnen jedoch keinen spezifischen Apoptoseweg, sondern können sowohl durch Membranschäden als auch durch andere Stimuli hervorgerufen werden (KOLESNICK 1998, REED 1999, ROWAN 1997, WYLLIE 1997). Ein Teil der sensiblen Zellen reagiert mit der Produktion von reaktiven oxidativen Substanzen (ROS). Durch Zugabe antioxidativer Substanzen kann teilweise Apoptose verhindert werden (CLIFFORD 1999, DELIA 1997, DIPIETRANTONIO 2000, LOVAT 2000, MAURER 1999, ORIDATE 1997, SUN 1999a). ROS können aber nicht

nur Apoptose bewirken, sondern entstehen auch im Gefolge vieler apoptotischer Prozesse (GREEN 1998, WYLLIE 1997) oder von Nekrose (GREEN 1998), so daß die Frage nach dem primären Angriffsort dadurch nicht geklärt werden kann. Ein Zusammenhang zur Caspase-3-Induktion durch 4-HPR konnte zudem nicht gefunden werden (DIPIETRANTONIO 2000, LOVAT 2000). Nach neueren Hinweisen scheint 4-HPR an der Mitochondrienmembran zwischen Komplex II und Komplex III anzugreifen, auf diese Weise die Cytochrom C- und Caspase-3-Aktivität zu erhöhen und konsekutiv den Zelltod hervorzurufen (HAIL 2000, LOVAT 2000, SUZUKI 1999).

Ob Fenretinid Apoptose über einen oder mehrere Mechanismen in Abhängigkeit von der jeweiligen Zelllinie auslöst, kann auf der Grundlage der vorliegenden Ergebnisse nicht beantwortet werden.

#### 4.8 Expression von IGFBP-2

Die Insulin-like-Growth-Factors IGF-I und IGF-II stellen für eine Vielzahl von Zellsystemen bedeutende mitogene Faktoren dar. Sie spielen eine wesentliche Rolle für das Wachstum von Bronchialkarzinom-Zelllinien, die über eine Produktion und Sekretion von IGFs eine autokrine und parakrine Stimulation erzielen. IGF-Bindungsproteine binden mit hoher Affinität an die IGFs und können so deren Verfügbarkeit und Metabolismus regulieren. Neben zahlreichen anderen Faktoren wird die Expression dieser IGFBPs durch Retinoide auf Protein- und mRNA-Ebene beeinflusst. Dies wurde für Bronchialkarzinom-Zelllinien von Noll (1998) u.a. mit all-trans-Retinsäure gezeigt; für Fenretinid sind bisher keine Ergebnisse bekannt. Um daher einen Einfluß von Fenretinid auf die Verfügbarkeit der Insulin-like-Growth-Factors nachzuweisen, wurde die Regulation von IGFBP-2 durch Fenretinid oder all-trans-Retinsäure im Rahmen dieser Arbeit untersucht. IGFBP-2 stellt das am häufigsten sezernierte IGFBP der kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien dar (JAQUES 1989, KIEFER 1991, REEVE 1992) und ist häufig im Serum von Tumorpatienten erhöht (BLUM 1993, COHEN 1994, RAJARAM 1997, REEVE 1993), so auch bei Lungentumoren (LEE 1999b, REEVE 1992a).

Zur Bestimmung der Proteinsekretion von IGFBP-2 wurden Zellen der Zelllinien SCLC-24H, NCI-H82 und NCI-H82-Fenres mit Retinoiden stimuliert und die konditionierten Medien im Western-Ligand-Blot analysiert. Die mRNA-Expression von IGFBP-2 wurde nach Stimulation mittels RT-PCR untersucht.

Die Zelllinie NCI-H82 reagierte auf die Behandlung mit 1  $\mu$ M ATRA mit einer verminderten Proteinsekretion sowie mRNA-Expression von IGFBP-2. Fenretinid hingegen rief bei derselben Zelllinie auf Ebene der mRNA-Expression keine Änderung der IGFBP-2 Expression hervor, wohl aber eine verminderte Proteinsekretion. Die Zelllinie SCLC-24H wies unter der ATRA-Behandlung einen schwachen Anstieg des IGFBP-2-Protein- und mRNA-Gehaltes auf. Fenretinid bewirkte hier keine einheitliche Tendenz: während sich die IGFBP-2-Proteinsekretion leicht erhöhte, blieb die mRNA-Expression unverändert. Da sich die Ergebnisse lediglich leicht von denen der Kontrolle unterschieden, erscheint eine Interpretation nicht sinnvoll. In der resistenten Zelllinie NCI-H82-HPR kam es in Anwesenheit von Fenretinid zu einer stark erhöhten IGFBP-2-Sekretion im Überstand und auch die mRNA-Expression war gesteigert; allerdings ließ sich auch bei einer einzelnen der zahlreichen Kontrollproben eine sehr hohe mRNA-Expression finden, so daß dieses Ergebnis nur als Tendenz aufgefaßt werden kann und weiterer Untersuchung bedarf.

Die Verminderung der IGFBP-2-Expression durch ATRA in der Zelllinie NCI-H82 und die fehlende Reaktion der Zelllinie SCLC-24H stimmen mit den Ergebnissen von Noll (1998) überein. Allerdings wurde dort die mRNA-Expression nach Stimulation in serumfreiem ST-Medium untersucht. Dies könnte die deutlicher ausgeprägten Veränderungen erklären: eine stärkere Regulation von IGFBP-2 in serumfreiem Medium beschreibt bereits Cohick et al. (1995). Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse lassen keinen Rückschluß auf die Ursache der Expressionsveränderung zu. So kann die Reduktion der mRNA-Expression sowohl durch eine verminderte Expression als auch durch eine veränderte Halbwertszeit der RNA herrühren und müßte in weitergehenden Versuchen untersucht werden. Um zu klären, ob die verringerte Proteinsekretion posttranslational durch eine gesteigerte Proteolyse zustande kommt, müßte zusätzlich ein Western-Immunoblot durchgeführt werden. Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen deuten darauf hin, daß die Regulation der IGFBP-2-Expression posttranskriptionell zumindest teilweise über eine Veränderung der mRNA-Halbwertszeit und eine gesteigerte Proteolyse (CHAMBERY 1998, MENOUNY 1998, SHEIKH 1993) erfolgt.

IGFBP-2 kann über eine Bindung an IGFs sowohl mitogen als auch wachstumshemmend wirken (JAQUES 1993, KELLEY 1996, RAJARAM 1997). Beispiele für eine mitogene Wirkung bei Stimulation der IGFBP-2-Konzentration finden sich bei Adamo (1992), Chambery (1998), Chen (1994), Menouny (1998) und Slootweg (1995). Möglicherweise

wirkt nur das Zellmembran-assoziierte IGFBP-2 mitogen (KELLEY 1996). Bei Patienten mit einer Reihe unterschiedlicher Tumoren, darunter auch das Bronchialkarzinom, sind die Serumspiegel von IGFBP-2 erhöht (COHEN 1994, LEE 1999b, MENOUNY 1998, RAJARAM 1997, REEVE 1993).

Über eine Regulation von IGFBP-2 durch Fenretinid liegen in der Literatur keine Angaben vor. Von all-trans-Retinsäure ist dagegen bekannt, daß sie im Rahmen einer Wachstumshemmung oder Differenzierung die Expression von IGFBP-2 reduzieren kann; dies geschieht vorwiegend posttranskriptionell über Veränderung der mRNA-Halbwertszeit oder Proteinexpression (BERNARDINI 1994, CHAMBERY 1998, SHEIKH 1993). Allerdings wurde eine Verminderung von IGFBP-2 auch bei einer Wachstumsstimulation durch ATRA beobachtet (BABAJKO 1996, MENOUNY 1997, NABEYRAT 1998). Diese Stimulation trat jedoch im Falle der Neuroblastomzellen nur vorübergehend auf und wurde von einer Differenzierung und Wachstumshemmung gefolgt (BABAJKO 1996). Dieser Überblick über die Literaturdaten soll verdeutlichen, daß die Regulation von IGFBP-2 durch Retinoide stark Zelltyp abhängig zu sein scheint und ein Vergleich der Arbeiten durch die unterschiedlichen Versuchsparameter zusätzlich erschwert wird. So beeinflußt beispielsweise der Serumgehalt des verwendeten Mediums stark die Wirkung des Retinoids auf die Zellproliferation, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Die Veränderung der IGFBP-2 Expression durch ATRA läßt somit keinen Rückschluß auf dessen Wirkungsweise zu. Eine Wachstumshemmung durch ATRA könnte einerseits im Sinne einer Gegenregulation der Zelle eine versuchte Stimulation über IGF-I oder IGF-II hervorrufen. Dies wäre über eine gesteigerte Proteolyse eventuell hemmender IGFBPs, wie beispielsweise IGFBP-2, denkbar. Andererseits könnte auch die Proliferationshemmung durch das Retinoid über die Verminderung eines - möglicherweise indirekt mitogen wirkenden - IGFBP-2 zumindest mitvermittelt werden. Fenretinid veränderte dagegen in dieser Arbeit die IGFBP-2 Konzentration trotz Inhibition des Zellwachstums nicht. Dies läßt sich als Hinweis interpretieren, daß die Wachstumshemmung, die Fenretinid zusätzlich zur Apoptose auslöst, über einen anderen oder weiteren Mechanismus läuft bzw. daß die Regulation von IGFBP-2 im Zusammenhang mit einer von ATRA induzierten Differenzierung zu sehen wäre.

## 4.9 Zusammenfassung der Fenretinid-Wirkungen

In dieser Arbeit konnte in allen zwölf untersuchten kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien eine Verringerung der Zellzahl durch Fenretinid beobachtet werden. Dafür scheinen mehrere, unterschiedliche Prozesse verantwortlich zu sein.

Ein Teil dieser Zellzahlreduktion ist auf eine Induktion von Apoptose, die in vier von zwölf Zelllinien untersucht und nachgewiesen wurde, zurückzuführen. Fenretinid unterscheidet sich durch diese Apoptoseinduktion von all-trans-Retinsäure. Nicht in allen Zellen einer Linie kann Fenretinid jedoch Apoptose auslösen, wie die Existenz der beiden Fenretinid-resistenten Sublinien (s. 4.6) ebenso zeigt wie die Reversibilität der Fenretinid-Wirkung in der Zelllinie NCI-H82 (s. 4.5). Die Ergebnisse des Synergismus-Versuches (s. 4.4) deuten zudem darauf hin, daß Apoptose erst ab einer höheren Konzentration einen nennenswerten Beitrag zur Zellzahlreduktion liefert. Obgleich die Induktion von Apoptose Fenretinid attraktiv für einen chemopräventiven Einsatz macht, sollte deren Bedeutung daher nicht überschätzt werden, zumal nicht bekannt ist, ob die hier verwendete Maximalkonzentration von 10 µM in Lungentumorgewebe *in vivo* erreicht werden kann.

Zusätzlich zur Apoptose übt Fenretinid auch eine zytostatische Wirkung auf die SCLC-Zelllinien aus, die nach Entfernen des Retinoids reversibel ist, aber auch nach mehrwöchiger Exposition noch anhält, wie sich in den Versuchen mit der resistenten Sublinie zeigt. Die Zytostase könnte über den gleichen Mechanismus wie bei ATRA vermittelt werden, da sich bei der Fenretinid-resistenten Sublinie keine zusätzliche Zellzahlreduktion durch ATRA ergibt. An dieser Stelle soll auf die in zwei Zelllinien nachgewiesene Wachstumstimulation unter 1 µM Fenretinid hingewiesen werden. Ein ähnliches Phänomen sahen bereits Ravi et al. (1995) mit 1 µM all-trans-Retinsäure an zwei kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien. Sie konnten zeigen, daß das vermehrte Wachstum auf eine Steigerung der GRP-Expression, einem potenten Wachstumsfaktor für SCLC-Zelllinien, zurückzuführen war.

Die morphologischen Veränderungen, die nach längerer Fenretinidexposition auftreten, können Anhaltspunkte dafür sein, daß eine Differenzierungsinduktion ebenfalls zur Proliferationshemmung beiträgt. Bemerkenswert dabei ist, daß auch eine ATRA-unsensible Zelllinie bereits sehr früh auf Fenretinid mit einer Veränderung der Zellmorphologie reagierte. Dies ließe sich als Hinweis werten, daß eine Differenzierung durch Fenretinid über andere Rezeptoren als bei ATRA hervorgerufen würde. Inwieweit

allerdings eine Differenzierung auf molekularer Ebene vorliegt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden.

Schließlich scheint Fenretinid in hohen Konzentrationen zytotoxisch zu wirken und Nekrose auszulösen, wie die Ergebnisse des AnnexinV-Assays zeigen. Dieser Effekt dürfte aber bei den klinisch erreichbaren Konzentrationen keine nennenswerte Rolle spielen.

Die Übertragbarkeit der *in vitro* gefundenen Ergebnisse auf die Situation *in vivo* wird durch die in dieser Arbeit gesehene Wachstumstimulation in zwei Zelllinien und die Serumabhängigkeit der Wirkung erschwert. Die im serumfreien Medium beobachtete deutlich Dosischwelle, ab der die Zellzahlreduktion festzustellen ist, läßt zudem die Frage offen, ob dafür alleine ein Konzentrationseffekt verantwortlich ist oder nicht noch andere Mechanismen im serumfreien Medium auftreten.

Die Wirkmechanismen von Fenretinid sind immer noch ungeklärt. Dies ist nicht nur für maligne Tumorzelllinien von Bedeutung, sondern letztlich auch für normale untransformierte Zellen. *In vitro* Ergebnisse zeigten nämlich eine durchaus vergleichbare Inhibition und Apoptoseinduktion in normalen humanen Bronchialepithel-Zelllinien wie in NSCLC-Zelllinien (ZOU 1998a). Im Gegensatz dazu konnte in normalen humanen dermalen Fibroblasten keine Wachstumshemmung oder Apoptose ausgelöst werden (ULUKAYA 2001). Dieser Aspekt wäre natürlich für einen klinischen Einsatz höchst relevant, eine generelle zytotoxische Reaktion wurde allerdings an Tiermodellen in der Literatur nicht beschrieben.

## 4.10 Ausblick

Hinter der Zellzahlreduktion durch Fenretinid verbirgt sich somit eine Reihe verschiedener Prozesse, die einer weitergehenden Klärung bedürften.

Um die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der einzelnen Zelllinien auf Fenretinid besser zu verstehen, könnte es zum einen hilfreich sein, den Beitrag des jeweiligen Prozesses an der Wachstumshemmung zu quantifizieren. Dies betrifft insbesondere den Anteil der Apoptose am Zellzahlrückgang. Offene Fragen sind hier neben dem generellen Mechanismus z.B. die unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Zellen und Zelllinien, eine Konzentrationsabhängigkeit des Auftretens von Apoptose oder ein regelmäßiger Zusammenhang von Apoptose zur Produktion reaktiver oxidativer Substanzen (ROS). Diese Ergebnisse könnten zum Verständnis beitragen, ob

Fenretinid in allen Zelllinien eine wirkliche Wachstumsreduktion bewirkt oder lediglich einen Stillstand des Tumorwachstums hervorrufen kann.

Um das Phänomen der Zytostase im Sinne einer allgemeinen Wachstumshemmung besser zu verstehen, sollten weitere Proliferationsparameter wie z.B. eine Zellzyklusanalyse oder eine Messung des [3H]-Thymidin-Einbaus eingesetzt werden. Gerade für eine Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika könnten sich daraus interessante Anhaltspunkte ergeben. Aber auch die Frage, welche Vorgänge die teilweise gefundene Wachstumstimulation in bestimmten Konzentrationsbereichen auslösen, ließe sich eventuell dadurch mitbeantworten.

Desweiteren müßte sich eine Untersuchung auf molekularbiologischer Ebene anschließen, ob bei den beobachteten morphologischen Veränderungen der SCLC-Zellen ein Übergang vom varianten zum klassischen Subtyp im Sinne einer wirklichen Differenzierungsinduktion erfolgt; dieser könnte sich in einer veränderten Sensibilität auf Chemotherapeutika oder Bestrahlung bemerkbar machen oder das Metastasierungspotential günstig beeinflussen und wäre daher auch klinisch relevant.

Da eine Anreicherung von Fenretinid im Lungengewebe zwar denkbar ist, aber noch keine konkreten Daten dazu vorliegen, wäre es für eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den Zellkulturversuchen auf die Situation *in vivo* sinnvoll, im Tiermodell Konzentrationsbestimmungen der Substanz im Lungenepithel vorzunehmen.

Den entscheidenden Maßstab für die Wirkungen von Fenretinid stellen letzten Endes aber die klinischen Studien dar. Nach guten Erfolgen *in vitro* und in Tiermodellen fehlen in der sekundären Chemoprävention bisher überzeugende Erfolge (s. Kapitel 1.2). Die in dieser und anderen Arbeiten beobachtete Wachstumstimulation durch Retinoide machen eine sehr sorgfältige Prüfung in klinischen Studien nötig, um so mehr bei einer rein präventiven Anwendung der Substanz. Dies zeigte sich bereits an den überraschenden Ergebnissen der CARET-Studie, bei der eine erhöhte Tumorzinzidenz durch Retinoidbehandlung auftrat (OMENN 1996). Auch die nötige Daueranwendung aufgrund der Reversibilität des Effektes muß bei einer präventiven Therapie berücksichtigt werden.

In der Behandlung von (dermatologischen) Präkanzerosen wie Leukoplakie und aktinischer Keratinose zeigte Fenretinid bisher gute Erfolge (COSTA 1995, MOGLIA 1996). Ein vielversprechendes Anwendungsgebiet könnte auch in der Kombination mit bekannten Zytostatika liegen, da möglicherweise synergistische Effekte auftreten. Wegen seiner geringen toxischen Nebenwirkungen ist Fenretinid für eine Dauerthe-



rapie zudem gut geeignet. Da Fenretinid im Gegensatz zu all-trans-Retinsäure die Proliferation in einer großen Anzahl von kleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinien hemmt, bleiben die Ausgänge der laufenden Studien, die Bronchialkarzinome beinhalten, mit Spannung abzuwarten.

## 5 Zusammenfassung

Bronchialkarzinome bieten sich aufgrund ihrer hohen Mortalitätsrate und unbefriedigender Therapierbarkeit für eine chemopräventive Behandlungsstrategie an. Unter den vielfach eingesetzten Retinoiden scheint sich dafür besonders das synthetische Retinoid Fenretinid (4-HPR) zu eignen, da es über eine Proliferationshemmung und Differenzierungsinduktion hinaus in vielen Tumor-Zelllinien Apoptose auslöst, ohne die für Retinoide typischen starken Nebenwirkungen aufzuweisen. Eine Reihe klinischer Studien mit 4-HPR wird derzeit unternommen. Die Wirkungsweise von 4-HPR ist jedoch noch ungeklärt.

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Wirkung von 4-HPR auf das Wachstum kleinzelliger Bronchialkarzinom-Zelllinien (SCLC). Zwölf SCLC-Zelllinien sollten auf eine Wachstumshemmung durch 4-HPR und auf das Auftreten von Apoptose untersucht werden. Die Wirkung wurde mit der von all-trans-Retinsäure (ATRA) verglichen und die Abhängigkeit vom Serumgehalt bestimmt. Hinsichtlich eines klinischen Einsatzes sollte die Proliferationshemmung auf eine Reversibilität sowie auf einen möglichen synergistischen Effekt mit ATRA hin überprüft werden. Zudem sollten unter einer dauerhaften Fenretinid-Exposition eventuelle morphologische Veränderungen und die Stabilität der Hemmung beobachtet werden. Schließlich wurde dem Einfluß von 4-HPR auf das IGF-System über eine Regulation der IGFBP-2-Expression nachgegangen, da Retinoide in die Expression der IGFs und deren Bindungsproteine eingreifen können und einen Teil ihrer Wirkung auf diese Weise vermitteln.

Zur Bestimmung der Inhibitionsfraktion wurde die Zellzahl in einem Proliferationsassay mit einem Coulter Counter ermittelt. Das Auftreten von Apoptose wurde in vier Zelllinien mit einem TUNEL-Test sowie durchflußzytometrisch mit einem AnnexinV-Assay nachgewiesen. Eine Veränderung der Expression von IGFBP-2 wurde mittels RT-PCR und Western-Ligand-Blot untersucht.

Alle zwölf SCLC-Zelllinien zeigten eine Zellzahlreduktion durch 4-HPR, die IC<sub>50</sub>-Werte lagen zwischen 4,5 und über 10 µM. Zwei Zelllinien wurden zusätzlich bei 1 µM 4-HPR in ihrem Wachstum stimuliert. ATRA konnte dagegen nur in einer der vier untersuchten Zelllinien das Wachstum hemmen. Die Inhibition durch 4-HPR oder ATRA war in serumfreiem SIT-Medium deutlich ausgeprägter; dieser Effekt ließ sich durch Zugabe von Rinder-Serumalbumin rückgängig machen. Sowohl die Wachstumshemmung durch 4-HPR wie auch ATRA, gemessen an der Zellzahlverdopplungszeit,

war nach Entzug der Droge völlig reversibel. In der Kombination von niedrigen Konzentrationen ATRA mit 4-HPR war in 1/2 Zelllinien eine synergistische Wirkungsverstärkung zu beobachten. Von zwei Zelllinien (NCI-H82 und SCLC-24H) konnten unter der maximalen 4-HPR Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  über 12 bzw. 18 Passagen stabile „Fenretinid-resistente“ Sublinien gezüchtet werden. Diese sowie eine weitere Zelllinie zeigten nach Tagen bis Wochen morphologische Veränderungen, die dem klassischen SCLC-Subtyp entsprechen und sich als Differenzierungsinduktion interpretieren lassen. Die zytostatische Wirkung von 4-HPR war in der Sublinie NCI-H82-HPR auch nach mehreren Wochen noch nachweisbar. Apoptose trat in 4/4 Zelllinien auf, während die untersuchte Sublinie NCI-H82-HPR einen nur schwach erhöhten Apoptoseindex aufwies. Fenretinid veränderte die Expression von IGFBP-2 nicht nachweisbar, ATRA dagegen senkte in einer Zelllinie die Proteinsekretion und den mRNA-Gehalt.

Fenretinid trägt somit auf verschiedenen Wegen zur Zellzahlreduktion bei: 1. Eine zytostatische Wirkung, die der kontinuierlichen Anwesenheit des Retinoids bedarf und möglicherweise über den gleichen Weg wie bei ATRA vermittelt wird. 2. Apoptose, die jedoch nicht in allen Zellen innerhalb einer Zelllinie auftritt, wie die Existenz der „resistenten“ Sublinien zeigt. 3. Vermutlich Differenzierungsinduktion, wie die morphologischen Veränderungen nahelegen. Fenretinid ist ATRA hinsichtlich der Effektivität und der geringeren Toxizität überlegen; die aufgetretenen synergistischen Effekte könnten eine weitere attraktive Verwendungsmöglichkeit für 4-HPR darstellen. Nachteilig für einen klinischen Einsatz sind dagegen die teilweise aufgetretene Stimulation, die Reversibilität sowie die Serumabhängigkeit der Wirkung. Die Ergebnisse größerer klinischer Studien bleiben daher mit Spannung abzuwarten.

# Anhang

## Abkürzungsverzeichnis

4-HPR	Fenretinid, N-4-(hydroxyphenyl)retinamid
APUD	Amine Precursor Uptake and Decarboxylation
ATRA	all-trans-Retinsäure
BLI	Bombesin-like Immunoreactivity
BSA	Rinder-Serumalbumin
CI	Kombinationsindex
CK-BB	BB-Isoenzym der Kreatinkinase
CRABP	Zelluläres Retinsäure-Bindungsprotein
CRBP	Zelluläres Retinol-Bindungsprotein
DAB	Diaminobenzidin
DDC	L-DOPA-Decarboxylase
DMSO	Dimethylsulfoxid
FCS	Fetales Kälber Serum
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Cancer
IC50	Fünzigprozentige Inhibitionskonzentration
IGF	Insulin-like-Growth-Factor
IGFBP	Insulin-like-Growth-Factor-Bindungsprotein
MPR	N-4-(methoxyphenyl)retinamid
NCI	National Cancer Institute
NSCLC	Non Small Cell Lung Cancer
NSE	Neuron-spezifische Enolase
pdt	Zellzahlverdopplungszeit
PI	Propidiumiodid
R10	RPMI 1640 mit 10 % Fetales Kälberserum
RAR	Retinsäure-Rezeptoren, Klasse A
RARE	Retinsäure-Rezeptor-Response-Element
RBP	Retinol-Bindungsprotein
ROS	Reaktive oxidative Substanzen
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
RXR	Retinsäure-Rezeptoren, Klasse X
SCLC	Small Cell Lung Cancer
SDS	Natrium-dodecylsulfat
SIT	Selen-Insulin-Transferrin-Medium
ST	Selen-Transferrin-Medium
TGFβ	Transforming-Growth Factor
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
tTGA	Gewebe-Transglutaminase

## Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. Wolf und Frau Priv.-Doz. Dr. Jaques gilt mein Dank für die Themenstellung und hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Nicht nur half Frau Jaques geduldig beim Erlernen der verschiedenen Methoden der Zellbiologie und Biochemie, sondern stand auch jederzeit für anregende Diskussionen zur Verfügung, um mir dennoch Freiraum zur Bearbeitung der Fragestellungen zu gewähren. Gemeinsam mit meinem Mitstreiter Carsten Ohlmann durchschritt ich die Untiefen des Laboralltages. Er war stets eine Hilfe in all den kleineren und größeren Katastrophen und mit Anregungen zur Stelle. Ohne ihn hätte die Sache nur halb so viel Spaß gemacht. Ein offenes Ohr für alle praktischen Fragen besaß Cordula Löchelt, die mir mit Rat und Tat zur Seite stand. Almut Wachtel hielt immer eine „Flasche“ aus der Zellkulturstammhaltung parat. Beiden möchte ich für ihre Unterstützung herzlich danken. Frau Dr. Barbara Reckzeh danke ich an dieser Stelle für die freundliche Einarbeitung in die Bedienung des FACScans.

Neben guten Arbeitsbedingungen und guter fachlicher Betreuung ist auch „moralische“ Unterstützung für eine solche Arbeit unabdingbar. Hier sei vor allem meinen Eltern und meiner Schwester für ihre fortwährende Unterstützung und ihr Interesse gedankt. Für ihre kritischen und konstruktiven Anmerkungen in der Schlußphase der Arbeit danke ich Katrin, die sich tapfer dem Fach-Chinesisch gestellt hat. Gleiches gilt für Elko, der mit seinen gestalterischen und sprachlichen Fähigkeiten die Arbeit aufpoliert hat und – viel wichtiger noch – mich während der ganzen Zeit der Hochs und Tiefs geduldig ertragen hat. Ihm gilt mein besonderer Dank.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Bertalanffy, Bien, Czubayko, Daut, Fuhrmann, Geus, Gotzen, Gressner, Griss, Happle, Hielscher, Joseph, Kälble, Kern, Klenk, Klose, Koolmann, Kroll, Krieg, Kuni, Lang, Lange, Lennartz, Maisch, Mennel, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Örtel, Pfab, Remschmidt, Richter, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schüffel, Schulz, Seitz, Seyberth, Slenczka, Steiniger, Thomas, Voigt, von Wichert, Weihe, Werner.

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Wirkungen des Retinoids Fenretinid auf Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms“ im Medizinischen Zentrum für Innere Medizin unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med A. Neubauer mit Unterstützung durch Frau Priv.-Doz. Dr. Jaques ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt. Vorliegende Arbeit ist bei folgendem Publikationsorgan veröffentlicht worden: Ohlmann, C.-H., Jung, C. & Jaques, G., 2002, Is growth inhibition and induction of apoptosis in lung cancer cell lines by fenretinide sufficient for cancer therapy?, Int. J. Cancer 100 (5), 520-6.

Marburg, den 21.11.2002

## 6 Literaturverzeichnis

- Abou-Issa, H.M., Alshafie, G.A., Curley, R.W.J., Wong, M.F., Clagett-Dame, M., Repa, J.J. & Sikri, V. (1999) Chemopreventive activity of a C-glucuronide analog of N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide-O-glucuronide against mammary tumor development and growth. *Anticancer Res.* **19**, 999-1004.
- Adamo, M.L., Shao, Z.M., Lanau, F., Chen, J.C., Clemmons, D.R., Roberts, C.T.J., LeRoith, D. & Fontana, J.A. (1992) Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and retinoic acid modulation of IGF-binding proteins (IGFBPs): IGFBP-2, -3, and -4 gene expression and protein secretion in a breast cancer cell line. *Endocrinology* **131**, 1858-1866.
- Adamson, P.C. (1994) Pharmacokinetics of All-Trans-Retinoic Acid: Clinical Implications in Acute Promyelocytic Leukemia. *Semin.-Hematol.* **31**, 14-17.
- Albanes, D., Heinonen, O.P., Taylor, P.R., Virtamo, J., Edwards, B.K., Rautalahti, M., Barrett, J.C., Pietinen, P., Malila, N., Tala, E., Liippo, K., Salomaa, E., Tangrea, J.A., Teppo, L., Askin, F.B., Erozan, Y., Greenwald, P. & Huttunen, J. (1996) Alpha-Tocopherol and beta-Carotene Supplements and Lung Cancer Incidence in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study: Effects of Base-line Characteristics and Study Compliance. *J.-Natl.-Cancer-Inst.* **88**, 1560-1570.
- Alberts, D.S. & Garcia, D.J. (1995) An overview of clinical cancer chemoprevention studies with emphasis on positive phase III studies. *J.Nutr.* **125**, 692S-697S.
- Allen, R.T., Hunter, W.J. & Agrawal, D.K. (1997) Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J.-Pharmacol.-Toxicol.-Methods.* **37**, 215-228.
- Alshafie, G.A., Harris, R.E., Robertson, F.M., Parrett, M.L. & Abou-Issa, H. (1999) Comparative chemopreventive activity of ibuprofen and N-(4-hydroxyphenyl)retinamide against the development and growth of rat mammary adenocarcinomas. *Anticancer-Res.* **19**, 3031-3036.
- Appierto, V., Cavadini, E., Pergolizzi, R., Cleris, L., Lotan, R., Canevari, S. & Formelli, F. (2001) Decrease in drug accumulation and in tumour aggressiveness marker expression in a fenretinide-induced resistant ovarian tumour cell line. *Br.J.Cancer* **84**, 1528-1534.
- Arai, T., Busby, W.J. & Clemmons, D.R. (1996) Binding of insulin-like growth factor (IGF) I or II to IGF-binding protein-2 enables it to bind to heparin and extracellular matrix. *Endocrinology* **137**, 4571-4575.
- Avis, I., Mathias, A., Unsworth, E.J., Miller, M.J., Cuttitta, F., Mulshine, J.L. & Jakowlew, S.B. (1995) Analysis of small cell lung cancer cell growth inhibition by 13-cis-retinoic acid: importance of bioavailability. *Cell-Growth-Differ.* **6**, 485-492.
- Babajko, S. & Binoux, M. (1996) Modulation by retinoic acid of insulin-like growth factor (IGF) and IGF binding protein expression in human SK-N-SH neuroblastoma cells. *Eur.-J.-Endocrinol.* **134**, 474-480.
- Bagniewski, P.G., Reynolds, C.P. & Ames, M.M. (1999) A phase I pharmacokinetic study of fenretinide (HPR) in children with high-risk solid tumors. *Proc.-Am.-Assoc.-Canc.-Res.* **40**, 92.
- Baserga, R. (1995) The insulin-like growth factor I receptor: a key to tumor growth? *Cancer-Res.* **55**, 249-252.
- Baserga, R., Resnicoff, M., D'Ambrosio, C. & Valentini, B. (1997) The role of the IGF-I receptor in apoptosis. *Vitam.-Horm.* **53**, 65-98.
- Bednarek, A., Shilkaitis, A., Green, A., Lubet, R., Kelloff, G., Christov, K. & Aldaz, C.M. (1999) Suppression of cell proliferation and telomerase activity in 4-(hydroxyphenyl)retinamide-treated mammary tumors. *Carcinogenesis* **20**, 879-883.
- Benner, S.E., Lippman, S.M. & Hong, W.K. (1994) Retinoid chemoprevention of second primary tumors. *Semin.Hematol.* **31**, 26-30.



- Benner, S.E., Lippman, S.M. & Hong, W.K. (1995) Current status of retinoid chemoprevention of lung cancer. *Oncology (Huntingt.)* **9**, 205-210.
- Bepler, G. (1999) Lung cancer epidemiology and genetics. *J.Thorac.Imaging* **14**, 228-234.
- Bepler, G., Jaques, G., Neumann, K., Aumuller, G., Gropp, C. & Havemann, K. (1987a) Establishment, growth properties, and morphological characteristics of permanent human small cell lung cancer cell lines. *J.-Cancer-Res.-Clin.-Oncol.* **113**, 31-40.
- Bepler, G., Jaques, G., Koehler, A., Gropp, C. & Havemann, K. (1987b) Markers and characteristics of human SCLC cell lines. Neuroendocrine markers, classical tumor markers, and chromosomal characteristics of permanent human small cell lung cancer cell lines. *J.-Cancer-Res.-Clin.-Oncol.* **113**, 253-259.
- Bepler, G., Rotsch, M., Jaques, G., Haeder, M., Heymanns, J., Hartogh, G., Kiefer, P. & Havemann, K. (1988) Peptides and growth factors in small cell lung cancer: production, binding sites, and growth effects. *J.-Cancer-Res.-Clin.-Oncol.* **114**, 235-244.
- Berard, J., Laboune, F., Mukuna, M., Masse, S., Kothary, R. & Bradley, W.E. (1996) Lung tumors in mice expressing an antisense RARbeta2 transgene. *FASEB J.* **10**, 1091-1097.
- Bernardini, S., Cianfarani, S., Spagnoli, A., Annicchiarico, P.M., Melino, G., Massoud, R., Boscherini, B., Finazzi, A.A., Rosenfeld, R.G. & Federici, G. (1994) Expression and down-regulation by retinoic acid of IGF binding protein-2 and -4 in medium from human neuroblastoma cells. *J.-Neuroendocrinol.* **6**, 409-413.
- Berni, R. & Formelli, F. (1992) In vitro interaction of fenretinide with plasma retinol-binding protein and its functional consequences. *Febs-Lett.* **308**, 43-45.
- Blum, W.F., Horn, N., Kratzsch, J., Jorgensen, J.O., Juul, A., Teale, D., Mohnike, K. & Ranke, M.B. (1993) Clinical studies of IGFBP-2 by radioimmunoassay. *Growth Regul.* **3**, 100-104.
- Boylan, J.F., Lufkin, T., Achkar, C.C., Taneja, R., Chambon, P. & Gudas, L.J. (1995) Targeted disruption of retinoic acid receptor alpha (RAR alpha) and RAR gamma results in receptor-specific alterations in retinoic acid-mediated differentiation and retinoic acid metabolism. *Mol.Cell Biol.* **15**, 843-851.
- Boyle, C.C. & Hickman, J.A. (1997) Toxin-induced increase in survival factor receptors: modulation of the threshold for apoptosis. *Cancer-Res.* **57**, 2404-2409.
- Breitman, T.R., Chen, Z.X. & Takahashi, N. (1994) Potential applications of cytodifferentiation therapy in hematologic malignancies. *Semin.Hematol.* **31**, 18-25.
- Bülzebruck, H. (1998) Metastasierung und Prognose des kleinzelligen Bronchialkarzinoms. *Onkologe* **4**, 1039-1049.
- Burger, A.M., Zhang, X., Li, H., Ostrowski, J.L., Beatty, B., Venanzoni, M., Papas, T. & Seth, A. (1998) Down-regulation of T1A12/mac25, a novel insulin-like growth factor binding protein related gene, is associated with disease progression in breast carcinomas. *Oncogene* **16**, 2459-2467.
- Busam, K.J., Roberts, A.B. & Sporn, M.B. (1992) Inhibition of mitogen-induced c-fos expression in melanoma cells by retinoic acid involves the serum response element. *J.Biol.Chem.* **267**, 19971-19977.
- Camerini, T., Mariani, L., De Palo, G., Marubini, E., Di Mauro, M.G., Decensi, A., Costa, A. & Veronesi, U. (2001) Safety of the synthetic retinoid fenretinide: long-term results from a controlled clinical trial for the prevention of contralateral breast cancer. *J.-Clin.-Oncol.* **19**, 1664-1670.
- Carney, D.N., Gazdar, A.F., Bepler, G., Guccion, J.G., Marangos, P.J., Moody, T.W., Zweig, M.H. & Minna, J.D. (1985) Establishment and identification of small cell lung cancer cell lines having classic and variant features. *Cancer-Res.* **45**, 2913-2923.
- Chambery, D., de Galle, B. & Babajko, S. (1998) Retinoic acid stimulates IGF binding protein (IGFBP)-6 and depresses IGFBP-2 and IGFBP-4 in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *J.Endocrinol.* **159**, 227-232.
- Chambon, P. (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* **10**, 940-954.

- Chan, L.N., Zhang, S., Shao, J., Waikel, R., Thompson, E.A. & Chan, T.S. (1997a) N-(4-hydroxyphenyl)retinamide induces apoptosis in T lymphoma and T lymphoblastoid leukemia cells. *Leuk.Lymphoma*. **25**, 271-280.
- Chan, L.N., Zhang, S., Cloyd, M. & Chan, T.S. (1997b) N-(4-hydroxyphenyl)retinamide prevents development of T-lymphomas in AKR/J mice. *Anticancer Res.* **17**, 499-503.
- Chen, J.C., Shao, Z.M., Sheikh, M.S., Hussain, A., LeRoith, D., Roberts, C.T.J. & Fontana, J.A. (1994) Insulin-like growth factor-binding protein enhancement of insulin-like growth factor-I (IGF-I)-mediated DNA synthesis and IGF-I binding in a human breast carcinoma cell line. *J.Cell Physiol.* **158**, 69-78.
- Chen, Y.R. & Tan, T.H. (1999) Lack of correlation in JNK activation and p53-dependent Fas expression induced by apoptotic stimuli. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **256**, 595-599.
- Chiantore, M.V., Giandomenico, V. & De Luca, L.M. (1999) Carcinoma cell lines resistant for growth inhibition and apoptosis to retinoic acid are responsive to 4-hydroxy-phenyl-retinamide: correlation with tissue transglutaminase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **254**, 636-641.
- Chiesa, F., Tradati, N., Marazza, M., Rossi, N., Boracchi, P., Mariani, L., Formelli, F., Giardini, R., Costa, A. & De-Palo, G. (1993) Fenretinide (4-HPR) in chemoprevention of oral leukoplakia. *J.-Cell-Biochem.-Suppl.* **17E**, 255-261.
- Chou, T.C., Motzer, R.J., Tong, Y. & Bosl, G.J. (1994) Computerized Quantitation of Synergism and Antagonism of Taxol, Topotecan, and Cisplatin Against Human Teratocarcinoma Cell Growth: a Rational Approach to Clinical Protocol Design. *J.-Natl.-Cancer-Inst.* **86**, 1517-1524.
- Chytil, F. (1996) Retinoids in lung development. *FASEB J.* **10**, 986-992.
- Claussen, M., Kubler, B., Wendland, M., Neifer, K., Schmidt, B., Zapf, J. & Bräulke, T. (1997) Proteolysis of insulin-like growth factors (IGF) and IGF binding proteins by cathepsin D. *Endocrinology* **138**, 3797-3803.
- Clemmons, D.R. (1998) Role of insulin-like growth factor binding proteins in controlling IGF actions. *Mol.Cell Endocrinol.* **140**, 19-24.
- Clifford, J.L., Menter, D.G., Wang, M., Lotan, R. & Lippman, S.M. (1999) Retinoid receptor-dependent and -independent effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide in F9 embryonal carcinoma cells. *Cancer Res.* **59**, 14-18.
- Clifford, J.L., Sabichi, A.L., Zou, C., Yang, X., Steele, V.E., Kelloff, G., Lotan, R. & Lippman, S.M. (2001) Effects of Novel Phenylretinamides on Cell Growth and Apoptosis in Bladder Cancer. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **10**, 391-395.
- Cohen, P. & Rosenfeld, R.G. (1994) Physiologic and clinical relevance of the insulin-like growth factor binding proteins. *Curr.Opin.Pediatr.* **6**, 462-467.
- Cohick, W.S., Gockerman, A. & Clemmons, D.R. (1995) Regulation of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2 synthesis and degradation by platelet-derived growth factor and the IGFs is enhanced by serum deprivation in vascular smooth muscle cells. *J.Cell Physiol.* **164**, 187-196.
- Conaway, C.C., Jiao, D., Kelloff, G.J., Steele, V.E., Rivenson, A. & Chung, F.L. (1998) Chemopreventive potential of fumaric acid, N-acetylcysteine, N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and beta-carotene for tobacco-nitrosamine-induced lung tumors in A/J mice. *Cancer-Lett.* **124**, 85-93.
- Conley, B.A., O'Shaughnessy, J., Prindiville, S., Lawrence, J., Chow, C., Jones, E., Merino, M.J., Kaiser-Kupfer, M.I., Caruso, R.C., Podgor, M.J., Goldspiel, B., Venzon, D., Danforth, D., Wu, S., Noone, M., Goldstein, J., Cowan, K.H. & Zujewski, J. (2000) Pilot trial of the safety, tolerability and retinoid levels of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide in combination with tamoxifen in patients at high risk for developing invasive breast cancer. *J.-Clin.-Oncol.* **18**, 275-283.
- Coradini, D., Biffi, A., Pellizzaro, C., Pirronello, E. & Di-Fronzo, G. (1997) Combined effect of tamoxifen or interferon-beta and 4-hydroxyphenylretinamide on the growth of breast cancer cell lines. *Tumour.-Biol.* **18**, 22-29.

- Costa, A., De Palo, G., Decensi, A., Formelli, F., Chiesa, F., Nava, M., Camerini, T., Marubini, E. & Veronesi, U. (1995) Retinoids in cancer chemoprevention. Clinical trials with the synthetic analogue fenretinide. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **768**, 148-162.
- Curley, R.W.J., Abou-Issa, H., Panigot, M.J., Repa, J.J., Clagett-Dame, M. & Alshafie, G. (1996) Chemopreventive activities of C-glucuronide/glycoside analogs of retinoid-O-glucuronides against breast cancer development and growth. *Anticancer Res.* **16**, 757-763.
- Daten des Gesundheitswesens 1999. Schriftenreihe des Bundesministeriums für Gesundheit, Bd. 112. Nomos-Verlagsgesellschaft, Baden-Baden. 443 S.
- Decensi, A., Johansson, H., Miceli, R., Mariani, L., Camerini, T., Cavadini, E., Di Mauro, M.G., Barreca, A., Gonzaga, A.G., Diani, S., Sandri, M.T., De Palo, G. & Formelli, F. (2001) Long-term effects of fenretinide, a retinoic acid derivative, on the insulin-like growth factor system in women with early breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **10**, 1047-1053.
- Decensi, A., Torrisi, R., Polizzi, A., Gesi, R., Brezzo, V., Rolando, M., Rondonina, G., Orenco, M.A., Formelli, F. & Costa, A. (1994a) Effect of the Synthetic Retinoid Fenretinide on Dark Adaptation and the Ocular Surface. *J.-Natl.-Cancer-Inst.* **86**, 105-110.
- Decensi, A., Bruno, S., Costantini, M., Torrisi, R., Curotto, A., Gatteschi, B., Nicolo, G., Polizzi, A., Perloff, M., Malone, W.F. & Bruzzi, P. (1994b) Phase IIa study of fenretinide in superficial bladder cancer, using DNA flow cytometry as an intermediate end point. *J.-Natl.-Cancer-Inst.* **86**, 138-140.
- Delia, D., Aiello, A., Lombardi, L., Pelicci, P.G., Grignani, F., Formelli, F., Menard, S., Costa, A., Veronesi, U. & Pierotti, M.A. (1993) N-(4-hydroxyphenyl)retinamide induces apoptosis of malignant hemopoietic cell lines including those unresponsive to retinoic acid. *Cancer-Res.* **53**, 6036-6041.
- Delia, D., Aiello, A., Formelli, F., Fontanella, E., Costa, A., Miyashita, T., Reed, J.C. & Pierotti, M.A. (1995) Regulation of apoptosis induced by the retinoid N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and effect of deregulated bcl-2. *Blood.* **85**, 359-367.
- Delia, D., Aiello, A., Meroni, L., Nicolini, M., Reed, J.C. & Pierotti, M.A. (1997) Role of antioxidants and intracellular free radicals in retinamide-induced cell death. *Carcinogenesis.* **18**, 943-948.
- De-Palo, G. & Formelli, F. (1995) Risks and benefits of retinoids in the chemoprevention of cancer. *Drug-Saf.* **13**, 245-256.
- De-Thè, H. (1996) Altered retinoic acid receptors. *Faseb-J.* **10**, 955-960.
- De-Thè, H., Vivanco-Ruiz, M.M., Tiollais, P., Stunnenberg, H. & Dejean, A. (1990) Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene. *Nature* **343**, 177-180.
- Dipietrantonio, A., Hsieh, T.C. & Wu, J.M. (1996) Differential effects of retinoic acid (RA) and N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR) on cell growth, induction of differentiation, and changes in p34cdc2, Bcl-2, and actin expression in the human promyelocytic HL-60 leukemic cells. *Biochem.-Biophys.-Res.-Commun.* **224**, 837-842.
- Dipietrantonio, A.M., Hsieh, T.C., Olson, S.C. & Wu, J.M. (1998) Regulation of G1/S transition and induction of apoptosis in HL-60 leukemia cells by fenretinide (4HPR). *Int.J.Cancer* **78**, 53-61.
- Dipietrantonio, A., Hsieh, T.C., Juan, G., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z. & Wu, J.M. (2000) Fenretinide-induced caspase 3 activity involves increased protein stability in a mechanism distinct from reactive oxygen species elevation. *Cancer-Res.* **60**, 4331-4335.
- Di-Vinci, A., Geido, E., Infusini, E. & Giaretti, W. (1994) Neuroblastoma cell apoptosis induced by the synthetic retinoid N-(4-hydroxyphenyl)retinamide. *Int.-J.-Cancer.* **59**, 422-426.
- DKFZ Heidelberg, aktualisierte online-Auflage von: Becker, N. & Wahrendorf, J. (1997) Atlas of Cancer Mortality in the Federal Republic of Germany (1981-1990). 3. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Doyle, L.A., Giangiulo, D., Hussain, A., Park, H.J., Yen, R.W. & Borges, M. (1989) Differentiation of human variant small cell lung cancer cell lines to a classic morphology by retinoic acid. *Cancer-Res.* **49**, 6745-6751.

- Eicher, S.A. & Lotan, R. (1996) Differential effects of retinoic acid and N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide on head and neck squamous cell carcinoma cells. *Laryngoscope* **106**, 1471-1475.
- ElAttar, T.M. & Lin, H.S. (1991) Effect of retinoids and carotenoids on prostaglandin formation by oral squamous carcinoma cells. *Prostaglandins-Leukot.-Essent.-Fatty-Acids*. **43**, 175-178.
- Evan, G., Harrington, E., Fanidi, A., Land, H., Amati, B. & Bennett, M. (1994) Integrated control of cell proliferation and cell death by the c-myc oncogene. *Philos.-Trans.-R.-Soc.-Lond.-B.-Biol.-Sci.* **345**, 269-275.
- Fanidi, A., Harrington, E.A. & Evan, G.I. (1992) Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature*. **359**, 554-556.
- Fanjul, A., Dawson, M.I., Hobbs, P.D., Jong, L., Cameron, J.F., Harlev, E., Graupner, G., Lu, X.P. & Pfahl, M. (1994) A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation. *Nature* **372**, 107-111.
- Fanjul, A.N., Delia, D., Pierotti, M.A., Rideout, D., Qiu, J. & Pfahl, M. (1996) 4-Hydroxyphenyl retinamide is a highly selective activator of retinoid receptors. *J.-Biol.-Chem.* **271**, 22441-22446.
- Favoni, R.E., de-Cupis, A., Bruno, S., Yee, D., Ferrera, A., Pirani, P., Costa, A. & Decensi, A. (1998) Modulation of the insulin-like growth factor-I system by N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide in human breast cancer cell lines. *Br.-J.-Cancer*. **77**, 2138-2147.
- Fesus, L., Madi, A., Balajthy, Z., Nemes, Z. & Szondy, Z. (1996) Transglutaminase induction by various cell death and apoptosis pathways. *Experientia* **52**, 942-949.
- Fong, K.M., Sekido, Y. & Minna, J.D. (1999) Molecular pathogenesis of lung cancer. *J.Thorac.Cardiovasc.Surg.* **118**, 1136-1152.
- Formelli, F., Clerici, M., Campa, T., Di-Mauro, M.G., Magni, A., Mascotti, G., Moglia, D., De-Palo, G., Costa, A. & Veronesi, U. (1993) Five-year administration of fenretinide: pharmacokinetics and effects on plasma retinol concentrations. *J.-Clin.-Oncol.* **11**, 2036-2042.
- Formelli, F., Barua, A.B. & Olson, J.A. (1996) Bioactivities of N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and retinoyl beta-glucuronide. *Faseb-J.* **10**, 1014-1024.
- Formelli, F., De-Palo, G., Costa, A. & Veronesi, U. (1998) Human transplacental passage of the retinoid fenretinide (4HPR). *Eur.-J.-Cancer*. **34**, 428-429.
- Frangioni, J.V., Moghal, N., Stuart, T.A., Neel, B.G. & Alper, S.L. (1994) The DNA binding domain of retinoic acid receptor beta is required for ligand-dependent suppression of proliferation. Application of general purpose mammalian coexpression vectors. *J.-Cell-Sci.* **107**, 827-838.
- Gadgeel, S., Rosati, R., Parchment, R. & Kalemkerian, G. (1999) Metabolism and mechanism of action of fenretinide in small cell lung cancer cell lines. *Proc.-Am.-Assoc.-Canc.-Res.* **40**, 397.
- Gazdar, A.F., Carney, D.N., Nau, M.M. & Minna, J.D. (1985) Characterization of variant subclasses of cell lines derived from small cell lung cancer having distinctive biochemical, morphological, and growth properties. *Cancer-Res.* **45**, 2924-2930.
- Gazdar, A.F. (1990) Cell biology and molecular biology of SCLC and NSCLC. *Curr.-Opin.-Oncol.* **2**, 321-327.
- Geradts, J. (1993) Human lung cancer cell lines exhibit resistance to retinoic acid treatment. *Cell-Growth-Differ.* **4**, 799-809.
- Giandomenico, V., Andreola, F., Rodriguez de la Concepcion ML, Collins, S.J. & De Luca, L.M. (1999) Retinoic acid and 4-hydroxyphenylretinamide induce growth inhibition and tissue transglutaminase through different signal transduction pathways in mouse fibroblasts (NIH 3T3 cells). *Carcinogenesis* **20**, 1133-1135.
- Green, D.R. (1997) A myc-induced apoptosis pathway surfaces. *Science* **278**, 1246-1247.
- Green, D.R. & Reed, J.C. (1998) Mitochondria and Apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312.
- Gucev, Z.S., Oh, Y., Kelley, K.M. & Rosenfeld, R.G. (1996) Insulin-like growth factor binding protein 3 mediates retinoic acid- and transforming growth factor beta2-induced growth inhibition in human breast cancer cells. *Cancer Res.* **56**, 1545-1550.

- Gupta, M.K., Nines, R., Rodrigo, K.A., Aziz, R.A., Carlton, P.S., Gray, D.L., Steele, V.E., Morse, M.A. & Stoner, G.D. (2001) Effects of dietary N-(4-hydroxyphenyl)retinamide on N-nitrosomethylbenzylamine metabolism and esophageal tumorigenesis in the Fischer 344 rat. *J.-Natl.-Cancer-Inst.* **93**, 990-998.
- Guruswamy, S., Lightfoot, S., Gold, M.A., Hassan, R., Berlin, K.D., Ivey, R.T. & Benbrook, D.M. (2001) Effects of retinoids on cancerous phenotype and apoptosis in organotypic cultures of ovarian carcinoma. *J.-Natl.-Cancer-Inst.* **93**, 516-525.
- Hail, N.jr. & Lotan, R. (2000) Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event in N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **9**, 1293-1301.
- Han, G.R., Dohi, D.F., Lee, H.Y., Rajah, R., Walsh, G.L., Hong, W.K., Cohen, P. & Kurie, J.M. (1997) All-trans-retinoic acid increases transforming growth factor-beta2 and insulin-like growth factor binding protein-3 expression through a retinoic acid receptor-alpha-dependent signaling pathway. *J.-Biol.-Chem.* **272**, 13711-13716.
- Harrington, E.A., Bennett, M.R., Fanidi, A. & Evan, G.I. (1994) c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *Embo-J.* **13**, 3286-3295.
- Havemann, K., Rotsch, M., Schoneberger, J., Erbil, C., Henning, C. & Jaques, G. (1990) Growth regulation by insulin-like growth factors in lung cancer. *J.Steroid.Biochem.Mol.Biol.* **37**, 877-882.
- Herrlinger, U. (1994) Wirkungen der all-trans-Retinsäure auf Zelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms. Dissertation Marburg.
- Heyne, K.H., Lippman, S.M., Lee, J.J., Lee, J.S. & Hong, W.K. (1992) The incidence of second primary tumors in long-term survivors of small-cell lung cancer. *J.Clin.Oncol.* **10**, 1519-1524.
- Hittelman, W.N., Lee, J.S., Morice, R.C., Kurie, J.M., Khuri, F., Ibarguen, H., Corrales, C., Ro, J.Y., Kemp, B., Broxson, A., Liu, D., Lee, J.J. & Hong, W.K. (1999) Lack of biomarker modulation in bronchial biopsies of chronic smokers following treatment with N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR). *Proc.-Am.-Assoc.-Canc.-Res.* **40**, 429.
- Hodam, J.R. & Creek, K.E. (1996) Uptake and metabolism of [3H]retinoic acid delivered to human foreskin keratinocytes either bound to serum albumin or added directly to the culture medium. *Biochim.Biophys.Acta* **1311**, 102-110.
- Hong, W.K. & Lippman, S.M. (1995) Cancer chemoprevention. *J.Natl.Cancer Inst.Monogr.* 49-53.
- Houle, B., Rochette, E.C. & Bradley, W.E. (1993) Tumor-suppressive effect of the retinoic acid receptor beta in human epidermoid lung cancer cells. *Proc.-Natl.-Acad.-Sci.-U.-S.-A.* **90**, 985-989.
- Hsieh, T.C. & Wu, J.M. (1997) Effects of fenretinide (4-HPR) on prostate LNCaP cell growth, apoptosis, and prostate-specific gene expression. *Prostate* **33**, 97-104.
- Hsieh, T.C. & Wu, J.M. (2000) Apoptosis and restriction of G(1)/S cell cycle by fenretinide Burkitt's lymphoma mutu I cell line accessed with bcl-9 down-regulation. *Biochem.-Biophys.-Res.-Commun.* **276**, 1295-1301.
- Hwa, V., Tomasini-Sprenger, C., Bermejo, A.L., Rosenfeld, R.G. & Plymate, S.R. (1998) Characterization of insulin-like growth factor-binding protein-related protein-1 in prostate cells. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* **83**, 4355-4362.
- Hwa, V., Oh, Y. & Rosenfeld, R.G. (1999) Insulin-like growth factor binding proteins: a proposed superfamily. *Acta Paediatr.Suppl.* **88**, 37-45.
- Igawa, M., Tanabe, T., Chodak, G.W. & Rukstalis, D.B. (1994) N-(4-hydroxyphenyl) retinamide induces cell cycle specific growth inhibition in PC3 cells. *Prostate.* **24**, 299-305.
- Jaffey, P., Chan, L.N., Shao, J., Schneider-Schaulies, J. & Chan, T.S. (1992) Retinoic acid inhibition of serum-induced c-fos transcription in a fibrosarcoma cell line. *Cancer Res.* **52**, 2384-2388.
- Jaques, G.; (1993) Ein erweitertes Autokriniemodell für insulinähnliche Wachstumsfaktoren bei Lungentumoren. Habilitationsschrift, Fachbereich Humanmedizin, Universität Marburg.

- Jaques, G., Kiefer, P., Rotsch, M., Henning, C., Goeke, R., Richter, G. & Havemann, K. (1989) Production of Insulin-like Growth Factor Binding Proteins by Small-Cell Lung Cancer Cell Lines. *Exp.-Cell-Res.* **184**, 396-406.
- Johanning, G.L., Cope, M.B., Wilborn, T., Grubbs, C.J. & Lubet, R. (2001) Effect of high retinoid doses on RAR-beta mRNA expression in female B6D2F1 mice. *Anticancer-Res.* **21**, 1691-1695.
- Johnson, B.E., Ihde, D.C., Makuch, R.W., Gazdar, A.F., Carney, D., Oie, H.K., Russell, E., Nau, M.M. & Minna, J. (1987) Myc family oncogene amplification in tumor cell lines established from small cell lung cancer patients and its relationship to clinical status and course. *J.Clin.Invest.* **79**, 1629-1634.
- Johnson, D.H. (1999) Management of Small Cell Lung Cancer. Current State of the Art. *Chest* **116**, 525S-530S.
- Jones, J.I. & Clemmons, D.R. (1995) Insulin-Like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Rev.* **16**, 3-34.
- Kalemkerian, G.P., Jasti, R.K., Celano, P., Nelkin, B.D. & Mabry, M. (1994) All-trans-retinoic acid alters myc gene expression and inhibits in vitro progression in small cell lung cancer. *Cell-Growth-Differ.* **5**, 55-60.
- Kalemkerian, G.P., Slusher, R., Ramalingam, S., Gadgeel, S. & Mabry, M. (1995) Growth inhibition and induction of apoptosis by fenretinide in small-cell lung cancer cell lines. *J.-Natl.-Cancer-Inst.* **87**, 1674-1680.
- Kalemkerian, G.P., Jiroutek, M., Ettinger, D.S., Dorigi, J.A., Johnson, D.H. & Mabry, M. (1998) A phase II study of all-trans-retinoic acid plus cisplatin and etoposide in patients with extensive stage small cell lung carcinoma: an Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Cancer* **83**, 1102-1108.
- Kalemkerian, G.P. & Ou, X. (1999) Activity of fenretinide plus chemotherapeutic agents in small-cell lung cancer cell lines. *Cancer Chemother.Pharmacol.* **43**, 145-150.
- Kang, J.X., Li, Y. & Leaf, A. (1997) Mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor is a receptor for retinoic acid. *Proc.-Natl.-Acad.-Sci.-U.-S.-A.* **94**, 13671-13676.
- Kauffmann-Zeh, A., Rodriguez, V.P., Ulrich, E., Gilbert, C., Coffey, P., Downward, J. & Evan, G. (1997) Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature.* **385**, 544-548.
- Kazmi, S.M., Plante, R.K., Visconti, V. & Lau, C.Y. (1996) Comparison of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and all-trans-retinoic acid in the regulation of retinoid receptor-mediated gene expression in human breast cancer cell lines. *Cancer-Res.* **56**, 1056-1062.
- Kelley, K.M., Oh, Y., Gargosky, S.E., Gucev, Z., Matsumoto, T., Hwa, V., Ng, L., Simpson, D.M. & Rosenfeld, R.G. (1996) Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* **28**, 619-637.
- Kiefer, P.E., Bepler, G., Kubasch, M. & Havemann, K. (1987) Amplification and expression of proto-oncogenes in human small cell lung cancer cell lines. *Cancer-Res.* **47**, 6236-6242.
- Kiefer, P., Jaques, G., Schoeneberger, J., Heinrich, G. & Havemann, K. (1991) Insulin-like growth factor binding protein expression in human small cell lung cancer cell lines. *Exp.-Cell-Res.* **192**, 414-417.
- Kim, J.H., Tanabe, T., Chodak, G.W. & Rukstalis, D.B. (1995) In vitro anti-invasive effects of N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide on human prostatic adenocarcinoma. *Anticancer-Res.* **15**, 1429-1434.
- Kitareewan, S., Spinella, M.J., Alloperna, J., Reczek, P.R. & Dmitrovsky, E. (1999) 4HPR triggers apoptosis but not differentiation in retinoid sensitive and resistant human embryonal carcinoma cells through an RARgamma independent pathway. *Oncogene* **18**, 5747-5755.
- Kolesnick, R.N. & Kronke, M. (1998) Regulation of ceramide production and apoptosis. *Annu.Rev.Physiol.* **60**, 643-665.

- La-Vista-Picard, N., Hobbs, P.D., Pfahl, M. & Dawson, M.I. (1996) The receptor-DNA complex determines the retinoid response: a mechanism for the diversification of the ligand signal. *Mol.-Cell-Biol.* **16**, 4137-4146.
- Lee, D.Y., Kim, S.J. & Lee, Y.C. (1999b) Serum insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding proteins in lung cancer patients. *J.Korean.Med.Sci.* **14**, 401-404.
- Lee, R.Y., Skaar, T.C., Leonessa, F. & Clarke, R. (1999a) The acquisition of retinoid resistance to 4HPR and 9-cis-RA in estrogen independent breast cancer. *Proc.-Am.-Assoc.-Canc.-Res.* **40**, 61
- Levin, V.A., Brzoska, P., Gupta, M.K., Minna, J.D., Gray, J.W. & Christman, M.F. (1994) Identification of Frequent Novel Genetic Alterations in Small Cell Lung Carcinoma. *Cancer-Res.* **54**, 5086-5091.
- Li, X.S., Chen, J.C., Sheikh, M.S., Shao, Z.M. & Fontana, J.A. (1994) Retinoic acid inhibition of insulin-like growth factor I stimulation of c-fos mRNA levels in a breast carcinoma cell line. *Exp.Cell Res.* **211**, 68-73.
- Lippman, S.M., Heyman, R.A., Kurie, J.M., Benner, S.E. & Hong, W.K. (1995) Retinoids and chemoprevention: clinical and basic studies. *J.Cell Biochem.Suppl.* **22:1-10**, 1-10.
- Liu, G., Wu, M., Levi, G. & Ferrari, N. (1998) Inhibition of cancer cell growth by all-trans retinoic acid and its analog N-(4-hydroxyphenyl) retinamide: a possible mechanism of action via regulation of retinoid receptors expression. *Int.J.Cancer* **78**, 248-254.
- Liu, Y., Lee, M.O., Wang, H.G., Li, Y., Hashimoto, Y., Klaus, M., Reed, J.C. & Zhang, X. (1996) Retinoic acid receptor beta mediates the growth-inhibitory effect of retinoic acid by promoting apoptosis in human breast cancer cells. *Mol.Cell Biol.* **16**, 1138-1149.
- Lotan, R. (1996) Retinoids in cancer chemoprevention. *Faseb-J.* **10**, 1031-1039.
- Lotan, R. (1997a) Roles of retinoids and their nuclear receptors in the development and prevention of upper aerodigestive tract cancers. *Environ.Health Perspect.* **105** Suppl 4: 985-988.
- Lotan, R. (1997b) Retinoids and chemoprevention of aerodigestive tract cancers. *Cancer Metastasis Rev.* **16**, 349-356.
- Lotan, Y., Xu, X.C., Shalev, M., Lotan, R., Williams, R., Wheeler, T.M., Thompson, T.X. & Kadmon, D. (2000) Differential expression of nuclear retinoid receptors in normal and malignant prostates. *J.-Clin.-Oncol.* **18**, 116-121.
- Lovat, P.E., Irving, H., Annicchiarico, P.M., Bernassola, F., Malcolm, A.J., Pearson, A.D., Melino, G. & Redfern, C.P. (1997) Apoptosis of N-type neuroblastoma cells after differentiation with 9-cis-retinoic acid and subsequent washout. *J.-Natl.-Cancer-Inst.* **89**, 446-452.
- Lovat, P.E., Ranalli, M., Annicchiarico, P.M., Bernassola, F., Piacentini, M., Malcolm, A.J., Pearson, A.D., Melino, G. & Redfern, C.P. (2000) Effector mechanisms of fenretinide-induced apoptosis in neuroblastoma. *Exp.-Cell-Res.* **260**, 50-60.
- Lu, X.P., Fanjul, A., Picard, N., Pfahl, M., Rungta, D., Nared, H.K., Carter, B., Piedrafita, J., Tang, S. & Fabbrizio, E. (1997) Novel retinoid-related molecules as apoptosis inducers and effective inhibitors of human lung cancer cells in vivo. *Nat.-Med.* **3**, 686-690.
- Lu, X.P., Fanjul, A., Picard, N., Shroot, B. & Pfahl, M. (1999) A selective retinoid with high activity against an androgen-resistant prostate cancer cell type. *Int.J.Cancer* **80**, 272-278.
- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., van-Schie, R.C., LaFace, D.M. & Green, D.R. (1995) 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.
- Maurer, B.J., Metelitsa, L.S., Seeger, R.C., Cabot, M.C. & Reynolds, C.P. (1999) Increase of ceramide and induction of mixed apoptosis/necrosis by N-(4-hydroxyphenyl)-retinamide in neuroblastoma cell lines. *J.Natl.Cancer Inst.* **91**, 1138-1146.
- Maurer, B.J., Melton, L.J., Billups, C., Cabot, M.C. & Reynolds, C.P. (2000) Synergistic cytotoxicity in solid tumor cell lines between N-(4-Hydroxyphenyl)Retinamide and modulators of ceramide metabolism. *J.-Natl.-Cancer-Inst.* **92**, 1897-1909.

- Mayne, S.T. & Lippman, S.M. (1997) Cancer prevention. Retinoids and Carotenoids. in: DeVita, V. Hellman S., Rosenberg S. (eds.): Cancer. Principles and Practice of Oncology. Lippincott-Raven, Philadelphia, 5th edition. S. 585-598.
- McCormick, D.L., Johnson, W.D., Rao, K.V., Bowman, G.T., Steele, V.E., Lubet, R.A. & Kelloff, G.J. (1996) Comparative activity of N-(4-hydroxyphenyl)-all-trans-retinamide and alpha-difluoromethylornithine as inhibitors of lymphoma induction in PIM transgenic mice. *Carcinogenesis*. **17**, 2513-2517.
- McLarty, J.W., Holiday, D.B., Girard, W.M., Yanagihara, R.H., Kummet, T.D. & Greenberg, S.D. (1995) Beta-Carotene, vitamin A, and lung cancer chemoprevention: results of an intermediate endpoint study. *Am.J.Clin.Nutr.* **62**, 1431S-1438S.
- Mehta, K., McQueen, T., Neamati, N., Collins, S. & Andreeff, M. (1996) Activation of retinoid receptors RAR alpha and RXR alpha induces differentiation and apoptosis, respectively, in HL-60 cells. *Cell Growth Differ.* **7**, 179-186.
- Mehta, R.G., Hultin, T.A. & Moon, R.C. (1988) Metabolism of the chemopreventive retinoid N-(4-hydroxyphenyl)retinamide by mammary gland in organ culture. *Biochem.J.* **256**, 579-584.
- Mehta, R.G., Moon, R.C., Hawthorne, M., Formelli, F. & Costa, A. (1991) Distribution of fenretinide in the mammary gland of breast cancer patients. *Eur J.Cancer* **27**, 138-141.
- Mehta, R.R., Hawthorne, M.E., Graves, J.M. & Mehta, R.G. (1998) Metabolism of N-[4-hydroxyphenyl]retinamide (4-HPR) to N-[4-methoxyphenyl]-retinamide (4-MPR) may serve as a biomarker for its efficacy against human breast cancer and melanoma cells. *Eur J.Cancer* **34**, 902-907.
- Melino, G., Draoui, M., Bellincampi, L., Bernassola, F., Bernardini, S., Piacentini, M., Reichert, U. & Cohen, P. (1997) Retinoic acid receptors alpha and gamma mediate the induction of "tissue" transglutaminase activity and apoptosis in human neuroblastoma cells. *Exp.Cell Res.* **235**, 55-61.
- Menouny, M., Binoux, M. & Babajko, S. (1997) Role of insulin-like growth factor binding protein-2 and its limited proteolysis in neuroblastoma cell proliferation: modulation by transforming growth factor-beta and retinoic acid. *Endocrinology* **138**, 683-690.
- Menouny, M., Binoux, M. & Babajko, S. (1998) IGFBP-2 expression in a human cell line is associated with increased IGFBP-3 proteolysis, decreased IGFBP-1 expression and increased tumorigenicity. *Int.J.Cancer* **77**, 874-879.
- Minna, J. D., Sekido, Y., Fong K.M., Gazdar, A.F. (1997) Cancer of the Lung. in: DeVita, V. Hellman S., Rosenberg S. (eds.): Cancer. Principles and Practice of Oncology. Lippincott-Raven, Philadelphia, 5th edition. S. 849-857.
- Moglia, D., Formelli, F., Baliva, G., Bono, A., Accetturi, M., Nava, M. & De Palo, G. (1996) Effects of topical treatment with fenretinide (4-HPR) and plasma vitamin A levels in patients with actinic keratoses. *Cancer Lett.* **110**, 87-91.
- Montaldo, P.G., Pagnan, G., Pastorino, F., Chiesa, V., Raffaghello, L., Kirchmeier, M., Allen, T.M. & Ponzoni, M. (1999) N-(4-hydroxyphenyl) retinamide is cytotoxic to melanoma cells in vitro through induction of programmed cell death. *Int.J.Cancer* **81**, 262-267.
- Moon, R.C. & Constantinou, A.I. (1997) Dietary retinoids and carotenoids in rodent models of mammary tumorigenesis. *Breast-Cancer-Res.-Treat.* **46**, 181-189.
- Morriss-Kay, G.M. & Sokolova, N. (1996) Embryonic development and pattern formation. *FASEB J.* **10**, 961-968.
- Mouhieddine, O.B., Cazals, V., Kuto, E., Le Bouc, Y. & Clement, A. (1996) Glucocorticoid-induced growth arrest of lung alveolar epithelial cells is associated with increased production of insulin-like growth factor binding protein-2. *Endocrinology* **137**, 287-295.
- Nabeyrat, E., Besnard, V., Corroyer, S., Cazals, V. & Clement, A. (1998) Retinoic acid-induced proliferation of lung alveolar epithelial cells: relation with the IGF system. *Am.J.Physiol.* **275**, L71-L79



- Naik, H.R., Kalemkerian, G. & Pienta, K.J. (1995) 4-Hydroxyphenylretinamide in the chemoprevention of cancer. *Adv.-Pharmacol.* **33**, 315-347.
- Napoli, J.L. (1996) Retinoic acid biosynthesis and metabolism. *FASEB J.* **10**, 993-1001.
- Nickerson, T., Huynh, H. & Pollak, M. (1997) Insulin-like growth factor binding protein-3 induces apoptosis in MCF7 breast cancer cells. *Biochem.-Biophys.-Res.-Commun.* **237**, 690-693.
- Noll, K. (1998) Modell zur Wachstumsregulation bei Bronchialkarzinomzelllinien - Bedeutung der IGF-bindenden Proteine. Dissertation Marburg.
- Oh, Y., Muller, H.L., Lamson, G. & Rosenfeld, R.G. (1993) Insulin-like growth factor (IGF)-independent action of IGF-binding protein-3 in Hs578T human breast cancer cells. Cell surface binding and growth inhibition. *J.Biol.Chem.* **268**, 14964-14971.
- Oh, Y., Muller, H.L., Ng, L. & Rosenfeld, R.G. (1995) Transforming growth factor-beta-induced cell growth inhibition in human breast cancer cells is mediated through insulin-like growth factor-binding protein-3 action. *J.Biol.Chem.* **270**, 13589-13592.
- Oh, Y., Nagalla, S.R., Yamanaka, Y., Kim, H.S., Wilson, E. & Rosenfeld, R.G. (1996) Synthesis and characterization of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-7. Recombinant human mac25 protein specifically binds IGF-I and -II. *J.-Biol.-Chem.* **271**, 30322-30325.
- Oikawa, T., Hirotoni, K., Nakamura, O., Shudo, K., Hiragun, A. & Iwaguchi, T. (1989) A highly potent antiangiogenic activity of retinoids. *Cancer Lett.* **48**, 157-162.
- Omenn, G.S., Goodman, G.E., Thornquist, M.D., Balmes, J., Cullen, M.R., Glass, A., Keogh, J.P., Meyskens, F.L.J., Valanis, B., Williams, J.H.J., Barnhart, S., Cherniack, M.G., Brodtkin, C.A. & Hammar, S. (1996) Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. *J.Natl.Cancer Inst.* **88**, 1550-1559.
- Onuki, N. & Gazdar, A.F. (1999) Genetic Changes in the Spectrum of Neuroendocrine Lung Tumors. *Cancer* **85**, 600-607.
- Oridate, N., Lotan, D., Mitchell, M.F., Hong, W.K. & Lotan, R. (1995) Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in cervical carcinoma cells by retinoids: implications for chemoprevention. *J.-Cell-Biochem.-Suppl.* **23**, 80-86.
- Oridate, N., Lotan, D., Xu, X.C., Hong, W.K. & Lotan, R. (1996) Differential induction of apoptosis by all-trans-retinoic acid and N-(4-hydroxyphenyl)retinamide in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Clin.Cancer Res.* **2**, 855-863.
- Oridate, N., Suzuki, S., Higuchi, M., Mitchell, M.F., Hong, W.K. & Lotan, R. (1997) Involvement of reactive oxygen species in N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in cervical carcinoma cells. *J.-Natl.-Cancer-Inst.* **89**, 1191-1198.
- Ou, X., Campau, S., Slusher, R., Jasti, R.K., Mabry, M. & Kalemkerian, G.P. (1996) Mechanism of all-trans-retinoic acid-mediated L-myc gene regulation in small cell lung cancer. *Oncogene.* **13**, 1893-1899.
- Panigone, S., Debernardi, S., Taya, Y., Fontanella, E., Airolidi, R. & Delia, D. (2000) pRb and Cdk regulation by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide. *Oncogene* **19**, 4035-4041.
- Panigone, S., Bergomas, R., Fontanella, E., Prinetti, A., Sandhoff, K., Grabowski, G.A. & Delia, D. (2001) Up-regulation of prosaposin by the retinoid HPR and its effect on ceramide production and integrin receptors. *Faseb-J.* **15**, 1475-1477.
- Parrett, M.L., Abou-Issa, H.M., Alshafie, G., Ross, M.S., Harris, R.E. & Robertson, F.M. (1999) Comparative ability of ibuprofen and N-(4-hydroxyphenyl)retinamide to inhibit development of rat mammary adenocarcinomas associated with differential inhibition of gene expression of cyclooxygenase isoforms. *Anticancer-Res.* **19**, 5079-5085.
- Pastorino, U., Infante, M., Maioli, M., Chiesa, G., Buyse, M., Firket, P., Rosmentz, N., Clerici, M., Soresi, E. & Valente, M. (1993) Adjuvant treatment of stage I lung cancer with high-dose vitamin A. *J.Clin Oncol* **11**, 1216-1222.
- Pellegrini, R., Mariotti, A., Tagliabue, E., Bressan, R., Bunone, G., Coradini, D., Della, V.G., Formelli, F., Cleris, L., Radice, P. Pierotti, M.A., Colnaghi, M.I. & Menard, S. (1995) Modulation of

- markers associated with tumor aggressiveness in human breast cancer cell lines by N-(4-hydroxyphenyl) retinamide. *Cell-Growth-Differ.* **6**, 863-869.
- Pergolizzi, R., Appierto, V., Crosti, M., Cavadini, E., Cleris, L., Guffanti, A. & Formelli, F. (1999) Role of retinoic acid receptor overexpression in sensitivity to fenretinide and tumorigenicity of human ovarian carcinoma cells. *Int.J.Cancer* **81**, 829-834.
- Pettengill, O.S., Sorenson, G.D., Wurster-Hill, D.H., Curphey, T.J., Noll, W.W., Cate, C.C. & Maurer, L.H. (1980) Isolation and growth characteristics of continuous cell lines from small cell carcinoma of the lung. *Cancer* **45**, 906-918.
- Pfahl, M., Apfel, R., Bendik, I., Fanjul, A., Graupner, G., Lee, M.O., La-Vista-Picard, N., Lu, X.P., Piedrafita, F.J., Ortiz, M.A., Salbert, G. & Zhang, X.K. (1994) Nuclear Retinoid Receptor and Their Mechanism of Action. *Vitam.-Horm.* **49**, 372-382.
- Piedrafita, F.J. & Pfahl, M. (1997) Retinoid-induced apoptosis and Sp1 cleavage occur independently of transcription and require caspase activation. *Mol.-Cell-Biol.* **17**, 6348-6358.
- Pienta, K.J., Nguyen, N.M. & Lehr, J.E. (1993) Treatment of prostate cancer in the rat with the synthetic retinoid fenretinide. *Cancer-Res.* **53**, 224-226.
- Pienta, K.J., Esper, P.S., Zwas, F., Krzeminski, R. & Flaherty, L.E. (1997) Phase II chemoprevention trial of oral fenretinide in patients at risk for adenocarcinoma of the prostate. *Am.-J.-Clin.-Oncol.* **20**, 36-39.
- Ponzoni, M., Bocca, P., Chiesa, V., Decensi, A., Pistoia, V., Raffaghello, L., Rozzo, C. & Montaldo, P.G. (1995) Differential effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and retinoic acid on neuroblastoma cells: apoptosis versus differentiation. *Cancer-Res.* **55**, 853-861.
- Poot, M., Hosier, P. & Swisshelm, K. (1999) Mitochondrial demise, nuclear fragmentation and caspase-independent induction of apoptosis in MCF7 cells by retinoids. *Proc.-Am.-Assoc.-Canc.-Res.* **40**, 579.
- Puduvalli, V.K., Saito, Y., Xu, R., Kouraklis, G.P., Levin, V.A. & Kyritsis, A.P. (1999) Fenretinide activates caspases and induces apoptosis in gliomas. *Clin.Cancer Res.* **5**, 2230-2235.
- Rajah, R., Katz, L., Nunn, S., Solberg, P., Beers, T. & Cohen, P. (1995) Insulin-like growth factor binding protein (IGFBP) proteases: functional regulators of cell growth. *Prog.-Growth-Factor.-Res.* **6**, 273-284.
- Rajah, R., Valentini, B. & Cohen, P. (1997) Insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor-beta1 on programmed cell death through a p53- and IGF-independent mechanism. *J.-Biol.-Chem.* **272**, 12181-12188.
- Rajaram, S., Baylink, D.J. & Mohan, S. (1997) Insulin-like Growth Factor-Binding Proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocrine Rev.* **18**, 801-831.
- Ravi, R.K., Scott, F.M., Cuttitta, F., Weber, E., Kalemkerian, G.P., Nelkin, B.D. & Mabry, M. (1998) Induction of gastrin releasing peptide by all-trans retinoic acid in small cell lung cancer cells. *Oncol Rep.* **5**, 497-501.
- Reed, J.C. (1999) Fenretinide: the death of a tumor cell. *J.Natl.Cancer Inst.* **91**, 1099-1100.
- Reeve, J.G., Kirby, L.B., Brinkman, A., Hughes, S.A., Schwander, J. & Bleehen, N.M. (1992a) Insulin-like growth-factor-binding protein gene expression and protein production by human tumour cell lines. *Int.J.Cancer* **51**, 818-821.
- Reeve, J.G., Brinkman, A., Hughes, S., Mitchell, J., Schwander, J. & Bleehen, N.M. (1992b) Expression of insulinlike growth factor (IGF) and IGF-binding protein genes in human lung tumor cell lines. *J.Natl.Cancer Inst.* **84**, 628-634.
- Reeve, J.G., Morgan, J., Schwander, J. & Bleehen, N.M. (1993) Role for membrane and secreted insulin-like growth factor-binding protein-2 in the regulation of insulin-like growth factor action in lung tumors. *Cancer Res.* **53**, 4680-4685.
- Reynolds, C.P., Melton, L.J. & Wang, Y.L. (1997) N-(4-hydroxyphenyl)retinamide is highly active against retinoic acid resistant neuroblastoma cell lines. *Proc.-Am.-Assoc.-Canc.-Res.* **38**, 25.

- Roberson, K.M., Penland, S.N., Padilla, G.M., Selvan, R.S., Kim, C.S., Fine, R.L. & Robertson, C.N. (1997) Fenretinide: induction of apoptosis and endogenous transforming growth factor beta in PC-3 prostate cancer cells. *Cell-Growth-Differ.* **8**, 101-111.
- Rodriguez-Burford, C., Lubet, R.A., Eto, I., Juliana, M.M., Kelloff, G.J., Grubbs, C.J. & Steele, V.E. (1999) Effect of reduced body weight gain on the evaluation of chemopreventive agents in the methylnitrosourea-induced mammary cancer model. *Carcinogenesis* **20**, 71-76.
- Rowan, S. & Fisher, D.E. (1997) Mechanisms of apoptotic cell death. *Leukemia.* **11**, 457-465.
- Rozzo, C., Chiesa, V., Caridi, G., Pagnan, G. & Ponzoni, M. (1997) Induction of apoptosis in human neuroblastoma cells by abrogation of integrin-mediated cell adhesion. *Int.J.Cancer* **70**, 688-698.
- Sabichi, A.L., Hendricks, D.T., Bober, M.A. & Birrer, M.J. (1998) Retinoic acid receptor beta expression and growth inhibition of gynecologic cancer cells by the synthetic retinoid N-(4-hydroxyphenyl) retinamide. *J.-Natl.-Cancer-Inst.* **90**, 597-605.
- Sacks, P.G., Harris, D. & Chou, T.C. (1995) Modulation of growth and proliferation in squamous cell carcinoma by retinoic acid: a rationale for combination therapy with chemotherapeutic agents. *Int.J.Cancer* **61**, 409-415.
- Sagman, U., Lishner, M., Maki, E., Shepherd, F.A., Haddad, R., Evans, W.K., DeBoer, G., Payne, D., Pringle, J.F. & Yeoh, J.L. (1992) Second primary malignancies following diagnosis of small-cell lung cancer. *J.Clin.Oncol.* **10**, 1525-1533.
- Saitoh, Y., Goto, T., Puduvalli, V.K., Murakami, M., Kochi, M., Levin, V.A., Kyritsis, A.P. & Ushio, Y. (1999) Induction of apoptosis by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide in glioma cells. *Int.J.Oncol.* **15**, 499-504.
- Salbert, G., Fanjul, A., Piedrafita, F.J., Lu, X.P., Kim, S.J., Tran, P. & Pfahl, M. (1993) Retinoic acid receptors and retinoid X receptor-alpha down-regulate the transforming growth factor-beta 1 promoter by antagonizing AP-1 activity. *Mol.-Endocrinol.* **7**, 1347-1356.
- Sani, B.P., Shealy, Y.F. & Hill, D.L. (1995) N-(4-hydroxyphenyl)retinamide: interactions with retinoid-binding proteins/receptors. *Carcinogenesis.* **16**, 2531-2534.
- Schardt, C., Rotsch, M., Erbil, C., Goke, R., Richter, G. & Havemann, K. (1993) Characterization of insulin-like growth factor II receptors in human small cell lung cancer cell lines. *Exp.-Cell-Res.* **204**, 22-29.
- Scher, R.L., Saito, W., Dodge, R.K., Richtsmeier, W.J. & Fine, R.L. (1998) Fenretinide-induced apoptosis of human head and neck squamous carcinoma cell lines. *Otolaryngol.-Head.-Neck-Surg.* **118**, 464-471.
- Sheikh, M.S., Shao, Z.M., Hussain, A., Clemmons, D.R., Chen, J.C., Roberts, C.T.J., LeRoith, D. & Fontana, J.A. (1993) Regulation of insulin-like growth factor-binding-protein-1, 2, 3, 4, 5, and 6: synthesis, secretion, and gene expression in estrogen receptor- negative human breast carcinoma cells. *J.Cell Physiol.* **155**, 556-567.
- Sheikh, M.S., Shao, Z.M., Li, X.S., Ordonez, J.V., Conley, B.A., Wu, S., Dawson, M.I., Han, Q.X., Chao, W.R., Quick, T., Niles, R.M. & Fontana, J.A. (1995) N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR)-mediated biological actions involve retinoid receptor-independent pathways in human breast carcinoma. *Carcinogenesis.* **16**, 2477-2486.
- Shen, J.C., Wang, T.T., Chang, S. & Hursting, S.D. (1999) Mechanistic studies of the effects of the retinoid N-(4-hydroxyphenyl)retinamide on prostate cancer cell growth and apoptosis. *Mol.Carcinog.* **24**, 160-168.
- Shimasaki, S. & Ling, N. (1991) Identification and molecular characterization of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 and -6). *Prog.Growth Factor.Res.* **3**, 243-266.
- Slaughter, D.P., Southwick, H.W. & Smejkal, W. (1953) "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. *Cancer* **6**, 963-968.
- Slootweg, M.C., Ohlsson, C., Salles, J.P., de Vries, C.P. & Netelenbos, J.C. (1995) Insulin-like growth factor binding proteins-2 and -3 stimulate growth hormone receptor binding and mitogenesis in rat osteosarcoma cells. *Endocrinology* **136**, 4210-4217.

- Spencer, C.A. & Groudine, M. (1991) Control of c-myc regulation in normal and neoplastic cells. *Adv.-Cancer-Res.* **56**, 1-48.
- Sporn, M.B., Dunlop, N.M., Newton, D.L. & Smith, J.M. (1976) Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids). *Fed.Proc.* **35**, 1332-1338.
- Sporn, M. & Roberts, A.B. (1991) Interactions of Retinoids and Transforming Growth Factor-beta in Regulation of Cell Differentiation and Proliferation. *Mol.-Endocrinol.* **5**, 3-7.
- Steele, V.E., Kelloff, G.J., Wilkinson, B.P. & Arnold, J.T. (1990) Inhibition of transformation in cultured rat tracheal epithelial cells by potential chemopreventive agents. *Cancer Res.* **50**, 2068-2074.
- Sun, S.Y., Yue, P., Dawson, M.I., Shroot, B., Michel, S., Lamph, W.W., Heyman, R.A., Teng, M., Chandraratna, R.A., Shudo, K., Hong, W.K. & Lotan, R. (1997) Differential effects of synthetic nuclear retinoid receptor-selective retinoids on the growth of human non-small cell lung carcinoma cells. *Cancer-Res.* **57**, 4931-4939.
- Sun, S.Y., Yue, P. & Lotan, R. (1999a) Induction of apoptosis by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and its association with reactive oxygen species, nuclear retinoic acid receptors, and apoptosis-related genes in human prostate carcinoma cells. *Mol.Pharmacol.* **55**, 403-410.
- Sun, S.Y., Li, W., Yue, P., Lippman, S.M., Hong, W.K. & Lotan, R. (1999b) Mediation of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in human cancer cells by different mechanisms. *Cancer Res.* **59**, 2493-2498.
- Sun, S.Y., Yue, P., Kelloff, G., Steele, V.E., Lippman, S.M., Hong, W.K. & Lotan, R. (2001) Identification of retinamides that are more potent than N-(4-hydroxyphenyl)retinamide in inhibiting growth and inducing apoptosis of human head and neck and lung cancer cells. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **10**, 595-601.
- Supino, R., Crosti, M., Clerici, M., Warlters, A., Cleris, L., Zunino, F. & Formelli, F. (1996) Induction of apoptosis by fenretinide (4HPR) in human ovarian carcinoma cells and its association with retinoic acid receptor expression. *Int.-J.-Cancer.* **65**, 491-497.
- Suzuki, S., Higuchi, M., Proske, R.J., Oridate, N., Hong, W.K. & Lotan, R. (1999) Implication of mitochondria-derived reactive oxygen species, cytochrome C and caspase-3 in N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in cervical carcinoma cells. *Oncogene* **18**, 6380-6387.
- Swishhelm, K., Tsuchiya, K. & Sager, R. (1995) Enhanced expression of an insulin growth factor-like binding protein (mac25) in senescent human mammary epithelial cells and induced expression with retinoic acid. *Proc.-Natl.-Acad.-Sci.-U.-S.-A.* **4472-4476**.
- Taimi, M. & Breitman, T.R. (1997) N-4-hydroxyphenylretinamide enhances retinoic acid-induced differentiation and retinoylation of proteins in the human acute promyelocytic leukemia cell line, NB4, by a mechanism that may involve inhibition of retinoic acid catabolism. *Biochem.-Biophys.-Res.-Commun.* **232**, 432-436.
- Takahashi, N., Sausville, E.A. & Breitman, T.R. (1995) N-4-(Hydroxyphenyl)retinamide (Fenretinide) in Combination with Retinoic Acid enhances Differentiation and Retinoylation of Proteins. *Clin.-Cancer-Res.* **1**, 637-642.
- Takatsuka, J., Takahashi, N. & De Luca, L.M. (1996) Retinoic Acid Metabolism and Inhibition of Cell proliferation: An Unexpected Liaison. *Cancer-Res.* **56**, 675-678.
- Tanabe, T. (2000) Effects of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide on urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in prostate adenocarcinoma cell lines. *Hiroshima-J.-Med.-Sci.* **49**, 67-72.
- Thiruvengadam, R., Atiba, J. & Azawi, S. (1995) Trans-retinoic acid (tRA) with chemotherapy in non-small cell lung cancer (NSCLC): a pilot phase II study. *Proc.-Annu.-Meet.-Am.-Soc.-Clin.-Oncol.* **14**, A1164
- Tradati, N., Chiesa, F., Rossi, N., Grigolato, R., Formelli, F., Costa, A. & De Palo, G. (1994) Successful topical treatment of oral lichen planus and leukoplakias with fenretinide (4-HPR). *Cancer Lett.* **76**, 109-111.

- Ulukaya, E. & Wood, E.J. (1999) Fenretinide and its relation to cancer. *Cancer Treat.Rev.* **25**, 229-235.
- Ulukaya, E., Kurt, A. & Wood, E.J. (2001) 4-(N-hydroxyphenyl)retinamide can selectively induce apoptosis in human epidermoid carcinoma cells but not in normal dermal fibroblasts. *Cancer Invest.* **19**, 145-154.
- Urban, D., Myers, R., Manne, U., Weiss, H., Mohler, J., Perkins, D., Markiewicz, M., Lieberman, R., Kelloff, G., Marshall, M. & Grizzle, W. (1999) Evaluation of biomarker modulation by fenretinide in prostate cancer patients. *Eur-Urol* **35**, 429-438.
- Vaccari, M., Silingardi, P., Argnani, A., Horn, W., Giungi, M., Mascolo, M.G., Grilli, S. & Colacci, A. (2000) In vitro effects of fenretinide on cell-matrix interactions. *Anticancer-Res.* **20**, 3059-3066.
- Van-Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B. & Reutelingsperger, C.P. (1998) Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry.* **31**, 1-9.
- Vasios, G., Mader, S., Gold, J.D., Leid, M., Lutz, Y., Gaub, M.P., Chambon, P. & Gudas, L. (1991) The late retinoic acid induction of laminin B1 gene transcription involves RAR binding to the responsive element. *EMBO J.* **10**, 1149-1158.
- Veronesi, U., De Palo, G., Marubini, E., Costa, A., Formelli, F., Mariani, L., Decensi, A., Camerini, T., Del Turco, M.R., Di Mauro, M.G., Muraca, M.G., Del Vecchio, M., Pinto, C., D'Aiuto, G., Boni, C., Campa, T., Magni, A., Miceli, R., Perloff, M., Malone, W.F. & Sporn, M.B. (1999) Randomized Trial of Fenretinide to Prevent Second Breast Malignancy in Women With Early Breast Cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* **91**, 1847-1856.
- Villa, M.L., Ferrario, E., Trabattoni, D., Formelli, F., De-Palo, G., Magni, A., Veronesi, U. & Clerici, E. (1993) Retinoids, breast cancer and NK cells. *Br.-J.-Cancer.* **68**, 845-850.
- Wallen, L.D., Myint, W., Nygard, K., Shimasaki, S., Clemmons, D.R. & Han, V.K. (1997) Cellular distribution of insulin-like growth factor binding protein mRNAs and peptides during rat lung development. *J.Endocrinol.* **155**, 313-327.
- Wan, H., Dawson, M.I., Hong, W.K. & Lotan, R. (1997) Enhancement of Calu-1 human lung carcinoma cell growth in serum-free medium by retinoids: dependence on AP-1 activation, but not on retinoid response element activation. *Oncogene.* **15**, 2109-2118.
- Wang, T.T. & Phang, J.M. (1996) Effect of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide on apoptosis in human breast cancer cells. *Cancer-Lett.* **107**, 65-71.
- Warrell, R.P. (1994) Applications for retinoids in cancer therapy. *Semin.-Hematol.* **31**, 1-13.
- Webber, M.M., Bello-DeOcampo, D., Quader, S., Deocampo, N.D., Metcalfe, W.S. & Sharp, R.M. (1999) Modulation of the malignant phenotype of human prostate cancer cells by N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR). *Clin.Exp.Metastasis* **17**, 255-263.
- Weber, E., Ravi, R.K., Knudsen, E.S., Williams, J., Dillehay, L.E., Nelkin, B.D., Kalemkerian, G., Feramisco, J.R. & Mabry, M. (1999) Retinoic acid-mediated growth inhibition of small cell lung cancer cells is associated with reduced myc and increased p27Kip1 expression. *Int.-J.-Cancer.* **80**, 935-943.
- Wegmann, B., Schoneberger, J., Kiefer, P.E., Jaques, G., Brandscheidt, D. & Havemann, K. (1993) Molecular cloning of IGFBP-5 from SCLC cell lines and expression of IGFBP-4, IGFBP-5 and IGFBP-6 in lung cancer cell lines and primary tumours. *Eur J.Cancer* **29A**, 1578-1584.
- Wingo, P.A., Ries, L.A., Giovino, G.A., Miller, D.S., Rosenberg, H.M., Shopland, D.R., Thun, M.J. & Edwards, B.K. (1999) Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1996, with a special section on lung cancer and tobacco smoking. *J.Natl.Cancer Inst.* **91**, 675-690.
- Wistuba, I.I., Bryant, D., Behrens, C., Milchgrub, S., Virmani, A.K., Ashfaq, R., Minna, J.D. & Gazdar, A.F. (1999) Comparison of features of human lung cancer cell lines and their corresponding tumors. *Clin.Cancer Res.* **5**, 991-1000.
- Wolf, M. (1998) Kleinzellige Bronchialkarzinome. Klinische Präsentation, Diagnostik und prognostische Faktoren. *Onkologe* **4**, 1005-1018.

- Wu, Q., Li, Y., Liu, R., Agadir, A., Lee, M.O., Liu, Y. & Zhang, X. (1997) Modulation of retinoic acid sensitivity in lung cancer cells through dynamic balance of orphan receptors nur77 and COUP-TF and their heterodimerization. *EMBO J.* **16**, 1656-1669.
- Wyllie, A.H. (1997) Apoptosis and carcinogenesis. *Eur.-J.-Cell-Biol.* **73**, 189-197.
- Xu, X.C., Ro, J.Y., Lee, J.S., Shin, D.M., Hong, W.K. & Lotan, R. (1994) Differential expression of nuclear retinoid receptors in normal, premalignant, and malignant head and neck tissues. *Cancer Res.* **54**, 3580-3587.
- Xu, X.C., Sozzi, G., Lee, J.S., Lee, J.J., Pastorino, U., Pilotti, S., Kurie, J.M., Hong, W.K. & Lotan, R. (1997) Suppression of retinoic acid receptor beta in non-small-cell lung cancer in vivo: implications for lung cancer development. *J.Natl.Cancer Inst.* **89**, 624-629.
- Zhang, X.K., Liu, Y., Lee, M.O. & Pfahl, M. (1994) A specific defect in the retinoic acid response associated with human lung cancer cell lines. *Cancer Res.* **54**, 5663-5669.
- Zhang, X.K., Mills, K.J., Dawson, M.I., Collins, S. & Jetten, A.M. (1995) Evidence for the Involvement of Retinoic Acid Receptor RARalpha-dependent Signaling Pathway in the Induction of Tissue Transglutaminase and Apoptosis by Retinoids. *J.-Biol.-Chem.* **270**, 6022-6029.
- Zheng, Y., Kramer, P.M., Olson, G., Lubet, R.A., Steele, V.E., Kelloff, G.J. & Pereira, M.A. (1997) Prevention by retinoids of azoxymethane-induced tumors and aberrant crypt foci and their modulation of cell proliferation in the colon of rats. *Carcinogenesis.* **18**, 2119-2125.
- Zheng, Y., Kramer, P.M., Lubet, R.A., Steele, V.E., Kelloff, G.J. & Pereira, M.A. (1999) Effect of retinoids on AOM-induced colon cancer in rats: modulation of cell proliferation, apoptosis and aberrant crypt foci. *Carcinogenesis* **20**, 255-260.
- Ziv, Y., Gupta, M.K., Milsom, J.W., Vladisavljevic, A., Brand, M. & Fazio, V.W. (1994) The effect of tamoxifen and fenretinimide on human colorectal cancer cell lines in vitro. *Anticancer Res.* **14**, 2005-2009.
- Zou, C.P., Clifford, J.L., Xu, X.C., Sacks, P.G., Chambon, P., Hong, W.K. & Lotan, R. (1994) Modulation by retinoic acid (RA) of squamous cell differentiation, cellular RA-binding proteins, and nuclear RA receptors in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Res.* **54**, 5479-5487.
- Zou, C., Wang, L., Liebert, M., Grossman, H.B., Lotan, R. & Wei, Q. (1998a) Combined effect of chemopreventive agent N-(4-hydroxyphenyl) retinamide (4-HPR) and gamma-radiation on bladder cancer cell lines. *Int.J.Oncol* **13**, 1037-1041.
- Zou, C.P., Kurie, J.M., Lotan, D., Zou, C.C., Hong, W.K. & Lotan, R. (1998b) Higher potency of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide than all-trans-retinoic acid in induction of apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines. *Clin.-Cancer-Res.* **4**, 1345-1355.