

PDF hosted at the Radboud Repository of the Radboud University Nijmegen

The following full text is a publisher's version.

For additional information about this publication click this link.

<http://hdl.handle.net/2066/24108>

Please be advised that this information was generated on 2018-07-07 and may be subject to change.

Van bakkersgist (*Saccharomyces cerevisiae*) is een aantal mutanten bekend, de *RAD52*-epistasegroep, die een deficiëntie vertonen in het recombinatieherstel van dubbelstrengsbreuken. De meeste hierbij betrokken genen zijn inmiddels geïsoleerd en in zekere mate gekarakteriseerd. Uit onderzoek is gebleken dat genen die betrokken zijn bij verschillende herstelmechanismen evolutionair geconserveerd zijn. Dit geldt ook voor recombinatieherstel. Gebruikmakend van deze conservering is het mogelijk genen te isoleren bij hogere organismen, die homoloog zijn aan genen uit de *RAD52*-groep. Onderzoek naar functie en eigenschappen van dergelijke genen bij de mens en de muis kan inzicht geven in het mechanisme van recombinatieherstel en andere recombinatieprocessen bij zoogdieren.

RAD54 is een van de genen uit de *RAD52*-groep. De exacte functie van het genproduct, het Rad54-eiwit, is niet bekend. Op basis van homologie in de aminozuurvolgorde behoort Rad54 tot de SNF2/SWI2-eiwitfamilie, die gekenmerkt wordt door 7 geconserveerde domeinen. Van een aantal eiwitten in deze familie is aangetoond dat ze betrokken zijn bij het veranderen van de chromatinestructuur. Rad54 zou eveneens een dergelijke functie kunnen hebben, zodat DNA-ketens beschikbaar komen voor recombinatie. Op basis van sequentiehomologie zijn bij de muis en de mens 2 genen geïsoleerd: *mHR54* ('mouse homologue' van *RAD54*) en *hHR54* ('human homologue' van *RAD54*). De *hHR54*- en *Rad54*-eiwitten vertonen een significante homologie, met 48% identieke en 68% vergelijkbare aminozuren. *hHR54* en *mHR54* vertonen een onderlinge homologie van 96%. Een verder bewijs dat *hHR54* het humane homoloog van *RAD54* is, is dat *hHR54* in gist de hersteldeficiëntie van *rad54*-mutanten gedeeltelijk kan corrigeren. Het *hHR54*-gen is gelokaliseerd op chromosoom 1p³²⁻³³. Bij 70% van de neuroblastoompatiënten vertonen tumorcellen deleties rond deze chromosomale regio. Een rol voor *hHR54*-mutaties bij het ontwikkelen van deze tumoren is echter nog niet aangetoond.

In het kader van onderzoek naar eigenschappen en functies van de *RAD54*-homologen bij muis en mens zijn expressiestudies verricht op transcriptieniveau. In tegenstelling tot gist-*RAD54* is in 3 humane cellijnen geen inductie gevonden van de expressie van *hHR54* na bestraling. In gist is deze bestralingsinductie echter niet noodzakelijk voor het correct verlopen van het recombinatieherstel. Tijdens de celdelingscyclus wordt de expressie van *hHR54* gereguleerd. Er is een drievoudige toename van de expressie laat in de G₁-fase. Een dergelijke regulatie is gevonden voor *RAD54* in gist. Daarnaast is bekend dat in voorlopercellen van lymfocyten de V-(D)-J-recombinatie in deze fase wordt geïnitieerd. Bij de muis werd een weefselspecifieke expressie van *mHR54* gevonden, vooral in thymus, milt en testis was de expressie verhoogd. In deze weefsels vinden recombinatieprocessen plaats tijdens de lymfocytenuitrijping of spermatogenese. Expressie van *mHR54* werd eveneens bepaald in cellen uit verschillende stadia van de spermatogenese. De hoogste expressie vond plaats in spermatocyten, het stadium waarin de meiose plaatsvindt.

Conclusies. *mHR54* en *hHR54* zijn homologen van gist-*RAD54* bij respectievelijk de muis en de mens. De resultaten van de expressiestudies suggereren dat deze genen ook bij zoogdieren betrokken zijn bij meiotische en V-(D)-J-recombinatie.

Verder onderzoek naar functie en eigenschappen van *RAD54*-homologen zal worden verricht door middel van studies op eiwitniveau en met behulp van *RAD54*-deficiënte muiszellijnen en muizenstammen. Gecombineerd met resultaten van studies aan homologen van andere genen uit de *RAD52*-groep probeert dit onderzoek bij te dragen tot een groter inzicht in recombinatieprocessen en in het bijzonder het herstel van stralingsgeïnduceerde DNA-schade.

J.Bussink, J.H.A.M.Kaanders, P.F.J.W.Rijken, H.A.M.Marres en A.J.van der Kogel (Nijmegen), *Analyse van vasculatuur en perfusie en de relatie met proliferatie in humane tumorxenotransplantaten*

De combinatie van versneld gefractioneerde bestraling, carbogeen ademen en nicotinamide (ARCON), wordt momenteel onderzocht in klinische fase II-studies. Het doel van deze gecombineerde behandeling is om de tumor minder gelegenheid te geven tot proliferatie tijdens de behandeling en om hypoxie in de tumor te verminderen. Voorspellende tests zijn nodig om patiënten te identificeren die voordeel zouden kunnen hebben bij deze behandeling.

Doel. Het doel van het onderzoek is om simultaan vasculaire architectuur, bloedperfusie en proliferatiekarakteristieken in tumorcoupes te bestuderen en om te onderzoeken welke invloed bestraling, carbogeen en nicotinamide hierop hebben.

Methoden. Een humane larynxtumor (plaveiselcelcarcinoom) werd primair getransplanteerd op de achterpoot van thymusloze muizen. De bestraling vond plaats onder enfluraanarcose waarbij lucht of carbogeen ingeademd werd. De muizen kregen 15-40 min voor de bestraling een injectie nicotinamide (500 mg/kg i.p.). Niet-bestraalde dieren werden ook met carbogeen en nicotinamide behandeld. Voordat de tumoren zijn verzameld werden Hoechst 33342 en (bromodeoxy)uridine (BrdUrd) bij de muizen geïnjecteerd als respectievelijk perfusie- en proliferatiemarkers.

Analyse van vasculatuur/perfusie en proliferatie: coupes werden geanalyseerd door gebruik te maken van een meerstapskleuring in combinatie met een computergestuurde microscoop en een digitaal beeldanalysestelsel. Een anti-endotheliantilichaam (9F1) werd gebruikt om vasculaire structuren aan te kleuren. Iedere coupe werd gekleurd en 4 keer gescand (Hoechst, 9F1, BrdUrd en Fast Blue als kernkleuring). Als deze 4 digitale beelden waren opgeslagen en gecombineerd, volgde de analyse van perfusie, vascularisatie en proliferatie. Vervolgens werden vasculaire domeinen geconstrueerd. De grenzen van deze domeinen werden bepaald door een gelijke afstand tot in elkaars omgeving liggende vaten. Parameters in geperfundeerde en niet-geperfundeerde domeinen werden vergeleken.

Resultaten. De labelingindex (LI) werd gedefinieerd als het BrdUrd-gelabelde (kern)oppervlak ten opzichte van het totale kernoppervlak. De LI gebaseerd op manuele telling correleerde sterk met de door deze methode bepaalde LI. Geperfundeerde domeinen lieten een hogere LI zien vergeleken met niet-geperfundeerde domeinen. De LI nam exponentieel af bij toenemende afstand tot het meest nabijge vat. Het totale oppervlak van de vaten ten opzichte van het tumoroppervlak was in de nicotinamide- en carbogeen-groep significant groter dan in de controlegroep. Er was een afname in de curatieve dosis (TCD₅₀) in de nicotinamide- en carbogeen-groep (24,2 in vergelijking met 31,6 Gy in lucht en zonder nicotinamide) 90 dagen na de behandeling.

Conclusie. Deze methode laat zien dat perfusie, vascularisatie en proliferatie bestudeerd kunnen worden in één en dezelfde coupe. In dit tumormodel is er sprake van een sterke invloed van carbogeen en nicotinamide op de vasculatuur en tevens van een verlaging van de TCD₅₀ voor radiotherapie. De methode kan van voorspellende waarde zijn bij de keuze van een dergelijke behandeling.

L.C.G.Verhoef, I.J.Unic, P.F.M.Stalmeier en W.A.J.van Daal (Nijmegen), *Individuele besliskundige ondersteuning bij de keuze tussen profylactische mastectomie of screening bij vrouwen met een sterk verhoogd risico op mammacarcinoom*

De recente ontdekking van de BRCA-1- en BRCA-2-mutaties hebben het mogelijk gemaakt dat vrouwen met een zeer hoog risico op borstkanker (85%) te identificeren. Deze vrouwen kunnen kiezen voor een bilaterale profylactische mastectomie (PM) teneinde borstkanker te voorkomen of voor regelmatige screening, om een tumor in een vroeg stadium op te sporen. Mogelijk kan individuele beslissingsondersteuning bij deze keuze van nut zijn. Bij 24 vrouwen met een sterk belaste familieanamnese werd deze procedure toegepast.

Methoden. Met behulp van een Markov-beslismodel werden PM en screening vergeleken met betrekking tot hun effect op levensverwachting en voor kwaliteit van leven gecorrigeerde levensverwachting. Het risico om borstkanker te ontwikkelen en om hieraan te overlijden werd gemodelleerd. Nadat de vrouw uitgebreide mondelinge, schriftelijke en audiovisuele informatie had gekregen, werden bij tenminste twee gelegenheden utiliteitstests afgenomen, teneinde haar subjectieve waardering (utiliteit) voor het leven na PM te meten. Tevens werd de houding ten aanzien van het nemen van risico's gemeten. Indien er een discrepantie was tussen de eerste twee metingen, werd een derde meting verricht. De individuele testresultaten werden in de beslisboom verwerkt, zodat voor iedere vrouw het effect van PM en screening op de voor kwaliteit van leven gecorrigeerde levensverwachting kon worden geschat.

Resultaten. Van de 24 vrouwen ronden 22 de procedure af. De gemiddelde utiliteit van PM in de laatste testreplicatie was 0,67 (SD: 0,32). Ondanks de grote spreiding was de correlatie tussen de laatste 2 testreplicaties echter 0,96. Op grond van het beslismodel werd 12 maal PM en 10 maal screening geadviseerd. Inmiddels namen 10 vrouwen een definitieve beslissing; in alle 10 de gevallen kwam deze overeen met het besliskundig advies.

Conclusies. De besliskundige procedure werd goed geaccepteerd. Er is grote interindividuele variatie in de utiliteit van PM. Individuele utiliteiten zijn echter goed reproduceerbaar, zodat deze variatie waarschijnlijk werkelijke verschillen tussen individuen weerspiegelt. Deze verschillen vertalen zich ook in de uiteindelijke keuze. Het is daarom belangrijk de vrouw de gelegenheid te geven mee te denken.

M.Verheij, A.Haimovitz-Friedman, Z.Fuks en R.Kolesnick (New York, USA; Amsterdam), *De rol van de sfigomyeline-sigtaaltransductieroute bij stress-geïnduceerde apoptose*

Blootstelling aan extracellulaire stressfactoren, waaronder ioniserende straling, leidt in veel celsystemen tot de inductie van geprogrammeerde celdood of apoptose. Recentelijk is aangetoond dat de sfigomyeline-sigtaaltransductieroute hierbij een belangrijke rol speelt. Activering van dit systeem leidt tot hydrolyse van het celmembraangebonden fosfolipide sfigomyeline tot ceramide, een biologisch zeer effectief molecuul dat een cascade van intracellulaire reacties in gang zet, uiteindelijk resulterend in apoptotische DNA-degradatie.

Behandeling van humane U937-leukemiecellen en bovine aorta-endothelcellen met diverse stressfactoren (ioniserende straling, UV, H₂O₂, hyperthermie of tumornecrosisfactor (TNF α)) leidt tot een snelle stijging van intracellulair ceramide en tot de inductie van apoptose op een tijds- en dosisafhankelijke wijze. Synthetische ceramide-analogen zoals C₂-ceramide induceren eveneens apoptotische kernveranderingen, maar andere lipiden zoals arachidonzuur, fosfatidylzuur, diacylglycerol en dihydroceramide bleken niet in staat apoptose te induceren.

Aangezien sommige vormen van stress het zogenaamde 'stress activated protein kinase' (SAPK of c-Jun-kinase) active-

ren, hebben wij onderzocht of ceramide een proximale activator is van SAPK. Ceramide blijkt inderdaad een efficiënte en specifieke activator van SAPK te zijn. Om aan te tonen dat activering van SAPK essentieel is voor stress-geïnduceerde apoptose, werden cellen getransfecteerd met een dominant-negatieve c-Jun-deletiemutant, TAM-67. Overexpressie van TAM-67 leidde tot een vrijwel volledige remming van ceramide- en stress-geïnduceerde apoptose. Stress activeert niet het verwante 'mitogen activated protein kinase', dat betrokken is bij mitogenese en differentiatie.

Deze studies tonen aan dat ceramide-gemedieerde activering van SAPK een belangrijke schakel is in de signaaltransductieroute die leidt tot stress-geïnduceerde apoptose.

C.Rasch, R.Keus, W.Koops, F.Pameyer, M.van Herk en J.Lebesque (Amsterdam), *CT-MRI-matching voor planning van radiotherapie bij hoofdhalstumoren*

Doel. Het evalueren van de haalbaarheid en toegevoegde waarde van het matchen van CT- en MRI-datasets in radiotherapieplanning voor hoofdhalstumoren.

Patiënten en methoden. MRI-scans van 9 patiënten met lokaal inoperabele hoofdhalstumoren werden driedimensioneel gematcht met CT-scans in radiotherapiehouding. Tumorlokalisaties waren parotis (3), nasofarynx (4), orbita (lymfoom; 1) en sinus ethmoidalis (1). De MRI-scans waren niet noodzakelijkerwijs in radiotherapiepositie en werden automatisch gematcht met de CT-scans door middel van 'chamfer matching'. De software gebruikt de schedel om de gehele MR met de CT te correleren door middel van rotatie, translatie en schaling. Het 'gross'-tumorvolume (GTV) werd ingetekend op CT en MRI. De volumens werden vergeleken tussen de datasets (interdatasetvariatie) en tussen de observers (interobservervariatie).

Resultaten. Bij alle patiënten werd een match met een nauwkeurigheid van 1 mm verkregen. In de nekregio was de nauwkeurigheid lager door verschil in houding van de patiënt op de CT en de MRI.

Bij geen van de patiënten omhulde een volume, ingetekend door een individuele observer op een dataset volledig enig ander volume ingetekend op een andere dataset van dezelfde patiënt en observer.

Voor de 4 patiënten van wie een additionele sagittale of coronale MRI-dataset beschikbaar was, bleek de interobservervariatie in de cranio-caudale richting kleiner vergeleken met de axiale MRI. De verhouding van observergemiddelde GTV's, CT/MRI was tussen 0,8 en 2,6. De gemiddelde verhouding tussen CT- en MRI-GTV's (CT-GTV (gemiddeld per patiënt)/MRI-GTV (gemiddeld per patiënt)) was 1,29. Bij alle patiënten met een KNO-tumor (niet bij de patiënt met een orbitalymfoom) was de interobservervariatie groter op CT dan op MRI. De relatieve interobservervariatie (de variatie relatief ten opzichte van het gemiddelde volume van de patiënt) was voor de CT 0,28-1,79 en voor de MRI 0,40-1,74. De verhouding tussen gemeenschappelijk (gemeenschappelijk voor alle observers bij een patiënt) en het omhullende volume (omhullend volume voor alle observers bij een patiënt) was groter voor de CT (0,2-1,7) dan voor de MRI (0,4-1,6).

Conclusies. CT-MRI-matching bij hoofdhalstumoren is mogelijk op een routinematige basis. De interobservervariatie is minder op de MRI dan op de CT. CT-MRI-matching bij hoofdhalstumoren maakt een betere afgrenzing van het radiotherapeutisch doelvolume mogelijk. Dit maakt kleinere marges in conformatietherapie mogelijk, hetgeen uiteindelijk kan leiden tot hogere tumordoses zonder toename van complicaties in het normale weefsel.