

Auftreten von autoreaktiven humanen anti-p53-Antikörpern und humanem löslichem CD58 im Serum bei unterschiedlichen Patientenpopulationen

Occurrence of autoreactive human anti-p53 antibodies and of soluble CD58 in serum of various patient populations

F.-J. Schmitz^{1,2}, G. Schmitz¹, H. Reinauer¹

Zusammenfassung

Das Auftreten von humanen Antikörpern gegen Protein p53 sowie von löslichem CD58 (sCD58) wurde in Seren von Patienten mit hämatologischen Systemerkrankungen (n = 139), intensivpflichtigen septischen Patienten (n = 55), Patienten mit Bronchialkarzinomen (n = 51), dialysepflichtigen Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (n = 60) und von gesunden Blutspendern als Kontrollkollektiv (n = 100) untersucht. Dabei zeigte sich, daß anti-p53-Antikörper im Serum sehr spezifisch aber wenig sensitiv für unterschiedliche maligne Erkrankungen sind. Während es bei den Bronchialkarzinomen keine Korrelation zur TNM-Klassifikation und zur Überlebenszeit gab, war der Antikörpernachweis bei den hämatologischen Systemerkrankungen mit einer verkürzten Überlebenszeit und einem schlechteren klinischen Zustand verbunden. Die Analyse der sCD58-Konzentrationen ergab keine eindeutige Differenz zwischen malignen und nicht-malignen sowie zwischen septischen und nicht-septischen Erkrankungen. Die Bedeutung des anti-p53-Antikörper-Nachweises und der sCD58-Konzentrationsbestimmung im Serum für die labormedizinische Routinediagnostik in der Zukunft muß durch längerfristige Verlaufsbeobachtungen an größeren Patientenkollektiven evaluiert werden.

Schlüsselwörter

Autoantikörper – Karzinome – Leukämie – Lymphome – Protein p53 – sCD58 – Sepsis

Summary

The occurrence of human antibodies against protein p53 as well as the concentration of soluble CD58 (sCD58) was determined in sera of patients with systemic haematological disorders (n = 139), septic ICU (intensive care unit) patients (n = 55), patients with lung carcinoma (n = 51), dialysis-dependent patients with chronic renal failure (n = 60), and of healthy blood donors (n = 100) as control group. It could be shown that the occurrence of anti-p53-antibodies in serum was highly specific but of poor sensitivity concerning a variety of malignancies. Whereas in cases of bronchogenic carcinoma no correlation could be found with TNM classification or survival time, the presence of antibodies in patients with systemic haematological disorders was associated with a shortened life expectancy and a reduced clinical shape. The determination of sCD58 concentrations in sera did not show any significant difference between malignant or non-malignant diseases as well as between septic or non-septic patients. The future role of anti-p53 antibody or sCD58 determination in routine laboratory cancer testing should be evaluated by long-term studies in a larger group of patients.

Key words

autoantibodies – carcinoma – leukaemia – lymphoma – protein p53 – sCD58 – sepsis

Einleitung

Tumorsuppressor-Gene stellen aufgrund ihrer physiologischen Barrierefunktion gegen klonale Proliferation und Genom-Mutationen sensible Schaltstellen für folgenschwere DNA-Schäden dar und sind normalerweise in der Lage, das unkontrollierte, durch Onkogene ausgelöste Wachstum und die Metastasierung von Zellen zu unterdrücken [1]. Ein Verlust der Tumorsuppressor-Funktion kann durch Mutationen des Genoms, durch chromosomale Aberrationen, Genkonversionen oder mitotische

¹ Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

² Korrespondenzadresse: Dr. F.-J. Schmitz, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Moorenstraße 5, D-40225 Düsseldorf. Fax: x49-211-311-8013

Teilungsfehler ausgelöst werden. Ebenso kann die Aktivität des Tumorsuppressors durch Interaktionen mit anderen Zellproteinen oder viralen Onkoproteinen beeinflusst werden [2]. Das p53-Tumorsuppressor-Gen ist in diesem Zusammenhang das auffälligste Beispiel, da es in 60–70 % aller Karzinomarten, die ein weites Gewebespektrum umfassen, in mutierter Form vorliegt [1, 2].

Das gegen Ende der 70-iger Jahre entdeckte Protein p53 ist ein nukleäres 53 kD Phosphoprotein, welches im wesentlichen für die Kontrolle des Zellzyklus, für DNA-Reparaturvorgänge und -Synthese sowie den programmierten Zelltod mitverantwortlich gemacht wird. Während der Wildtyp des p53-Gens charakteristische Merkmale eines rezessiven Tumorsuppressor-Gens aufweist, können mutierte Formen demgegenüber als dominante Onkogene fungieren. Alterationen des p53-Gens können sich in einer vollständigen Eliminierung des betroffenen Gens äußern oder aber in einer Unter- oder Überexpression des mutierten Proteins p53. Diese potentielle Überexpression sowie die erhöhte Stabilität des mutierten Proteins können zu einer massiven Akkumulation in der Zelle führen.

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, daß bei zahlreichen Karzinompatienten Autoantikörper gegen mutierte Formen des Protein p53 nachzuweisen sind [3, 4, 5]. Das Vorhandensein von Autoantikörpern ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß das vermehrte Auftreten von mutiertem Protein p53 eine immunologische Reaktion im betroffenen Organismus auslöst, wobei Protein p53 entweder durch Sekretion oder durch Zellnekrosen in die Blutbahn gelangt [1, 2].

Demgegenüber handelt es sich bei dem zellulären Adhäsionsmolekül CD58 um ein glykosyliertes Protein, welches von den Zellen der meisten Gewebe, einschließlich Epithelzellen, Endothelzellen und den Zellen des hämatopoetischen Systems, gebildet wird. Der natürliche Ligand des humanen Adhäsionsrezeptors CD58 ist das CD2-Molekül, und die Interaktion der beiden stellt einen wichtigen Faktor in der Antigen-spezifischen T-Zellaktivierung dar. CD58 ist darüberhinaus auch wichtig für die Antigenrezeptor-unabhängigen T-Zell-Aktivierungsprozesse. Das CD58/CD2-Paar spielt eine wichtige Rolle bei der direkten T-B-Zell-Interaktion, welche für die T-Zellhilfe benötigt wird [6]. Durch die Bindung von CD58 an CD2-positive Zellen wird die Rosettenbildung humaner T-Zellen inhibiert. Die gesteigerte Freisetzung von löslichem CD58 (sCD58) kann damit die intrazelluläre Adhäsion *in vivo* beeinträchtigen. Die löslichen CD58-Moleküle können mit T-Lymphozyten um die Bindung konkurrieren und damit eine Ablösung der T-Lymphozyten von membranständigen CD58-Rezeptoren bewirken. Die T-Lymphozytenaktivierung findet somit nicht oder nur verzögert statt, so daß eine Modulation des entzündlichen Geschehens eintritt [7]. Erhöhte sCD58 Werte wurden bei verschiedenen Erkrankungen gefunden [8]. Überdies soll sCD58 an Interaktionen beteiligt sein, die wichtig für die Biologie der akuten Leukämien sind [9].

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung sollte einerseits der Stellenwert des p53-Antikörpers als potentiell neuer und sensitiver Tumormarker untersucht werden. Andererseits sollte das Auftreten und die Konzentrationsverteilung von sCD58 bei malignen und septischen Krankheitsbildern beobachtet werden, um den Stellenwert als möglichen Tumormarker, insbesondere bei den hämatologischen Systemerkrankungen bzw. als Entzündungsparameter bei septischen Patienten, beurteilen zu können. Die kombinierte Bestimmung der beiden Parameter erschien insbesondere in Hinblick auf hämatologische Systemerkrankungen von Interesse, da beiden Parametern eine Beteiligung an der Genese der Leukämien zugeschrieben wird. Ob durch die Kombination die Sensitivität der Einzelparameter gesteigert werden kann, wurde anhand der Seren von 139 Patienten mit hämatologischen Systemerkrankungen untersucht. Seren von 51 Patienten mit Bronchialkarzinom dienten hierbei als Vergleichskollektiv.

Durch die Analyse von 55 Seren intensivpflichtiger, septischer Patienten ohne Malignom sollte der Stellenwert von sCD58 als Entzündungsmarker evaluiert werden. Seren von 100 gesunden Blutspendern und 60 dialysepflichtigen Patienten mit chronischer Nierensuffizienz dienten zur Erstellung des Referenzbereichs bzw. zur Beurteilung des Einflusses der Nierenfunktion auf die Wertverteilung.

Für den Nachweis von autoreaktiven humanen anti-p53-Antikörpern und die Bestimmung von humanem löslichem CD58 im Serum wurden kommerziell erhältliche Enzymimmunoassays verwendet.

Für den Nachweis von autoreaktiven humanen anti-p53-Antikörpern und die Bestimmung von humanem löslichem CD58 im Serum wurden kommerziell erhältliche Enzymimmunoassays verwendet.

Material und Methoden

Analysenmethoden

Der Test zum Nachweis von autoreaktiven, humanen anti-p53-Antikörpern (Fa. Dianova, Hamburg) stellt einen Sandwich-ELISA mit Festphase-gekoppeltem, rekombinantem p53-Protein dar, welches die anti-p53-Autoantikörper aus der Serumprobe bindet. Der Nachweis erfolgt über ein Peroxidase-konjugiertes anti-Human-IgG von der Ziege als Detektor und Messung einer Peroxidase-katalysierten Farbbildung. Als Substrat wird 3,3',5,5'-

Abkürzungen:

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
CD	Cluster of Differentiation
HNHL	Hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome
NNHL	Niedrigmaligne Non-Hodgkin-Lymphome
p53	Protein p53
TMB	Tetramethylbenzidin
TNM	Tumor, Node, Metastasis

Tetramethylbenzidin (TMB) verwendet. Jeweils 100 µl der 1:100 verdünnten Proben wurden in Doppelbestimmungen analysiert. Die Testdauer betrug ca. 2 h.

Als Packungs-Kontrollproben standen eine Negativ- und drei Positiv-Kontrollen (low, medium, high) zur Verfügung. Die eingesetzten Kontrollproben wurden im Western-Immunoblot auf Autoimmunreaktivität geprüft. Patientenserum, die im Western Blot deutlich positiv auffielen, hatten nach einer 1:100 Vorverdünnung Absorptionswerte oberhalb des Wertes der Low-Kontrolle. Im Western-Blot negativ gefundene Seren zeigten nach Vorverdünnung Absorptionswerte \leq den Werten der Negativkontrolle. Die Photometrie wurde an einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm durchgeführt. Der Leerwertabgleich der Mikrotiterplatten erfolgte bei 620 nm. Das Ergebnis des Tests ist qualitativ, d. h. Nachweis oder kein Nachweis von humanen autoaktiven anti-p53-Antikörpern. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden beim anti-p53-Antikörper-Test jeweils drei positive und drei negative Serumproben in 10 verschiedenen Testreihen mitgeführt.

Beim Test für humanes lösliches CD58 der Fa. Dianova (Hamburg) handelt es sich ebenfalls um einen Sandwich-Enzymimmunoassay mit einem Festphase-gekoppelten monoklonalen Antikörper als Fänger, der das sCD58 aus der Probe bindet. Der Nachweis des gebundenen Analyten erfolgt über einen biotinylierten zweiten monoklonalen Antikörper, der mit Streptavidin-Peroxidase gekoppelt ist. Als Substrat dient wiederum TMB. Die Absorbanz des gefärbten Produktes wird bei 450 nm, wie oben beschrieben, gemessen.

In den Test werden 50 µl der unverdünnten Probe eingesetzt. Die Testdauer beträgt ca. 3,5 h. Alle Messungen wurden im Doppelsätzen durchgeführt. Der Meßbereich des Assay reicht von 0,1–20 µg/l. Für den sCD58-Test konnten die Intra- und die Interassay-Präzision berechnet werden. Für die Interassay-Präzision wurden drei verschiedene Serumproben mit unterschiedlichen Konzentrationen in $n = 10$ voneinander unabhängigen Testserien gemessen. Für die Intraassay-Präzision wurden von diesen drei verschiedenen Serumproben $n = 20$ Messungen innerhalb einer Serie durchgeführt. Die Überprüfung der Verdünnungslinearität des sCD58-Assays erfolgte anhand von drei verschiedenen Patientenserum, die unverdünnt, 1:2, 1:4 und 1:8 analysiert wurden.

Untersuchte Sera

Die untersuchten Seren wurden entweder nach dem Eintreffen im Zentrallabor direkt analysiert oder aber nach dem Aliquotieren bei -70°C bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren.

Seren aus folgenden Patientenpopulationen wurden sowohl auf das Vorhandensein autoreaktiver anti-p53-Antikörper als auch auf die sCD58-Konzentrationen hin untersucht:

- Hämatologische Systemerkrankungen ($n = 139$)
- Intensivpflichtige septische Patienten ($n = 55$)
- Patienten mit Bronchialkarzinomen ($n = 51$)
- Dialysepflichtige Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz ($n = 60$) und
- unauffällige Blutspender ($n = 100$, je zur Hälfte Frauen und Männer).

Die Patienten mit hämatologischen Systemerkrankungen ($n = 139$) konnten wiederum in folgende Gruppen unterteilt werden:

1. Akute myeloische Leukämie (AML) ($n = 43$)
2. Akute lymphatische Leukämie (ALL) ($n = 41$)
3. Niedrigmaligne Non-Hodgkin-Lymphome (NNHL) ($n = 35$)
4. Hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome (HNHL) ($n = 20$).

Die intensivpflichtigen Patienten erfüllten hinsichtlich ihres Krankheitsbildes die von Bone aufgestellten Kriterien [10] für das Vorliegen einer Sepsis. Sie wiesen klinisch Zeichen einer Infektion auf mit Tachypnoe (> 20 Atemzüge pro Minute), Tachykardie (> 90 Schläge pro Minute) und Hypo ($< 35^\circ\text{C}$) bzw. Hyperthermie ($> 38^\circ\text{C}$). Aufgrund der in den Krankenakten dokumentierten eingehenden klinischen Untersuchungen, ausführlichen Anamnesen und labordiagnostischen Verfahren konnten Malignome bei den septischen Patienten weitestgehend ausgeschlossen werden.

Bei den Patienten mit Bronchialkarzinom ($n = 51$) konnten folgende histologische Typen unterschieden werden:

- Plattenepithel-Ca ($n = 17$)
- Kleinzelliges-Ca ($n = 16$)
- Undifferenziertes großzelliges-Ca ($n = 9$) und
- Karzinome mit Mischhistologie ($n = 10$).

Die untersuchten Seren, insbesondere der Malignompatienten, stammten sowohl von Patienten mit initial diagnostizierten Erkrankungen (Primärdiagnose) als auch von solchen, die sich bereits länger einer Therapie (Chemotherapie, Strahlentherapie) unterzogen hatten bzw. nur supportiv/palliativ behandelt wurden.

Bei der Analyse der Überlebenszeit wurden sowohl der Zeitraum ab Diagnosestellung bis zum Versterben der Patienten als auch die Zeitspanne nach der ersten Serumuntersuchung im Rahmen der vorliegenden Arbeit bis hin zum Tod des Patienten näher analysiert. Dabei ergaben sich jedoch im Vergleich der verschiedenen Beobachtungszeiträume keine Unterschiede hinsichtlich der Einbeziehung der Überlebenszeit in die Abschätzung der labormedizinischen und klinischen Wertigkeit der beiden untersuchten Parameter anti-p53-Ak-Nachweis und sCD58-Konzentration im Serum.

Für alle untersuchten Patientenpopulationen wurde der prozentuale Anteil der als positiv getesteten Seren (d. h. anti-p53-Ak-Nachweis) angegeben. Bei allen Patientenpopulationen wurde bezüglich der sCD58-Konzentration

nen der Mittelwert berechnet sowie der Bereich der Werte angegeben.

Statistik

Die statistische Auswertung für die Vergleiche zwischen dem Normalkollektiv (Blutspender) und den übrigen Populationen erfolgte mit Hilfe des t-Tests für unabhängige Stichproben. Mit dem t-Test für abhängige Stichproben wurden Auswertungen hinsichtlich möglicher Unterschiede innerhalb der einzelnen Kollektive durchgeführt.

Ergebnisse

Die gemessenen Daten zur Intra- und Interassay-Präzision des quantitativen sCD58-Assays sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 dargestellt. Die Präzision in der Serie wurde anhand von $n = 20$ Messungen bei drei unterschiedlichen Seren ermittelt. Die Berechnung der Varianz erfolgte dabei nur mit einem der beiden Meßwerte aus den Doppelansätzen. Zur Bestimmung der Präzision zwischen den Serien wurden drei verschiedene Serumproben in $n = 10$ voneinander unabhängigen Meßreihen an mehreren Tagen eingesetzt. Die Variationskoeffizienten der Intraassay-Präzision lagen zwischen 4 % und 10 %, die der Interassay-Präzision dagegen im Bereich von 5 % bis 11 %. Die Ergebnisse zur Untersuchung der Verdünnungslinearität sind in Tabelle 3 zusammengefaßt. Insgesamt

Tabelle 1. Präzision in der Serie beim sCD58-Assay ($n = 20$)

Serum-Nr.	Mittelwert ($\mu\text{g/l}$)	VK (%)
1	5,6	10,1
2	10,2	8,3
3	15,4	4,2

Tabelle 2. Präzision zwischen den Serien beim sCD58-Assay ($n = 20$)

Serum-Nr.	Mittelwert ($\mu\text{g/l}$)	VK (%)
1	4,8	10,9
2	9,6	7,6
3	15,8	4,9

Tabelle 3. Verdünnungslinearität von drei Seren beim sCD58-Test. Ergebnisse in $\mu\text{g/l}$

Proben-Nr.	1	2	3
unverdünnt	15,8	12,4	8,8
1 : 2	8,2 (104 %)	6,5 (105 %)	4,6 (105 %)
1 : 4	4,0 (101 %)	2,9 (92 %)	2,4 (109 %)
1 : 8	1,9 (96 %)	1,8 (116 %)	1,0 (91 %)

sind die Daten zur Verdünnungslinearität und Präzision zufriedenstellend und erfüllen die Anforderungen, die an moderne Enzymimmunoassays zu stellen sind.

Die gemessenen sCD58-Konzentrationen in den verschiedenen Patientenpopulationen sind in Tabelle 4 dargestellt. Die sCD58-Konzentrationen der 100 Blutspender bewegten sich zwischen 1,1 $\mu\text{g/l}$ und 5,3 $\mu\text{g/l}$ mit einem Mittelwert von 3,9 $\mu\text{g/l}$, wobei kein Unterschied zwischen Frauen und Männern gefunden werden konnte.

Bei den Patienten mit hämatologischen Systemerkrankungen waren die berechneten Mittelwerte mit 5,3 bis 6,4 $\mu\text{g/l}$ innerhalb der Gruppen 1 bis 4 höher als bei den Blutspendern. Statistisch signifikante Unterschiede ließen sich aber zwischen den einzelnen Gruppen nicht finden. Hier zeigte die klinische Untersuchung der Patienten mit höheren sCD58-Werten ($>10 \mu\text{g/ml}$), daß in dieser Population verstärkt eine B-Symptomatik mit Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsabnahme auftrat.

Interessant ist die Beobachtung, daß bei 8 von 13 Patienten mit positivem Nachweis von anti-p53-Antikörpern auch deutlich erhöhte sCD58-Werte ($> 10 \mu\text{g/l}$) zu finden waren.

Im Kollektiv der septischen intensivpflichtigen Patienten lagen die gemessenen sCD58-Konzentrationen zwischen 1,8 und 8,4 $\mu\text{g/l}$ bei einem Mittelwert von 4,9 $\mu\text{g/l}$. Obgleich der gefundene Mittelwert damit höher ist als der

Tabelle 4. sCD58-Konzentrationen in verschiedenen Patientenkollektiven

Patientenkollektiv	Anzahl (n)	Bereich der sCD58-Konzentrationen ($\mu\text{g/l}$)	Mittelwert ($\mu\text{g/l}$)
Blutspender	100	1,1 - 5,3	3,9
Hämatologische Systemerkrankungen	139	0,9 - 18,2	5,8
• AML	49	0,9 - 18,2	5,3
• ALL	41	1,2 - 16,4	5,7
• NNHL	35	1,4 - 17,3	5,7
• HNHL	20	1,3 - 16,2	6,4
Intensivpflichtige Patienten	55	1,8 - 8,4	4,9
Dialysepflichtige Patienten	60	1,3 - 6,9	4,5
Bronchialkarzinome	51	1,2 - 15,6	5,6
• Plattenepithel-CA	17	1,2 - 15,6	5,8
• Kleinzelliges Bronchial-CA	16	1,4 - 14,3	5,3
• Undifferenziertes großzelliges CA	9	1,7 - 12,4	5,2
• CA mit Mischhistologie	10	2,5 - 15,5	6,0

Vergleichswert im Normalkollektiv, ist der Unterschied dennoch nicht statistisch signifikant.

Die gemessenen sCD58-Konzentrationen bei den dialysepflichtigen Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz bewegten sich zwischen 1,3 und 6,9 µg/l und einem Mittelwert von 4,5 µg/l. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die Kontrollgruppe.

Die Patienten mit Bronchialkarzinomen unterschiedlicher Histologie hatten sCD58-Konzentrationen von 1,2 bis 15,6 µg/l. Es konnte bei den Patienten mit Bronchialkarzinomen keine eindeutige Korrelation zwischen der sCD58-Konzentration im Serum, dem jeweiligen Histologietyp, der Tumorausbreitung, dem Lymphknotenbefall, dem Grad der Metastasierung und der Überlebenszeit gefunden werden.

Die Ergebnisse der Reproduzierbarkeitsprüfung des anti-p53-Nachweises waren zufriedenstellend. Alle eingesetzten AK-positiven (n = 3) und AK-negativen (n = 3) Serumproben waren in zehn voneinander unabhängigen Testläufen eindeutig als positiv oder negativ zu identifizieren.

Die prozentuale Häufigkeit des Nachweises von autoreaktiven humanen anti-p53-Antikörpern in den untersuchten Patientenpopulationen ist in Tabelle 5 dargestellt. Wie zu erkennen ist, konnten im Kollektiv der gesunden Blutspender und der intensivpflichtigen septischen Pati-

enten in keinem Fall anti-p53-Antikörper im Serum gefunden werden. Damit scheint dieser Marker spezifisch für maligne Erkrankungen zu sein. Bei dem einzigen dialysepflichtigen Patienten mit positivem anti-p53-Antikörper-Nachweis konnte anamnestisch ein Nierenzellkarzinom mit konsekutiver Nierenexstirpation ermittelt werden. Die diagnostische Spezifität des anti-p53-Antikörper-Nachweises liegt in der vorliegenden Untersuchung damit bei 100 %.

Betrachtet man die prozentuale Häufigkeit des Vorkommens von anti-p53-Antikörpern innerhalb der Gruppe hämatologischer Systemerkrankungen, so finden sich diese bei allen Gruppen in 8 % bis 10 % der Fälle. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Populationen besteht somit nicht. Bei näherer Betrachtung und Analyse des klinischen Bildes der Patienten mit positivem anti-p53-AK-Nachweis fällt jedoch auf, daß dieses Kollektiv verstärkt unter der B-Symptomatik (Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsabnahme) litt.

Bemerkenswert ist darüberhinaus, daß die Überlebenszeit in dieser Patientengruppe häufig kürzer als in der Vergleichspopulation ohne anti-p53-AK-Nachweis war. Alle Patienten mit positivem Antikörper-Nachweis waren innerhalb des ersten Jahres nach den von uns durchgeführten Untersuchungen verstorben. Es muß aber darauf hingewiesen werden, daß es sich hierbei um einzelne klinische Beobachtungen handelt, die durch weiterführende Studien erhärtet werden müßten. Der anti-p53-Antikörper-Nachweis im Kollektiv der hämatologischen Systemerkrankungen scheint also mit einer schlechteren Prognose verbunden zu sein, ohne daß dies jedoch mit statistischer Signifikanz belegt werden kann.

Innerhalb der Gruppe der Patienten mit Bronchialkarzinomen unterschiedlicher Histologie lag die Häufigkeit des Antikörper-Nachweises zwischen 10 % und 18 %. Damit ergab sich zwischen den verschiedenen histologischen Formen kein statistisch signifikanter Unterschied. Die nähere klinische Untersuchung der Patienten mit positivem Nachweis von anti-p53-Antikörpern zeigt, daß keine Korrelation zur Tumorausbreitung, zum Lymphknotenbefall, zum Metastasierungsgrad und zur Überlebenszeit gefunden werden konnte. Bei den Bronchialkarzinom-Patienten scheint der anti-p53-Antikörper-Nachweis keine prognostische Bedeutung zu haben. Aber es muß auch hier betont werden, daß die untersuchte Fallzahl zu klein ist, um gesicherte Angaben machen zu können.

Diskussion

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigen, daß der Nachweis von humanen anti-p53-Antikörpern eine diagnostische Spezifität von 100 % für maligne Erkrankungen aufweist. In dieser Studie konnten weder in der Gruppe der gesunden Blutspender noch in der Population intensivpflichtiger septischer Patienten anti-p53-An-

Tabelle 5. Prozentualer Anteil des positiven anti-p53-Antikörper-Nachweises in verschiedenen Patientenkollektiven

Patientenkollektiv	Anzahl (n)	anti p53-AK-Nachweis positiv (n)	prozentualer Anteil (%)
Blutspender	100	0	0
Hämatologische Systemerkrankungen	139	13	9,4
• AML	49	4	8,2
• ALL	41	4	9,6
• NNHL	35	3	8,6
• HNHL	20	2	10,0
Intensivpflichtige Patienten	55	0	0
Dialysepflichtige Patienten	60	1	1,7
Bronchialkarzinome	51	7	13,7
• Plattenepithel-CA	17	3	17,7
• Kleinzelliges Bronchial-CA	16	2	12,5
• Undifferenziertes großzelliges CA	9	1	11,1
• CA mit Mischhistologie	10	1	10,0

tikörper nachgewiesen werden. Dies stimmt überein mit Angaben in der Literatur, so z. B. von *Angelopoulou* et al. [3], der in einem Kollektiv hospitalisierter Patienten ohne bekannte maligne Grunderkrankung ein Vorkommen der anti-p53-Antikörper von < 1 % nachwies. *Volkman* et al. [5] konnten bei 379 offensichtlich gesunden Kontrollpersonen in keinem einzigen Fall anti-p53-Antikörper finden.

Der hohen diagnostischen Spezifität ist allerdings eine geringe diagnostische Sensitivität des Antikörpernachweises gegenüberzustellen. Die Sensitivität des Tests bei hämatologisch-onkologischen Systemerkrankungen bewegt sich bei den hier vorgestellten Untersuchungsdaten zwischen 8,2 und 10 %. Die entsprechend errechneten Sensitivitätswerte für den Antikörper-Nachweis bei Bronchialkarzinomen verschiedener Histologie betragen zwischen 10,0 und 17,7 %.

Wie bereits erwähnt, findet man Alterationen des p53-Tumorsuppressor-Gens in 60–70 % aller Karzinomarten, die ein weites Gewebespektrum umfassen. In der Literatur wird z. B. der Alterationsgrad des Gens im Fall von Bronchialkarzinomen mit einer Häufigkeit von 45–65 % angegeben [1, 2]. Der Nachweis von anti-p53-Antikörpern als Reaktion auf diese Genmutation gelang in der vorliegenden Untersuchung in Abhängigkeit vom Histologietyp aber nur bei 10–18 %. In Übereinstimmung dazu beschrieben *Angelopoulou* et al. [3] die Prävalenz bei bösartigen Lungenerkrankungen mit 8 %, im Falle von Kolon-Karzinomen mit 15 % und bei Mamma-Karzinomen mit 5 %.

Im Falle des Bronchialkarzinoms konnte unsere Studie zeigen, daß keinerlei Korrelationen zwischen dem Nachweis von anti-p53-Antikörpern und der Tumorausbreitung, dem Lymphknotenbefall, dem Metastasierungsgrad oder der Überlebenszeit bestehen. Bei dieser Karzinomlokalisierung hat der anti-p53-Antikörper-Nachweis offenbar keine prognostische Bedeutung. Zur Erhärtung dieser Hypothese sind allerdings umfangreichere Verlaufsuntersuchungen an einem deutlich größeren Patientenkollektiv erforderlich.

Im Gegensatz zum Bronchialkarzinom zeigte sich bei den hämatologischen Systemerkrankungen, daß der Antikörpernachweis mit einer B-Symptomatik und einer verkürzten Überlebenszeit einherging. Dies steht in Einklang mit Untersuchungen von *Harris* et al. [2], die postulierten, daß ein Verlust der normalen p53-Funktion mit einem rapideren Verlauf der Erkrankung verbunden ist. In Zellen mit gestörter p53-Funktion verläuft die Genamplifikation deutlich beschleunigt. Darüberhinaus ist zu berücksichtigen, daß ein Verlust der normalen p53-Aktivität zu einer Reduktion des Ansprechens auf mögliche therapeutische Maßnahmen (Chemo-, Radiotherapie) führt [11, 12, 13]. In zukünftigen Untersuchungen sollte anhand großer Patientenkollektive geklärt werden, inwieweit ein Zusammenhang zwischen der Funktion des p53-Gens, dem Auftreten von anti-p53-Antikörpern im Serum, der Überlebenszeit im Falle maligner Erkrankun-

gen, dem Metastasierungsgrad des Karzinoms sowie der TNM-Klassifikation unter Berücksichtigung der Histologie besteht.

Ein möglicher Einsatz des anti-p53-Antikörper-Nachweises könnte zukünftig in der Verlaufskontrolle bei denjenigen Patienten in Frage kommen, die eine malignitätsverdächtige klinische Symptomatik aufweisen, bei denen aber kein Anstieg eines konventionellen Tumormarkers im Serum zu finden ist. In der Literatur [10] ist der Fall eines Patienten mit Kolon-Karzinom beschrieben, der Metastasen in der Leber entwickelte, zu diesem Zeitpunkt jedoch noch keinen Anstieg der klassischen Tumormarker zeigte. Demgegenüber waren anti-p53-Antikörper bereits nachweisbar, und erst 6 Monate später nahm auch die Konzentration des carcinoembryonalen Antigens (CEA) im Serum meßbar zu. Wie die meisten anderen Tumormarker ist allerdings auch der anti-p53-Antikörper-Nachweis nicht zum Screening auf eine spezielle Tumorerkrankung geeignet.

Die potentielle Bedeutung des Nachweises von löslichem CD58 (sCD58) liegt in der Bedeutung dieses Moleküls für die T-Zell-Aktivierung und den Verlauf entzündlicher Erkrankungen. Bei einigen Erkrankungen kommt es zur lokalen Freisetzung größerer Mengen an sCD58, sodaß die Balance zwischen membranständigen und löslichen CD58-Molekülen gestört ist [9, 14, 15]. Als Folge kann es daraufhin zu einer Blockade der interzellulären Adhäsion und einer Beeinträchtigung der T-Zell-Aktivierung kommen, wodurch entzündliche Reaktionen möglicherweise moduliert werden. Die lösliche Form des Adhäsions-Rezeptors CD58 kann in unterschiedlichen humanen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Hohe Konzentrationen finden sich z. B. im Serum von Hepatitis-Patienten, wobei allerdings keine Korrelation zum ätiologischen Typ hergestellt werden konnte [8]. In der vorliegenden Untersuchung wurden die sCD58-Konzentrationen bei verschiedenen Patienten-Kollektiven gemessen. Zwischen malignen und nicht-malignen Grunderkrankungen sowie zwischen septischen und nicht-septischen Erkrankungen konnten zwar Unterschiede festgestellt werden, die aber statistisch nicht signifikant waren. Interessanterweise wurden bei 8 von 13 Patienten mit hämatologischen Grunderkrankungen und gleichzeitig positivem Nachweis von anti-p53-Antikörpern erhöhte sCD58-Werte (> 10 µg/l) gefunden. Diese Patienten zeigten auch alle eine B-Symptomatik mit Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsabnahme. In der vorliegenden Untersuchung besaß die Bestimmung der sCD58 Konzentration eine prognostische Bedeutung, da erhöhte Werte bei Patienten mit hämatologischen Systemerkrankungen mit einem schlechteren klinischen Bild und einer reduzierten Überlebenszeit korrelierten. Diese Bedeutung als prognostischer Faktor muß allerdings noch näher untersucht werden.

Zum jetzigen Zeitpunkt sind die Erkenntnisse zur Bedeutung des anti-p53-Antikörper-Nachweises und der sCD58-Konzentrationsbestimmung im Serum noch Gegen-

stand wissenschaftlicher Forschung und Diskussion. Ihre Einsatzmöglichkeiten in der labormedizinischen Routinediagnostik müssen an größeren Patientenkollektiven im Rahmen von Verlaufsuntersuchungen in der Zukunft evaluiert werden.

Literatur

1. Montenarh M (1992) Biochemical, immunological and functional aspects of the growth-suppressor/oncoprotein p53. *Crit Rev Oncog* 3, 233–256
2. Harris CC, Hollstein M (1993) Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Eng J Med* 329, 1318–1327
3. Angelopoulou K, Diamandis EP, Sutherland DJ, Kellen JA, Bantings PS (1994) Prevalence of serum antibodies against the p53 tumor suppressor gene protein in various cancers. *Int J Cancer* 58, 480–487
4. Marxsen J, Schmiegel W, Roder C, Harder R, Juhl H, Henne-Bruns D, Kremer, B (1994) Detection of the anti-p53 antibody response in malignant and benign pancreatic disease. *Br J Cancer* 70, 1031–1034
5. Volkmann M, Müller M, Hoffman WJ (1993) The humoral immune response to p53 in patients with hepatocellular carcinoma is specific for malignancy and independent of the alpha-fetoprotein status. *Hepatology* 18, 559–565
6. Albert-Wolf M, Meuer SC, Wallich R (1991) Dual function of recombinant human CD58 inhibition of T-cell adhesion and activation via the CD2 pathway. *Internat Immunology* 3, 1335–1347
7. Liang Q, Schürmann G, Betzler M, Meuer SC (1991) Activation and signaling status of human lamina propria T lymphocytes. *Gastroenterology* 101, 1529–1536
8. Hoffmann JC, Dengler TJ, Knolle PA, Albert-Wolf M, Roux M, Wallich R, Meuer SC (1993) A soluble form of the adhesion receptor CD58 (LFA-3) is present in human body fluids. *Eur J Immunol* 23, 3003–3010
9. Archimbaud E, Thomas X, Kampos L, Magaud JP, Dore JF, Fiere D (1992) Expression of surface adhesion molecules CD54 (ICAM-1) and CD58 (LFA-3) in adult acute leukemia. Relationship with initial characteristics and prognosis. *Leukemia* 6, 265–271
10. Bone RC (1991) Let's agree on terminology: Definition of Sepsis. *Crit Care Med* 19, 973–976
11. Lee JM, Bernstein A (1993) p53 mutations increase resistance to ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 5742–5746
12. Sliehmeyer WJ, Nelson WG, Slebos RJ, Kastan MB (1993) Loss of a p53-associated G1 checkpoint does not decrease cell survival following DNA damage. *Cancer Res* 53, 4164–4168
13. Begg AC (1993) Critical appraisal of in situ cell kinetic measurements as response predictors in human tumors. *Semin Radiat Oncol* 3, 144–151
14. Scirren CA, Völpel H, Meuer SC (1992) Adhesion molecules on freshly recovered T-leukemias promote tumor-directed lympholysis. *Blood* 79, 138–143
15. Roux M, Schraven B, Roux A, Gamm H, Mertelsmann R, Meuer SC (1991) Natural inhibitors of T-cell activation in Hodgkin's disease. *Blood* 78, 2365–2371