

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin,
der Abteilung für Hämatologie und Onkologie,
der Einrichtung für Knochenmarktransplantation
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.
Ärztlicher Leiter: Prof. Dr. Dr. h. c. Axel R. Zander FACP

**Die Transkription humaner Muzingene in Zellen
unterschiedlicher Provenienz**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt
von
Christina Gröger
aus Hamburg

Hamburg, 2004

Meinen Eltern Heike und Michael Gröger gewidmet.

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am 25.11.2005.

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. W. Krüger

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. A.R. Zander

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: PD Dr. M. Jücker

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Verzeichnis der Abkürzungen	6
I. Einleitung	8
1.0 Minimale Resterkrankung – minimal residual disease - MRD	8
1.1 Detektion zirkulierender Tumorzellen – historischer Verlauf	8
1.2 MRD bei hämatologischen Neoplasien	10
1.3 MRD bei soliden epithelialen Tumoren	13
2.0 Detektion disseminierter Tumorzellen bei epithelialen Tumoren	14
2.1 Zytologischer und histopathologischer Nachweis einer MRD	15
2.2 Immunzytochemischer Nachweis einer MRD	16
2.3 Molekulargenetischer Nachweis einer MRD	20
2.4 Sensitivität und Spezifität der epithelialen Marker	24
2.4.1 Muzine	24
2.4.2 Zytokeratine	25
3.0 Methodische Aspekte	26
3.1 Immunzytochemie / Immunhistologie	26
3.2 Zellkulturmethoden	28
3.3 Polymerase Kettenreaktion	29
3.3.1 rt-PCR	29
3.3.2 TaqMan PCR	32
3.3.3 Immunobead rt-PCR	33
3.4 Einfluss der Probengewinnung	34
3.5 Detektion von MRD in Knochenmark vs. Lymphknotengewebe vs. Blut	35
4.0 Prozess der Metastasierung	37
5.0 Humane Muzine – Muc1, Muc2, Muc3	41
II. Fragestellung der Arbeit	46
III. Material und Methoden	47
1. Geräte und Materialien	47
2. Methode	49

3. Zelllinien	49
Tabelle 3 - verwendete Zelllinien - Name/Herkunft/Zelltyp	49
4. Zellkultur der Zelllinien	50
5. Zytokinstimulierung der Zelllinien und klinischen Proben	50
6. Patienten	51
7. Klinische Proben	52
8. RNS-Extraktion	52
9. Reverse Transkription	53
10. Polymerase-Kettenreaktion	53
11. Datenverarbeitung	56
IV. Ergebnisse	57
1.0 Etablierung einer Muc1 rt-PCR	57
1.1 Evaluation einer Muc1 Transkription in humanen Zelllinien	58
1.2 Evaluation einer Muc1 Transkription an klinischen Proben	59
2.0 Etablierung einer Muc2 rt-PCR	61
2.1 Evaluation einer Muc2 Transkription in humanen Zelllinien	62
2.2 Evaluation einer Muc2 Transkription an klinischen Proben	64
3.0 Etablierung einer Muc3 rt-PCR	65
3.1 Evaluation einer Muc3 Transkription in humanen Zelllinien	66
3.2 Evaluation einer Muc3 Transkription an klinischen Proben	68
4.0 Evaluation der Induzierbarkeit einer Muc1, Muc2 und Muc3 mRNA durch Zytokine in vitro	70
4.1 Evaluation der Induzierbarkeit einer Muc1 Transkription	71
4.2 Evaluation der Induzierbarkeit einer Muc2 Transkription	73
4.3 Evaluation der Induzierbarkeit einer Muc3 Transkription	75
V. Diskussion	78
1.0 Die Transkription humaner Muzingene in Zellen unterschiedlicher Provenienz	78
2.0 Die Transkription des humanen Muc1 in Zellen unterschiedlicher Provenienz	78

2.1	Stabilität der Muc1 Transkription nach der in vitro Stimulation mit unterschiedlichen Zytokinen	82
3.0	Die Transkription des humanen Muc2 in Zellen unterschiedlicher Provenienz	83
3.1	Stabilität der Muc2 Transkription nach der in vitro Stimulation mit unterschiedlichen Zytokinen	86
4.0	Die Transkription des humanen Muc3 in Zellen unterschiedlicher Provenienz	87
4.1	Stabilität der Muc3 Transkription nach der in vitro Stimulation mit unterschiedlichen Zytokinen	90
VI.	Zusammenfassung der Arbeit	92
VII.	Literaturverzeichnis	94
VIII.	Danksagung	109
IX.	Lebenslauf	110
X.	Eidesstattliche Versicherung	112

Verzeichnis der Abkürzungen

- ALL akute lymphatische Leukämie
- AML akute myeloische Leukämie
- APAAP Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase
- APL akute Panmyelozytenleukämie
- Bp Basenpaar(e)
- cDNS komplementäre DNS
- CEA Carcinoembryogenes Antigen
- CID chronisch entzündliche Erkrankung
- CK Zytokeratin
- CML chronisch myeloische Leukämie
- DC dendritische Knochenmarkzellen
- DMSO Dimethylsulfoxid
- DNS Desoxyribonukleinsäure
- dNTP Desoxynukleosidtriphosphate
- EGFR Endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor
- EMA Epitheliales Membran Antigen
- Fa. Firma
- FCS Fetales Kälber Serum
- flt-3 FLT-3 Ligand
- γ -INF Gamma-Interferon
- G-CSF Granulozyten-Kolonie Stimulierender Faktor
- GM-CSF Granulozyten/Makrophagen-Kolonie Stimulierender Faktor
- HMFG Human Milk Fat Globulin
- ICC Immunzytochemie
- IDC invasiv duktales Mammakarzinom
- IL Interleukin
- INF- γ Interferon-Gamma
- KM Knochenmark
- LK Lymphknoten
- Lp Leukapherese
- mAk monoklonaler Antikörper
- MDS Myelodysplastisches Syndrom
- MNC mononukleäre Zellen

-
- MRD minimale Resterkrankung
 - mRNS messenger-RNS
 - mSS makroskopische Seriensektion
 - MSZ mesenchymale Stammzellen
 - Muc Muzin(e)
 - NHL Non-Hodgkin Lymphom
 - NSCLC Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
 - OMF Osteomyelofibrose
 - o.WF ohne Wachstumsfaktor
 - pB peripheres Blut
 - PBMN periphere mononukleäre Blutzellen
 - PBS Phosphate buffered Saline
 - PBSC periphere Blutstammzellen
 - PEM polymorphes epitheliales Muzin
 - PCR Polymerase-Kettenreaktion
 - PML Promyelozyten Leukämie
 - PP Primerpaar
 - PSA Prostata-spezifisches Antigen
 - RNS Ribonukleinsäure
 - rt Reverse Transkriptase
 - rt-PCR Reverse Transkriptase-PCR
 - SAA schwere Aplastische Anämie
 - SCF Stammzellfaktor
 - sMuc lösliches Muzin
 - Sp Spur
 - TAG tumorassoziiertes Glykoprotein
 - TK Tyrosinkinase
 - TKI Tyrosinkinase Inhibitor
 - TNF- α Tumornekrose Faktor - alpha
 - TPO Thrombopoietin
 - UICC Unio internationalis contra cancerum
 - Upm Umdrehungen pro Minute

I. Einleitung

1.0 Minimale Resterkrankung - minimal residual disease - MRD

Bei hämatologischen und soliden Tumorerkrankungen können nach erfolgter Initialtherapie eines Primärtumors, im Stadium der Vollremission, dann wenn mittels klassischer Staging-Methoden keine nachweisbare Tumormasse mehr zu identifizieren ist, noch systemische subklinische Tumorableger vorhanden sein. Diese Tumorzellpopulationen werden als minimale Resterkrankung oder minimal residual disease (MRD) bezeichnet [20].

Patienten im Stadium der Vollremission gelten zunächst als kurativ behandelt. Jedoch geht man davon aus, dass eine unterhalb der Nachweisgrenze vorhandene minimale Resterkrankung bei einem Teil, der als tumorfrei erscheinenden Patienten zu Rezidiven führen kann [113], [28].

Die Existenz der minimalen Resterkrankung wurde erst mit der Einführung von hochempfindlichen Methoden in die Diagnostik bewiesen, deren Aufkommen nachfolgend in ihrem historischen Verlauf kurz geschildert werden soll.

1.1 Detektion zirkulierender Tumorzellen – historischer Verlauf

Die erste Publikation über zirkulierende Tumorzellen stammt aus dem Jahre 1869 von Ashworth und beschreibt den Fall eines Tumorpatienten, bei welchem post mortem Zellen im Blut gefunden wurden, die denen im Tumor mikroskopisch ähnelten [1].

Bis 1955, als Engell eine erste große systematische Studie über zirkulierende Tumorzellen veröffentlichte, sind nur gelegentliche Berichte über dieses Thema zu finden. Engell untersuchte in dieser Studie venöse Blutproben von 140 Patienten mit unterschiedlichen Arten von Tumoren. Er fand unter Verwendung einer Zellblocktechnik in mehr als 50% der Fälle Tumorzellen im Blut von Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren [29]. Diese Veröffentlichung fand große Anerkennung, so dass daraufhin eine Vielzahl von verschiedenen Arbeitsgruppen sich mit diesem Thema zu beschäftigen begann. Bis 1965 sind über 5000 Patienten von mehr als 40 verschiedenen Arbeitsgruppen mit unterschiedlichen zytologischen Methoden auf zirkulierende Tumorzellen untersucht worden. Hierbei ergaben sich Positivitätsraten von 1,5% bis zu 96,5% an zirkulierenden Tumorzellen im venösen Blut von Tumorpatienten. Diese Ergebnisse mussten jedoch wegen zu geringer Spezifitäten der unterschiedlichen Methoden zum Zellenachweis, für nicht verwertbar erklärt werden. Das Problem war eine Verknüpfung von zirkulierenden Anteilen des Knochenmarks, insbesondere der Megakaryozyten, als Tumorzellen [16].

Als sich aber die Zellkonservierungstechniken verbesserten und eine genauere morphologische Analyse ermöglichten, zeigte sich, dass die bisher verwendeten zytologischen Methoden auch eine sehr niedrige Sensitivität besaßen. Daraus folgend wurden die zytologischen Untersuchungen von Blutproben auf zirkulierende Tumorzellen wieder verlassen [41].

Ungefähr 20 Jahre später, mit dem Aufkommen der Immunhistochemie Anfang der achtziger Jahre, wurde das Problem der zirkulierenden Tumorzellen und minimaler Resterkrankung wieder thematisiert. Man entwickelte sensitive, immunzytologische Testverfahren zur Detektion von Tumorzellen in Blut und Knochenmark mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern. Als Beispiele seien die Untersuchungen von Redding et al. und Stahel et al. an Knochenmarkproben von Patienten mit Mamma- und Lungenzellkarzinomen genannt, die zusätzlich auch zeigen konnten, dass diese Verfahren eine Knochenmarksbeteiligung mit höherer Sensitivität erkennen als rein histopathologische Aufarbeitungen [104], [117].

Mit der Entwicklung der Polymerase Kettenreaktion (PCR) von Mullis und Faloona in der Mitte der achtziger Jahre [90], stand nunmehr für die Detektion von disseminierten Tumorzellen oder minimaler Resterkrankung eine noch sensitivere Methode zur Verfügung. Seit 1987 wurden PCR-Verfahren zur Identifikation von zirkulierenden Tumorzellen und Mikrometastasen bei Leukämien, Lymphomen, Melanomen, Neuroblastomen und verschiedensten Karzinomen entwickelt [11], [12], [85], [40], [76], [21]. Auf die Problematik, die sich beim molekularbiologischen Nachweis disseminierter Tumorzellen ergibt, wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit noch ausführlich eingegangen werden.

Ziel des Forschungsgebietes der minimalen Resterkrankung war und ist es, mit derzeit zum Teil noch nicht routinemäßig in der Klinik eingesetzten Methoden, den Nachweis residualer Tumorzellen zu erbringen und eine eventuelle Korrelation mit der Prognose zu zeigen. Dies könnte möglicherweise eine effektivere und individuell besser angepasste Therapieüberwachung und -stratifizierung bei Patienten mit malignen Tumorerkrankungen ermöglichen.

Grundsätzlich bietet es sich an, bei den Nachweisverfahren für minimale Resterkrankung, die hämatologischen Neoplasien und die soliden Tumoren einzeln zu betrachten, da bei beiden unterschiedliche Bedingungen für die Detektion von residualen Tumorzellen vorzufinden sind; darum sollen diese im Folgenden getrennt dargestellt werden.

1.2 Minimale Resterkrankung bei hämatologischen Neoplasien

Hämatologische Neoplasien, wie die akuten und chronischen Leukämien, die niedrig- und hochmalignen Lymphome sowie das Multiple Myelom, sind durch ihre klonale Natur gekennzeichnet. Das bedeutet, dass sich ein Zellklon im Laufe der Reifung der weißen Blutzellen nicht weiter differenziert und maligne entartet. Am Beispiel einer myeloischen Leukämie kommt es zu einem Stehenbleiben eines Klons auf einer Reifestufe der Granulopoese und zu einem Anstieg der myeloischen Zellzahl im Knochenmark durch seine klonale Vermehrung. Im Verlauf der Erkrankung führt dies zu einer hämatopoetischen Insuffizienz mit oder ohne Leukozytose [80].

Bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien in klinischer Remission wird die Diagnose der minimalen Resterkrankung dann gestellt, wenn residuale Leukämiezellen nicht mehr als 5% der Knochenmarkszellen ausmachen [28]. Man geht davon aus, dass eine minimale Resterkrankung eine häufige Ursache für Rezidive bei diesen Patienten darstellt. Folglich sind follow-up Untersuchungen nach einer Chemotherapie und/oder Knochenmarktransplantation von großer Bedeutung. Zur Behandlungsbeurteilung und -optimierung ist es demnach von Vorteil, diejenigen Patienten möglichst frühzeitig herauszufiltern, die ein höheres Risiko für ein Rezidiv innehaben [28].

Wegen der geringen Zellzahl residueller Tumorzellen benötigt man zu ihrer Detektion spezifische Techniken mit möglichst hoher Sensitivität. Die Grundzüge der Diagnostik der MRD wurden an hämatologischen Erkrankungen erarbeitet, weshalb an dieser Stelle genauer darauf eingegangen werden soll.

Konventionelle morphologische Verfahren und die Analyse von immunologischen Markern können neoplastische Zellen identifizieren, die 1-5% der Zellpopulation ausmachen. Darüber hinaus bietet das Southern Blot-Verfahren, das durch Hybridisierung mit einer spezifischen Gensonde genetische Aberrationen nachweist, eine bessere Spezifität als die konventionellen Verfahren und erreicht eine Sensitivität von bis zu 1%. Mittels dieser Technik konnte erstmals das Vorhandensein von MRD in der Vollremission anhand von tumorspezifischen, genetischen Rearrangements bei lymphoproliferativen Erkrankungen nachgewiesen werden [125], [126], [28].

Für residuale Tumorzellen, die weniger als 1% der Zellpopulation ausmachen, benötigt man jedoch weitaus sensitivere Verfahren. So konnte für die Fluoreszenzmikroskopie und die Durchflusszytometrie zur Analyse von immunologischen Markern zwar eine Sensitivität zur Detek-

tion residualer Tumorzellen von bis zu 10^{-4} gezeigt werden, dennoch erwiesen sich diese morphologischen und immunologischen Techniken aufgrund mangelnder Spezifität durch falsch-positive Ergebnisse als unzureichend [41], [28].

PCR - Polymerase Kettenreaktion

Erst die Entwicklung der Polymerase Kettenreaktion ermöglichte eine hoch sensitive und spezifische Detektion von minimaler Resterkrankung im Bereich hämatologischer Neoplasien, deren Grundlage auf der Tatsache beruht, dass bei 70-80% der Patienten mit hämatologischen Neoplasien chromosomale Aberrationen gefunden werden können [50]. Der Nachweis dieser spezifischen Nukleinsäureveränderungen mittels PCR macht molekulare Analysen von DNS möglich, erreicht Sensitivitäten von 10^{-4} bis 10^{-6} durch enzymatische Vervielfältigung (Amplifizierung) von DNS-Sequenzen in vitro und ist zusätzlich noch weitaus weniger arbeitsaufwendig als das Southern Blot-Verfahren.

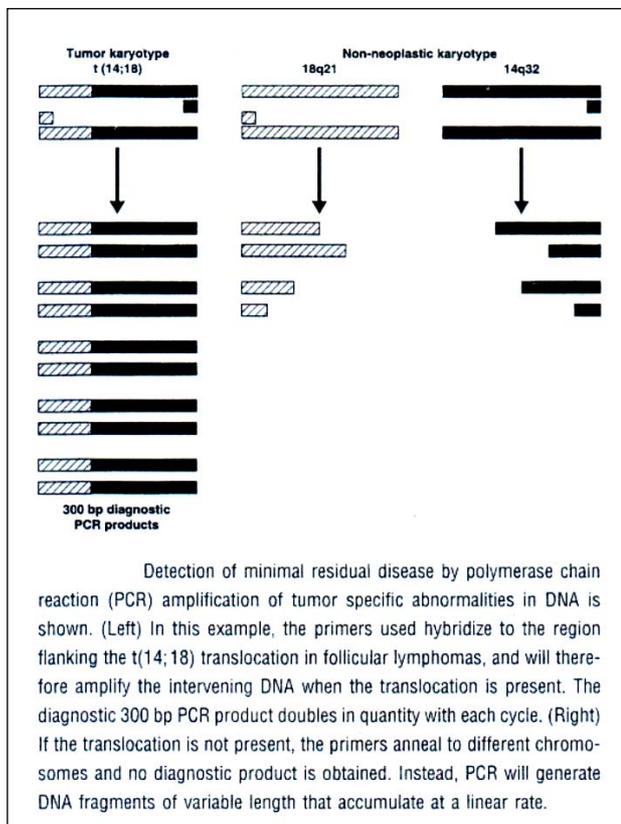
Die Spezifität der PCR basiert auf dem Einsatz von zwei Oligonukleotiden, so genannte Primer, die zu den Enden der zu vermehrenden Zielsequenz auf der Ursprungs-DNS komplementär sind. In einem Vermehrungszyklus werden die beiden Stränge der zu amplifizierenden DNS zunächst durch Erhitzen getrennt (Denaturierung), so dass die Primer an beide DNS-Stränge binden können (Annealing). Jeder der DNS-Einzelstränge wird dann mit Hilfe einer hitzestabilen DNS-Polymerase, beginnend am Primer, kopiert (Extension). Der Vermehrungszyklus kann mehrfach wiederholt werden. Primer-DNS und die für die Synthese der neuen DNS-Stränge notwendigen Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP) werden zu Beginn der Reaktion im Überschuss zugegeben. Da in jedem Reaktionszyklus beide Stränge eines DNS-Moleküls als Matrize genutzt werden, nimmt die Zahl der DNS-Moleküle im Gesamtverlauf einer PCR exponentiell zu. So vermehrt sich das gewünschte DNS-Fragment bei zum Beispiel 30 Zyklen um den Faktor 10^9 . Die PCR Produkte können dann mittels Gel-Elektrophorese der Größe nach aufgetrennt und die Zielsequenz anhand ihrer Größe oder im Southern Blot-Verfahren identifiziert werden.

Die Detektion von MRD kann also durch PCR Amplifikation realisiert werden und zwar durch den Nachweis tumorspezifischer Veränderungen der DNS in den Tumorzellen. Dieser Ansatz wurde als erstes für die Detektion von MRD mittels der t(14;18) Translokation verwirklicht, die in der überwiegenden Zahl der Fälle bei folliculären Lymphomen zu finden ist [76]. Diese Translokation bezieht die Immunglobulin-Schwere-Ketten-Region auf Chromosom 14 und die bcl-2 Region auf Chromosom 18 mit ein. Die verwendeten Primer hybridisieren genau mit den Regionen, die diese Translokation flankieren (Annealing). Zu einer Extension kommt es dar-

aufhin nur, wenn die Translokation auch tatsächlich vorhanden ist. Ist die genetische Aberration im untersuchten Material nicht existent, lagern sich die Primer an unterschiedlichen Chromosomen an und die PCR produziert kein nachweisbares Amplikon. Dieses Prinzip wird in Abbildung 1 nochmal graphisch veranschaulicht dargestellt [41].

Durch die Verwendung der hoch spezifischen und sensitiven PCR ist man also in der Lage eine verschwindend geringe Menge an Lymphomzellen zu detektieren. Voraussetzung für diesen molekulargenetischen Nachweis von MRD ist selbstverständlich eine vorhandene Translokation t(14;18) in den gesuchten residualen Tumorzellen [76].

Abbildung 1:



aus [41]: **Ghossein R und Rosai J.** Polymerase Chain Reaction in the Detection of Micrometastases and Circulating Tumor Cells. *Cancer* 1996;78,(1):11.

rt-PCR – Reverse Transkriptase - PCR

Mittels PCR lässt sich nicht nur zelluläre DNS amplifizieren. Ein vorgeschalteter, enzymatischer Umwandlungsschritt von RNS zu komplementärer DNS (cDNS) durch ein retrovirales Enzym, die Reverse Transkriptase (rt), erlaubt den Nachweis von transkribierten Genen, also von Genaktivität auf Ebene der mRNS.

Die Amplifikation von tumorspezifischer mRNA durch eine rt-PCR wurde als erstes zur Detektion der t(9;22) Translokation, dem für die chronisch myeloische Leukämie (CML) pathognomonischen Philadelphia-Chromosom, eingesetzt [66]. Diese Translokation besteht aus der Verschiebung des größten Anteils des c-abl Protoonkogens auf Chromosom 9 auf die Breakpoint Cluster Region (bcr) auf Chromosom 22. Diese so genannte bcr-abl Translokation kann sich aus sehr großen DNS Bruchfragmenten zusammensetzen. Aufgrund einer sehr langen Zielsequenz kann es jedoch in einer PCR zu Kettenabbrüchen während des Amplifikationsprozesses kommen und somit zu falsch-negativen Ergebnissen. Darum bietet sich hier die Verwendung der von der kürzeren mRNA ausgehenden rt-PCR an. Bei der mRNA sind die zwischen den codierenden Sequenzen liegenden Introns im Vorgang der Transkription durch das so genannte Splicing entfernt worden und die Zielsequenz mRNA, im Falle der CML die bcr-abl Translokation, ist erheblich kürzer. Demzufolge lässt sich diese Translokation zuverlässiger in einer rt-PCR amplifizieren.

Es konnte gezeigt werden, dass die bcr-abl mRNA noch einige Monate nach einer allogenen Knochenmarktransplantation bei Patienten in klinischer Remission nachgewiesen werden kann und eine Persistenz dieser Positivität für mehr als 6 Monate mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für ein Rezidiv einhergeht [113]. Außerdem zeigen einige Patienten, die nach hämatologischen oder zytogenetischen Kriterien rezidivieren, wenige Monate vor dem Rezidiv ein erneutes Auftreten des bcr-abl Transkriptes [20].

Weitere Beispiele für spezifische chromosomale Marker zum MRD-Nachweis sind die bcl-1-Translokation des Mantelzellymphoms, das Schwerekettenrearrangement der B-Zell-Neoplasien und das PML-RAR α (Retinoic-Acid Receptor α) Fusionsgen bei der akuten Promyelozyten Leukämie (PML). Bei letzterer konnte nach vollendeter Therapie eine starke Assoziation mit einer Langzeit-Remission bei Verschwinden dieses Signals in der rt-PCR festgestellt werden [65], [113].

Zum Nachweis der MRD bei hämatologischen Malignomen wurde eine Reihe von weiteren genetischen Aberrationen identifiziert, deren Nachweis auch zum Teil schon fester Bestandteil der Routinediagnostik und Therapiestatifizierung geworden ist.

1.3 MRD bei soliden epithelialen Tumoren

Wie einleitend schon erwähnt, liegen für eine minimale Resterkrankung bei soliden epithelialen Tumoren andere Bedingungen vor, als bei hämatologischen Neoplasien. Zum einen fehlen hier

spezifische, konstant auftretende genetische Aberrationen, die sich als Marker zur Detektion von disseminierten Tumorzellen eignen würden. Zum anderen kann es bei epithelialen Tumoren zu einer zum Teil frühzeitigen Disseminierung von Karzinomzellen in Sekundärorgane, wie Blut, Knochenmark oder lymphatisches Gewebe kommen. Das bedeutet, dass sich disseminierte Tumorzellen solider Tumoren im Gegensatz zur MRD bei hämatologischen Neoplasien nicht im angestammten Kompartiment befinden, sondern als ortsfremde Zellen in Sekundärorganen anderen Bedingungen ausgesetzt sind.

Der Ansatz zur spezifischen Detektion von MRD bei epithelialen Tumoren beruht auf der Grundlage, dass Tumorzellen epithelialer Herkunft in Gewebe mesenchymalen Ursprungs disseminieren. Dabei versucht man sich die Annahme zu Nutzen zu machen, dass Karzinomzellen aufgrund ihrer Herkunft weiterhin epitheliale Marker exprimieren, die in lymphatischen und hämatopoetischen Zellen mesenchymaler Herkunft nicht exprimiert werden. Disseminierte epitheliale Tumorzellen, die weiterhin gewebespezifische Proteine exprimieren, können anhand spezifischer, epithelialer Zellmerkmale in nicht-epithelialen Sekundärorganen detektiert werden. Als Beispiel für Marker epithelialer Tumoren seien hier die Zytokeratine, die epithelialen Muzine und das epitheliale Membranantigen (EMA) genannt.

Vorraussetzung für einen klassischen Tumormarker ist, dass er nur dann als spezifisch deklariert werden kann, wenn er allein in den für ihn charakteristischen Tumorzellen exprimiert wird. Er muss sowohl im soliden Tumor, als auch nach der Tumorzelldisseminierung im peripheren Blut, lymphatischen Gewebe oder Knochenmark nachgewiesen werden können [78].

Genau hier liegt das Problem für Tumormarker im Bereich der epithelialen Neoplasien. Man muss auf die Expression epithelspezifischer Marker ausweichen, die zwar als gewebespezifisch angesehen werden, jedoch nicht tumorspezifisch sind. Darüber hinaus gestaltet sich der Nachweis aufgrund der zum Teil verschwindend geringen Anzahl disseminierter Tumorzellen, der häufig mangelhaften Spezifität so genannter Gewebemarker und einer eventuellen im Verlauf des Tumorwachstums veränderten Expression bestimmter Marker, als schwierig [56].

2.0 Detektion disseminierter Tumorzellen bei epithelialen Tumoren

Epitheliale Tumoren sind trotz großer Fortschritte in der Früherkennung und chirurgischen Therapie immer noch mit einer hohen Mortalitätsrate behaftet. Die häufigste Todesursache ist das metastatische Tumorrezidiv. Diese Tatsache führt man auf die frühe okkulte Tumordisseminierung zurück [127], [99], [87]. Bis heute entgeht dem konventionellen Tumorstaging meist die

Detektion von Mikrometastasen. So wusste man schon frühzeitig, dass obwohl sich bei 50 - 90% der Patientinnen mit einem Mammakarzinom zum Zeitpunkt der primären, chirurgischen Behandlung anhand konventioneller Staging Methoden keine Hinweise für eine metastatische Erkrankung nachweisen lassen, es dennoch innerhalb der folgenden 5 Jahre bei über 30% dieser Patientinnen zu einem Tumorrezidiv kommen kann [104], [21]. Das bedeutet, dass eine für die Prognose wichtige Determinante bei Patienten mit kurativ resektablem, solidem Tumor der Diagnostik entgeht. Demnach gilt auch für die epithelialen Tumoren, dass eine bessere Überwachung des individuellen Krankheitsverlaufs auf der Ebene einzelner Tumorzellen die diagnostische Präzision des jeweiligen Tumorstagings steigern würde.

Die prognostische Bedeutung disseminierter Tumorzellen führte zu dem Vorschlag der UICC das Stadium der MRD in die TNM-Klassifikation mit der Bezeichnung M_1 aufzunehmen. Das Stadium der MRD (M_1) ist hierbei definiert als das Vorhandensein disseminierter Tumorzellen in Sekundärorganen [53], [54]. Pantel und Kollegen schlugen die Bezeichnung M_i vor, um beim Tumorstaging eine präzisere Abgrenzung disseminierter Tumorzellen von soliden Metastasen zu ermöglichen [99].

Im Folgenden werden beispielhaft Studien aus der publizierten Literatur vorgestellt, um die methodologische Entwicklung der Detektion von MRD bei epithelialen Tumoren und deren prognostische Relevanz darzustellen. Dabei liegt der Hauptfokus auf Untersuchungen für das Mammakarzinom, da hieran ein großer Teil der Grundzüge in der Detektion disseminierter Tumorzellen epithelialer Tumoren erarbeitet worden ist.

2.1 Zytologischer und histopathologischer Nachweis einer MRD

Die anfängliche Identifizierung von disseminierten Tumorzellen in zytologischen Präparationen von Lymphknotengewebe, Blut oder Knochenmark auf der Basis von zytomorphologischen Kriterien gestaltete sich schwierig. Eine sehr frühe Untersuchung an Blutproben von Patienten mit soliden Tumoren gab für die lichtmikroskopische Detektion disseminierter Tumorzellen nach morphologischen Kriterien eine Sensitivität von circa 1% an [16].

Molino et al. fanden ebenfalls lichtmikroskopisch, anhand konventioneller morphologischer Kriterien, 0,5-10% der Mammakarzinomzellen einer Zelllinie in experimentell kontaminiertem Knochenmark [86].

Mittels konventioneller histopathologischer Techniken zur Detektion von Mikrometastasen im Knochenmark bei Mammakarzinompatientinnen konnten Schlimok et al. zum Zeitpunkt der

primären Diagnosestellung eine Detektionswahrscheinlichkeit einzelner Tumorzellen im Knochenmark von 4% feststellen [111].

Die niedrigen Sensitivitäten dieser Untersuchungen sind auf die geringe Anzahl disseminierter Tumorzellen in den zellreichen mesenchymalen Geweben und auf die häufig schwierige morphologische Diskriminierung der epithelialen Tumorzellen von ortständigen Zellen zurückzuführen.

Unter Verwendung der Seriensektion von Lymphknotengewebe konnte die International Ludwig Breast Cancer Study Group in ihrer 1990 veröffentlichten Studie eine höhere Detektionswahrscheinlichkeit für Mikrometastasen nachweisen. Man untersuchte ipsilaterale Lymphknoten von 921 Mammakarzinompatientinnen, die durch die histologische Routineuntersuchung der Lymphknoten als frei von Metastasen diagnostiziert worden waren. In dieser Untersuchung wurden in 83 (9%) von 921 Fällen falsch-negative Ergebnisse durch eine Seriensektion der Lymphknoten aufgedeckt. Nach einer follow-up Untersuchung von durchschnittlich 5 Jahren, zeigten diese, positiv auf Mikrometastasen getesteten Patientinnen, ein schlechteres krankheitsfreies ($p=0,003$) und Gesamtüberleben ($p=0,002$). Respektiv konnte zusätzlich gezeigt werden, dass der immunzytochemische Nachweis von Mikrometastasen über das epitheliale Membran Antigen (EMA) in den untersuchten Lymphknoten mit der Tumorgroße ($p=0,02$) und dem Vorhandensein von vaskulärer Invasion ($p<0,0001$) korrelierte [61].

Jedoch stellt auch die Seriensektion von Lymphknoten eine Methode mit noch zu geringer Sensitivität dar, um eine minimale Resterkrankung zuverlässig nachweisen zu können. Darüber hinaus ist es ein sehr arbeits- und zeitaufwendiges Verfahren, so dass die MRD-Diagnostik im Bereich solider Tumoren erst einen wegweisenden Durchbruch mit zunehmender Verbreitung immunhistochemischer Färbemethoden erlebte.

2.2 Immunzytochemischer Nachweis einer MRD

Die Immunzytochemie basiert auf der Erkennung spezifischer Antigene mittels monoklonaler Antikörper und der nachfolgenden Anfärbung dieser Strukturen durch enzymatische Färbereaktionen. Ermöglicht wurde dies durch die Entwicklung der Hybridomtechnik von Köhler und Milstein, die eine Herstellung großer Mengen monoklonaler Antikörper gegen spezifische Antigene erlaubte [69]. Die Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen epithelial differenzierte Proteine führte zu zahlreichen Untersuchungen von lymphatischen und hämatopoetischen Mate-

rialien von Patienten mit epithelialen Tumoren im Hinblick auf eine mögliche Tumorzell dissemination. Die Immunzytochemie brachte eine bedeutende Verbesserung der Spezifität und auch Sensitivität in der Detektion disseminierter Karzinomzellen und ermöglichte somit, genauere Erkenntnisse über eine prognostische Bedeutung derselben zu gewinnen. Bis heute stellt sie das Standardverfahren zur Detektion von MRD bei soliden Tumoren dar [113], [99].

Trojani und Kollegen waren die ersten, die aufgrund ihrer 1987 veröffentlichten Untersuchungen die Immunhistochemie als Standardverfahren zur Detektion okkulten Metastasen in Lymphknotengewebe von Mammakarzinompatientinnen empfohlen hatten. Es wurden 150 Patientinnen in die Studie aufgenommen, die nach erfolgter primärer Therapie als N_0, M_0 klassifiziert worden waren. Zur immunhistochemischen Untersuchung auf disseminierte Tumorzellen wurde ein „Cocktail“ aus fünf monoklonalen Antikörpern verwendet. Die Antikörper waren gegen epitheliale Antigene gerichtet. Sie bestanden aus dem Anti-EMA-Antikörper gegen das epitheliale Membranantigen, dem HMFG-1-, -2- und AUA-1 -Antikörper gegen das epitheliale Muzin und dem gegen Zytokeratine gerichteten Antikörper KL-1. In 14% der Fälle (21 von 150) konnte immunhistochemisch eine Mikrometastasierung gefunden werden. In einer follow-up Untersuchung von durchschnittlich 10 Jahren war in den Fällen mit invasiv duktalem Mammakarzinom (IDC) eine signifikante Assoziation zwischen dem Auffinden von Mikrometastasen und einer häufigeren Rezidivierung der Erkrankung, als auch einer verkürzten Überlebenszeit gefunden worden. Der signifikanteste Faktor in der Multivarianzanalyse (Cox Model) war sowohl für das Überleben als auch die Rezidivhäufigkeit, die Anwesenheit von Mikrometastasen ($p=0,01$ und $p=0,001$, respektiv). Zusätzlich stellte sich im Nachhinein heraus, dass die Ergebnisse sich nicht veränderten, wenn man die verschiedenen Antikörper einzeln oder alle fünf im „Cocktail“ verwendete. In der Gruppe der Patientinnen mit invasiv lobulärem Mammakarzinom konnte keine Assoziation zwischen einer Mikrometastasierung und dem weiteren Verlauf der Erkrankung gefunden werden [123], [124].

De Mascarel und Kollegen, aus derselben Arbeitsgruppe, veröffentlichten einige Jahre später eine Folgestudie, in der sie die Immunhistochemie mit einer makroskopischen Seriensektion (mSS) zur Detektion von Mikrometastasen in Lymphknotengewebe von Mammakarzinompatientinnen verglichen. Sie konnten wiederum mittels immunhistochemischer Untersuchung, mit dem schon vorher verwendeten Antikörpercocktail eine Mikrometastasierung nachweisen. Unter den Patientinnen mit invasiv duktalem Mammakarzinom konnte in 10% (13 von 129) der Fälle, die über konventionelle histopathologische Methoden als N_0, M_0 diagnostiziert worden waren, immunhistochemisch eine Mikrometastasierung nachgewiesen werden. In der follow-up Untersuchung von im Durchschnitt 15,6 Jahren wurde ein signifikanter Anstieg der Rezidivhäu-

figkeit ($p=0,01$) bei denjenigen Patientinnen festgestellt, denen immunhistochemisch eine Mikrometastasierung im Lymphknotengewebe nachgewiesen werden konnte. Jedoch zeigte sich in dieser Untersuchung keine signifikante Korrelation mit der Überlebenszeit ($p=0,07$). Wiederum waren für die Patientinnen mit invasiv lobulärem Karzinom immunhistochemisch detektierte Mikrometastasen ohne prognostisch signifikante Bedeutung. Im Vergleich hierzu wurde das Lymphknotengewebe von 1680 Patientinnen mit primär operablem Mammakarzinom mittels makroskopischer Seriensektion (mSS) untersucht. Bei 120 (7%) Patientinnen konnte eine Mikrometastasierung nachgewiesen werden. In dem daraufhin folgenden follow-up von durchschnittlich 7 Jahren hinsichtlich des Krankheitsverlaufs konnte ein signifikanter Unterschied in der Rezidivhäufigkeit ($p=0,005$) und dem Gesamtüberleben ($p=0,0369$) festgestellt werden. Für diesen Teil der Untersuchung trennten die Autoren ihre Ergebnisse nicht nach den unterschiedlichen histologischen Typen des Mammakarzinoms. Es bleibt jedoch zu bemerken, dass es sich in über 80 Prozent der untersuchten Fälle um ein invasiv duktales Mammakarzinom (IDC) handelte [23].

Redding et al. fanden heraus, dass 57% der Mammakarzinompatientinnen ihr erstes Rezidiv in Form von Knochenmetastasen entwickeln. Dementsprechend war die Fragestellung dieser Studie, ob schon zum Zeitpunkt der primären Diagnosestellung Mammakarzinomzellen im Knochenmark zu finden seien. Mit einem polyklonalen Antikörper gegen EMA wurden Knochenmarkproben von 110 Patientinnen, die an einem primären Mammakarzinom erkrankt waren, untersucht. Zum Zeitpunkt der Knochenmarkgewinnung bestanden keine Hinweise auf eine vorhandene Metastasierung. Bei 31 von 110 Patientinnen (28%) konnten Tumorzellen im Knochenmark detektiert werden. In einer gleichzeitig untersuchten Kontrollgruppe kam es in keinem Fall zu einem positiven Nachweis. 5 von 6 Patientinnen (83%) mit nach konventionellen Kriterien schlechter Prognose zeigten eine Mikrometastasierung, wobei nur 3 von 28 (11%) der Patientinnen mit guter Prognose eine Mikrometastasierung zeigten. Jedoch wiesen die Autoren darauf hin, dass es einer follow-up Untersuchung bedürfe, um feststellen zu können, ob Patienten mit einer Mikrometastasierung im Knochenmark frühzeitig ein Rezidiv erleiden würden. Dass es sich bei den detektierten Zellen im Knochenmark tatsächlich um Mammakarzinomzellen handelte, hielten die Autoren für sehr wahrscheinlich, auch wenn der Anti-EMA-Antikörper nicht als allein spezifisch für Mammakarzinomzellen gilt, denn erstens hatten die EMA-positiven Zellen die morphologischen und zytologischen Charakteristika von Karzinomzellen und zweitens konnten EMA-positive Zellen nicht im Knochenmark von gesunden Spendern oder Patienten mit benigner Erkrankung der Brustdrüse nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte man diese Zellen ebenfalls im Knochenmark von Patienten mit lokalen Rezidiven oder nicht-skeletalen Metastasen eines Mammakarzinoms detektieren [104].

Auch Diel et al. untersuchten Knochenmarkaspirate von 260 Patientinnen mit einem Mammakarzinom ohne Fernmetastasen zum Zeitpunkt der Primäroperation immunzytochemisch auf disseminierte Tumorzellen. Als Antikörper wurde TAG-12 verwendet. TAG-12 erkennt das so genannte „tumor-associated glycoprotein“, ein polymorphes epitheliales Muzin, das von Mammakarzinomzellen exprimiert wird. Die Positivitätsrate für eine immunzytochemisch detektierte Mikrometastasierung in das Knochenmark betrug 44%. Signifikante Korrelationen fanden sich zwischen Tumorzelldetektion und Tumorstadium ($p < 0,0001$), Nodalstatus ($p < 0,0001$) und Grading ($p < 0,002$), allesamt Faktoren, die nach dem konventionellen Staging prognostisch als ungünstig gewertet werden. In der Regressionsanalyse nach Cox konnte gezeigt werden, dass die Tumorzelldetektion einen unabhängigen prädiktiven Marker für das Risiko der Entwicklung von Fernmetastasen ($p < 0,0005$) darstelle [25].

Daten über den immunzytochemischen Nachweis okkultur Tumorzellen im Knochenmark von insgesamt 2494 Patienten und Patientinnen mit verschiedensten epithelialen Tumorerkrankungen wurden von Funke und Schraut in einer Metaanalyse von insgesamt 20 Studien präsentiert. Die zugrunde liegenden Untersuchungen wurden in den Jahren 1980 bis 1997 durchgeführt und waren neben Untersuchungen von Mammakarzinompatientinnen auch Untersuchungen an Patienten mit Karzinomen des Magen-Darm-Traktes und der Lunge. Tumorzellen im Knochenmark konnten bei allen Tumorerkrankungen mit einer medianen Prävalenz okkultur Tumorzellen von 35% nachgewiesen werden. Die verwendeten Antikörper zur Tumorzelldetektion waren bei den Studien mit Mammakarzinompatientinnen gegen das epitheliale Membranantigen (EMA), gegen Zytokeratinkomponenten sowie gegen das polymorphe epitheliale Muzin (PEM) gerichtet. Zum immunzytochemischen Nachweis okkultur Tumorzellen von Karzinomen der Lunge, des Magen-Darm-Traktes sowie bei Pancreas- und Ösophaguskarzinomen waren die Antikörper ebenfalls gegen Zytokeratinkomponenten gerichtet.

Der Nachweis von Tumorzellen war in 14 der 20 Studien mit einem reduzierten krankheitsfreien Überleben assoziiert. Jedoch stellte das Vorhandensein derartiger Zellen in nur 5 von 12 Untersuchungen einen unabhängigen prognostischen Faktor dar. Nur zwei Untersuchungen identifizierten die disseminierten Zellen in einer Multivarianzanalyse als unabhängigen Prädiktor für ein schlechteres Gesamtüberleben. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass die Existenz epithelialer Tumorzellen im Knochenmark als unabhängiger Prognosefaktor erst noch in großen standardisierten Multizenterstudien validiert werden müsse, bevor dieser Status offiziell in die bestehende TNM-Klassifikation eingegliedert werden könne. Aufgrund der voneinander abweichenden Methoden, Zellzahlen und Patientenkollektive der verschiedenen Untersuchungen, seien die bisher vorhandenen Daten nur schwer vergleichbar [37].

2.3. Molekulargenetischer Nachweis einer MRD

Die prognostische Bedeutung disseminierter Tumorzellen für den Verlauf einer karzinomatösen Erkrankung am Beispiel des Mammakarzinoms konnte anhand der Seriensektion [61], und mit gesteigerter Sensitivität auch mittels Immunzytochemie [123], [124], [23], [25], [37], nachgewiesen werden. Um aber mit größerer Sicherheit die Hochrisikogruppe von Patienten herauszufiltern, die aufgrund disseminierter Tumorzellen eine schlechtere Prognose für den weiteren Verlauf der Erkrankung haben, benötigte man eine Methode mit noch höherer Sensitivität. Ein zuverlässiges Verfahren, das in jedem Krankheitsstadium in der Lage ist eine Mikrometastasierung festzustellen, ob vor, während oder nach einer entsprechenden Therapie, wäre ein nützliches Werkzeug für die Überwachung und Diagnose karzinomatöser Erkrankungen.

Diese Methode fand man in der Anwendung der hoch sensitiven Reversen Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (rt-PCR). Der Grundgedanke ist die Detektion disseminierter Tumorzellen über eine Vervielfältigung gewebespezifischer mRNS, die nur in den Karzinomzellen exprimiert wird und nicht in den Geweben der Disseminierung, wie Knochenmark, Blut oder Lymphknotengewebe. Als gewebespezifische Marker für die Identifizierung von epithelialen Tumorzellen in Sekundärorganen verwendet man die mRNS von schon immunzytochemisch detektierten epithelspezifischen Proteinen. Die für Epithelien charakteristischen Proteine, wie Zytokeratine oder Muzine, werden in einer rt-PCR auf Transkriptionsebene nachgewiesen.

Noguchi et al. verglichen in einer 1994 veröffentlichten Untersuchung die rt-PCR von Muc1 mRNS mit der immunzytochemischen Detektion vom SM-3 Antigen. Es galt herauszufinden, welches die sensitivere Methode zur Identifizierung von Mikrometastasen in Lymphknotengewebe von Mammakarzinompatientinnen darstelle. Die Muc1 mRNS stellt das Transkriptionsprodukt für einen epithelialen Marker, das polymorphe epitheliale Muzin (PEM), dar, das auf Proteinebene immunzytochemisch unter anderem über einen SM-3 Antikörper detektiert werden kann. Es wurden 50 axilläre Lymphknoten von 15 Patientinnen mit einem Mammakarzinom sowohl mit der Muc1 rt-PCR als auch immunzytochemisch über den SM-3 Antikörper auf Mikrometastasen untersucht. In 9 Fällen (18%) konnte immunzytochemisch eine Mikrometastasierung gefunden werden. Eine Muc1 Transkription wurde in 6 weiteren Lymphknoten (30%) sowie in der Mammakarzinom Zelllinie MCF-7 nachgewiesen. In den Lymphknoten einer Kontrollgruppe mit benignen Erkrankungen der Brustdrüse konnte in keinem Fall eine Muc1 Expression oder Transkription nachgewiesen werden. Eine Reihenverdünnung von MCF-7 Zellen in Lymphknotenzellen bestätigte die hohe Sensitivität der Muc1 rt-PCR. Die Detektionsgrenze lag bei einer MCF-7 Zelle in 10^6 Lymphknotenzellen. Die Autoren schluss-

folgerten aus ihren Ergebnissen, dass die Muc1 rt-PCR zur Detektion von Mikrometastasen in axillären Lymphknoten die sensitivere Methode darstelle. Sie sei zur Identifizierung von Patientinnen mit erhöhtem Risiko für ein Rezidiv geeignet, die histologisch keine Anzeichen für eine Disseminierung zeigen würden. Die prognostische Relevanz der mittels rt-PCR diagnostizierten Mikrometastasierung wurde hier allerdings von immunzytochemisch gewonnenen Ergebnissen abgeleitet und ist nicht in einer Langzeitstudie bewiesen worden [94].

Im gleichen Jahr wurden von Datta et al. eine gewebespezifische Zytokeratin-19 (CK-19) nested-rt-PCR etabliert. Das nested-PCR-Verfahren arbeitet mit drei oder vier Primern in zwei aufeinander folgenden Schritten und bringt eine weitere Steigerung der Sensitivität mit sich. Ziel der Untersuchung war es, eine Methode mit hoher Sensitivität zur Detektion disseminierter Tumorzellen in peripherem Blut und Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen zu entwickeln. In einer Reihenverdünnung detektierte die CK-19 rt-PCR zuverlässig 10 Mammakarzinomzellen in 10^6 peripheren mononukleären Blutzellen (PBMN). Fazit dieser Studie war, dass man mit der CK-19 rt-PCR eine sensitive, spezifische und weniger arbeitsaufwendige Methode zur Detektion okkulten Mammakarzinomzellen in peripherem Blut und Knochenmark von Mammakarzinompatientinnen gefunden hatte [21].

Krüger und Krzizanowski et al. konnten die Ergebnisse von Datta et al. mit einer anderen Primervwahl, jedoch ebenfalls im nested-Modell und mit höherer Sensitivität, bestätigen. Die CK-19 rt-PCR dieser Arbeitsgruppe detektierte eine Mammakarzinomzelle in bis zu 10^6 hämatopoetischen Zellen [72].

Auch Schoenfeld et al. etablierten eine CK-19 rt-PCR zum Nachweis einer Mikrometastasierung in axillären Lymphknoten von Mammakarzinompatientinnen. Unter 39 histologisch als frei von Tumorzellen diagnostizierten Lymphknoten wurde mittels CK-19 rt-PCR in 4 Fällen (10%) über die visuelle Darstellung der PCR-Produkte mit Ethidium-Bromid Färbung eine CK19 Transkription nachgewiesen. Über die Darstellung der PCR-Produkte durch eine Southern Blot-Hybridisierung konnte die Identifizierung einer Mikrometastasierung in 10 weiteren Fällen (36%) realisiert werden. Der Versuch, die Sensitivität der PCR im nested-Verfahren noch weiter zu erhöhen, führte zu einem positiven Nachweis der CK-19 mRNA in Lymphknotengewebe von gesunden Probanden. Diese „falsch-positiven“ Ergebnisse ließen sich mit einer Beschränkung der nested-PCR auf weniger als 40 Amplifizierungszyklen vermeiden. Das Fazit der Autoren war, dass die CK-19 rt-PCR die Detektion von Mikrometastasen in axillären Lymphknoten von Mammakarzinompatientinnen mit gesteigerter Sensitivität ermöglichte und wahrscheinlich auch für andere epitheliale Malignome verwendbar sei [112].

Berois et al. verglichen die Muc1, CK-19 und CEA rt-PCR im Hinblick auf Sensitivität und Spezifität. Alle 3 PCR Assays wurden zur Detektion von disseminierten Tumorzellen in peripherem Blut und Knochenmark bei Mammakarzinompatientinnen entwickelt.

Man verwendete die schon etablierten Verfahren von Noguchi et al. für die Muc1 rt-PCR [94], die nested-CK-19 rt-PCR von Datta et al. [21] und eine nested-rt-PCR zum Nachweis von CEA (Carcinoembryogenes Antigen) mRNA, wie sie von Gerhard et al. beschrieben wurde [40]. Die beste Sensitivität zeigte die Muc1 rt-PCR, die in 4 von 5 Versuchen eine Mammakarzinomzelle (T47D-Zelllinie) unter 10^6 peripheren mononukleären Blutzellen (PBMN) detektieren konnte. Dieselbe Sensitivität ergab sich für die CK-19 rt-PCR, jedoch nur in 3 von 5 untersuchten Fällen. Die CEA rt-PCR zeigte in 2 von 5 Versuchen eine Sensitivität von bis zu einer Mammakarzinomzelle unter 5×10^5 PBMN. Die Spezifität testete man anhand von Blut- und Knochenmarkproben von 20 gesunden Spendern. Ein Muc1 Transkript ließ sich hier in 12 von 20 Fällen nachweisen.

Die Ergebnisse von Noguchi et al. hinsichtlich der Spezifität der Muc1 rt-PCR konnten somit nicht bestätigt werden. Hingegen führten die CK-19 und CEA rt-PCR in keinem Fall (0/20) der gesunden Spender zu einem positiven Ergebnis. Die Ergebnisse für CK-19 und CEA stimmten mit vorherigen Untersuchungen überein, bei denen auch keine Expression in Knochenmark oder peripheren Blutzellen von gesunden Spendern gefunden werden konnte [21], [92], [63].

Eine Untersuchung des Knochenmarkes von 42 Mammakarzinompatientinnen zeigte, dass ein positives Ergebnis in der CK-19 und CEA rt-PCR positiv mit einem positiven axillären Lymphknotenstatus (N_0 versus N_{1-3} , $p < 0,05$) korrelierte. Dabei waren beide Assays in der Lage einen mRNA Nachweis im Knochenmark bei 17% der Patientinnen festzustellen, die histologisch als N_0, M_0 klassifiziert worden waren.

Zusätzlich zeigten beide Verfahren für untersuchtes Knochenmark eine höhere Sensitivität in der Detektion von disseminierten Tumorzellen, als es bei peripherem Blut der Fall war. Die Autoren schlagen die CK-19 und CEA rt-PCR als gut anwendbare Methoden zur Detektion von disseminierten Mammakarzinomzellen vor. Valide Aussagen zur prognostischen Bedeutung einer auf diese Weise identifizierten Mikrometastasierung bedürften auch hier wieder einer Langzeit-follow-up Untersuchung [4].

Tabelle 1: Zusammenfassung Literatur; Nachweis von MRD beim Mammakarzinom

Studie	Methode	Anzahl Patienten	Probe	Tumor	Marker	Positivitätsrate	Korrelation	mittlere follow-up Zeit (Jahre)
Breast Cancer Study Group 1990 [61]	Serien-sektion	921	Lkn	MaCa	rein histo-morphologisch	9%	Gesamtüberleben kf Überleben respektiv (EMA): Tumorgroße vaskuläre Invasion	5
Trojani et al. 1987 [123], [124]	ICC	150	Lkn	MaCa	KL-1 EMA HMFG-1 HMFG-2 AUA-1	14%	Rezidiv Überleben	10
DeMasca-rel et al. 1992 [23]	ICC	129	Lkn	MaCa	KL-1 EMA HMFG-1 HMFG-2 AUA-1	10%	Rezidiv	15,6
DeMasca-rel et al. 1992 [23]	mSS	1680	Lkn	MaCa	histo-morpho-logsich	7%	Rezidiv Gesamtüberleben	7
Redding et al. 1983 [104]	ICC	110	KM	MaCa	EMA	28%	-	-
Diel et al. 1992 [25]	ICC	260	KM	MaCa	TAG-12	44%	Tumorstadium Nodalstatus Grading Fernmetastasen	-
Funke und Schraut 1998 [37]	ICC	2494 (insg. 20 Studien)	KM	MaCa LuCa CaMDT	TAG-12 EMA PEM CK	35%	14/20 kf Überleben 2/20 Gesamtüberleben	-
Noguchi et al. 1994 [94]	ICC	15	Lkn	MaCa	SM-3	18%	-	-
Noguchi et al. 1994 [94]	rt-PCR	15	Lkn	MaCa	Muc-1 mRNS	30%	-	-
Datta et al. 1994 [21]	rt-PCR (nested)	19 (pB) 8 (KM)	pB KM	MaCa	CK-19 mRNS	21% (pB) 75% (KM)	-	-
Krüger et al. 1996 [72]	rt-PCR (nested)	26 (pB) 24 (KM)	pB KM	MaCa	CK-19 mRNS	53% (pB) 58% (KM)	-	-
Schoenfeld et al. 1994 [112]	rt-PCR (nested)	18	Lkn	MaCa	CK-19 mRNS	10% + SB 36%	-	-
Berois et al. 2000 [4]	rt-PCR	42	KM (pB)	MaCa	CEA CK-19 mRNS	17%	Nodalstatus (CEA/CK-19)	-

Lkn – Lymphknoten, KM – Knochenmark, pB – peripheres Blut, MaCa – Mammakarzinom, LuCa – Lungenkarzinom, Ca-MDT – Karzinom Magen-Darm-Trakt, SB - Southern Blot-Verfahren, kf – krankheitsfrei; CK – Zytokeratin; ICC – Immunzytochemie

2.4 Sensitivität und Spezifität der epithelialen Marker

In der hier aufgeführten Literatur, die in Tabelle 1 noch mal zusammenfassend dargestellt ist, lässt sich eine Steigerung der Sensitivität in der Detektion disseminierter epithelialer Tumorzellen mit der Entwicklung neuer Methoden gut erkennen. Während die zytologische und histologische Aufdeckung von Mikrometastasen nur eine Sensitivität von 0.5% bis 10% erreichte [16], [111], [86], konnten nach dem Aufkommen der Immunzytochemie disseminierte Tumorzellen mit Sensitivitäten im Bereich von einer Karzinomzelle unter 1×10^4 bis zu 2×10^6 autochthonen Zellen [42], [37], [99], erkannt werden. Die Anwendung der rt-PCR für diese Zwecke führte schlussendlich zu einer Detektionsrate von einer Karzinomzelle in bis zu 10^5 bis 10^7 autochthonen Zellen [120], [40], [21], [72], [83], [94].

Die einigermaßen einheitlichen Angaben für die Sensitivitäten der jeweiligen Methoden können darauf zurückgeführt werden, dass sich für die Bestimmung derselben ein weitgehend standardisiertes Verfahren durchgesetzt hat. Die hier gefundenen Ergebnisse sind meist anhand von Zelllinien erarbeitet worden, die eine geringere Heterogenität als Tumorzellen in vivo aufweisen. Darum muss damit gerechnet werden, dass die Angaben für die Sensitivitäten der einzelnen Assays tatsächlich niedriger anzusiedeln sind.

Mit der Zunahme der Sensitivität im Laufe der Jahre wurden auch zunehmend Studien publiziert, die Einschränkungen in der Spezifität verschiedener epithelialer Marker zur Detektion disseminierter Tumorzellen offen legten. Die ursprünglich gewebespezifischen Marker, wie Zytokeratine oder Muzine, konnten durch die hohe Sensitivität der Immunzytochemie (ICC) und noch mehr der rt-PCR, nun zum Teil auch in kleinsten Mengen in nicht-epithelialen Zellen nachgewiesen werden. Den Nachweis von epithelspezifischen Markern in nicht-epithelialen Geweben bezeichnet man im Falle der ICC als „ektopy Expression“ und im Falle der rt-PCR als „illegitime Transkription“.

2.4.1 Muzine

Die epithelialen Muzine sind Proteine, die hochgradig glykosiliert sind und zur Lubrikation und Protektion von Epithelien exprimiert werden. Sie sind schon frühzeitig als epitheliale Marker in der Tumorzell Diagnostik, insbesondere für das Mammakarzinom, eingesetzt worden.

Für PEM bzw. Muc1 existieren in Bezug auf ihre Spezifität als epitheliale Marker stark divergierende Angaben. Unter Verwendung der Immunzytochemie oder der rt-PCR zeigten einige Studien keine Expression dieses Markers in mesenchymalen Geweben [94], [25]. Andere Auto-

ren wiesen eine Muc1 mRNA bzw. PEM Expression auch in mesenchymalen Zellen von gesunden Spendern sowie in hämatologischen Malignomen nach [138], [135], [6], [8], [24], [73]. Dabei konnte eine Muc1 Expression in gesunden mesenchymalen Zellen insbesondere in lymphoiden und frühen myeloischen Zellen, wie Erythroblasten und Normoblasten, gefunden werden [8], [25]. Daraus ergibt sich, dass die in der Vergangenheit durchgeführten Untersuchungen auf disseminierte Tumorzellen in mesenchymalen Geweben, die auch eine prognostische Relevanz der Tumorzell-detektion nachweisen konnten [61], [123], [23], [25], aufgrund von zu hohen Positivitätsraten durch „ektopy Expression“ oder „illegitime Transkription“ als eingeschränkt verwertbar gelten müssen.

2.4.2 Zytokeratine

Zytokeratine sind in allen epithelialen Zellen exprimierte Gerüstproteine, die am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt sind. Im Rahmen der Tumorzell-diagnostik konnte man eine ektopy Expression oder illegitime mRNA Transkription für die Zytokeratine zwar nicht grundsätzlich ausschließen, jedoch zeigten zahlreiche Untersuchungen ihre Überlegenheit in der Spezifität gegenüber PEM bzw. Muc1 [100], [4], [99]. Dementsprechend wurden die Zytokeratine auch verstärkt zur Detektion disseminierter Tumorzellen von Karzinomen eingesetzt. Unter anderen beschrieben Pantel et al. das Zytokeratin-18 (CK-18) als sehr spezifischen Marker zur immunzytochemischen Identifikation von disseminierten Karzinomzellen verschiedenster Karzinome, sowohl in Knochenmark und peripherem Blut als auch in Lymphknotengewebe [99]. Unter Verwendung der rt-PCR kam es jedoch auch für die CK-18 mRNA in Lymphknotengewebe, peripherem Blut und Knochenmark von gesunden Probanden zu einem positiven Nachweis [120], [137].

Das gleiche gilt für die häufig zur Detektion von disseminierten Mammakarzinomzellen verwendete CK-19 mRNA. Auch hier fand man über eine rt-PCR eine illegitime Transkription in peripheren mononukleären Blutzellen und Lymphknotengewebe von gesunden Probanden [6], [81]. Bei einer Studie von López-Guerrero et al. waren die Expressionslevel jedoch konstant sehr niedrig, so dass die Autoren die Idee äußerten, durch Verdünnung der zu untersuchenden Proben die falsch-positiven Ergebnisse umgehen zu können. Andere Arbeitsgruppen untersuchten das CK-19 ebenfalls auf illegitime Transkription mittels rt-PCR und konnten eine Spezifität für epitheliale Gewebe bestätigen [120], [72].

Eine tatsächlich illegitime Transkription und ektopy Expression eines epithelialen Markers würde denselbigen zur Detektion von MRD unbrauchbar machen, so dass die Bedeutung der richti-

gen Wahl eines spezifischen Antikörpers oder einer Ziel mRNA klar erkennbar ist. Das größte Hindernis in der Aufklärung der stark divergierenden Ergebnisse hinsichtlich der Spezifität in der Detektion von disseminierten Tumorzellen, stellt jedoch der mangelnde Standard im Studienaufbau und in der Anwendung der jeweiligen Methoden dar. Ein aussagekräftiger Vergleich der verschiedenen Untersuchungen und die Identifizierung eines spezifischen Markers werden durch diesen Zustand stark erschwert. Einen weiteren Erklärungsansatz für die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen kann man darüber hinaus auf unterschiedlichen Ebenen der Methodik finden. Die einzelnen Verfahren zur Detektion disseminierter Tumorzellen epithelialer Tumoren bergen jeweils bestimmte Vor- und Nachteile in sich, die zu bestimmten Abweichungen und Fehlerquellen in der Auswertung führen können, worauf im folgenden Kapitel eingegangen werden soll.

3.0. Methodische Aspekte

Eine große Anzahl unterschiedlicher Methoden zum Nachweis disseminierter Tumorzellen sind bekannt. Die schon erwähnte Immunzytochemie (ICC) und rt-PCR sollen im Folgenden mit ihren Charakteristika ausführlich dargestellt werden. Außerdem soll kurz auf das Zellkulturverfahren eingegangen werden. Dabei sei zu betonen, dass die Immunzytochemie immer noch die Standardmethode zur Detektion disseminierter Tumorzellen epithelialer Tumoren darstellt [111], [99], [63]. Auch die prognostische Bedeutung in Sekundärorganen disseminierter Tumorzellen ist hauptsächlich mittels immunzytochemisch detektierter Zellen nachgewiesen worden [123], [124], [23], [104], [25]. Die in den letzten Jahren zunehmend entwickelten molekulargenetischen Methoden mit besseren Sensitivitäten sind noch weitgehend experimenteller Natur. Ihre Einführung in die Routinediagnostik ist noch nicht verwirklicht worden.

3.1 Immunzytochemie / Immunhistologie

Der spezifische Nachweis epithelialer Strukturen auf Proteinebene erfolgt, wie schon erwähnt wurde, durch monoklonale Antikörper und eine nachgeschaltete, enzymatische Färbereaktion. Von der zu untersuchenden Zellprobe wird die mononukleäre Zellfraktion durch Ficoll Zentrifugation oder Erythrozytenlyse gewonnen¹. Anschließend zentrifugiert man üblicherweise 10^6 mononukleäre Zellen auf einen Objektträger und erhält die so genannten Zytospinpräparate. Nach erfolgter Fixierung des Präparates wird mit einem unmarkierten Primärantikörper für die

¹ genaueres Vorgehen siehe II. Material und Methoden

gesuchte antigenetische Struktur inkubiert. Bei dem daraufhin folgenden zweiten Schritt inkubiert man mit einem mit Alkalischer-Phosphatase- oder Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper. Es ist auch möglich in nur einem Schritt mit einem Enzym-konjugierten Primärantikörper zu inkubieren. In beiden Fällen folgt die abschließende Farbreaktion und die Zytospinpräparate können lichtmikroskopisch auf positive Farbreaktionen ausgewertet werden.

Da hämatopoetische Zellen selber eine endogene Peroxidase produzieren, kann die Auswertung der mittels Immunoperoxidase gefärbten Präparate erschwert sein. Es empfiehlt sich daher, für die Immunzytochemie an hämatopoetischen Präparaten, die über Alkalische-Phosphatase vermittelte Färbereaktion zu verwenden [99], [60].

Die Immunzytochemie ermöglicht es dem Untersucher, einige wenige Karzinomzellen vor dem Hintergrund von bis zu 10^6 Blut-, Knochenmark- oder lymphatischen Zellen zu detektieren und zu quantifizieren. Hierbei kann man sich durch die lichtmikroskopische Auswertung nicht nur anhand der positiven Färbereaktionen, sondern auch unter Berücksichtigung morphologischer Charakteristika orientieren. Das zusätzliche Kriterium der Morphologie für die Auswertung der untersuchten Proben ist von Vorteil, um falsch-positiv oder falsch-negativ angefärbte Zellen entdecken zu können. Die praktische Anwendung kann jedoch Schwierigkeiten mit sich bringen. So zeigen einzelne disseminierte Tumorzellen ein hohes Maß an Heterogenität. Durch die Materialgewinnung und -verarbeitung der Proben kann die Morphologie der Tumorzellen weiter verändert werden, so dass eine lichtmikroskopische Auswertung stark vom jeweiligen Untersucher abhängig wird [99].

Das Problem falsch-positiver Farbeergebnisse kommt zum einen bei mangelnder Gewebespezifität des Antikörpers durch Kreuzreaktivität zustande. Zum anderen können sich Makrophagen oder deren Vorläufer unter bestimmten Bedingungen unspezifisch anfärben oder sie enthalten Epitop-positives, phagozytiertes Material, welches sich ebenfalls anfärben kann [138].

Ein für ein bestimmtes Epitop spezifischer Antikörper soll möglichst alle in einer Probe vorhandenen Epitope erkennen. Dies wird als „relative Reaktivität“ eines Antikörpers bezeichnet und in Prozent angegeben [138]. Es gibt auch Epitop-negative Tumorzellen oder Zellen mit niedriger Epitopdichte. So kann es bei der Wahl eines ungeeigneten Antikörpers zu falsch-negativen Ergebnissen kommen. Auch die sich anschließende Farbreaktion darf keinen Störfaktoren ausgesetzt sein [99].

In Bezug auf die schon erwähnte Untersucherabhängigkeit dieser Methode gilt es zu bedenken, dass bei der verschwindend geringen Anzahl an disseminierten Karzinomzellen einzelne Tumorzellen leicht übersehen werden können. Darüber hinaus kann eine Beurteilung der Gewebeabstammung einzelner Zellen ohne den gewebespezifischen Hintergrund selbst für erfahrene Untersucher unmöglich sein. Im Vergleich zu anderen Methoden ist außerdem nur ein kleiner

Anteil an Probenmaterial der Untersuchung auf disseminierte Tumorzellen zugänglich [113], [86].

3.2 Zellkulturmethoden

Die meist begrenzte Menge an Untersuchungsmaterial und die fraglich darin enthaltene noch geringere Menge an Tumorzellen limitiert häufig die Detektion disseminierter Tumorzellen. Darum scheint die Überlegung sinnvoll, für Knochenmark-, Blut- oder Lymphknotenproben Kulturverfahren zu etablieren. Auf diesem Wege können eventuell in den Proben enthaltene maligne Zellen in Kulturen angereichert und mit größerer Sicherheit detektiert werden.

In der Kultur haben klonogene Tumorzellen einen Überlebensvorteil. Während sich die normalen hämatopoetischen Zellen weiter differenzieren und apoptotisch werden, vermehren sich die Tumorzellen. Sie besitzen ein größeres Ausmaß an Autonomie und sind gegenüber apoptotischen Mechanismen weniger sensibel.

Sharp et al. entwickelten ein Langzeitflüssigkulturassay. Die Proben werden hier über 6 Wochen in einem Flüssigmedium gehalten. Während der mehrwöchigen Kulturphase werden epitheliale oder lymphatische Tumorzellen angereichert, während die hämatopoetischen Zellen langsam ausdünnen. Dieses entspricht einem Anreicherungseffekt.

Das Kulturverfahren kann die Immunzytochemie ergänzen. Während der Kulturphase steigt sowohl die relative als auch die absolute Anzahl an Tumorzellen in der Probe, so dass nach erfolgter Anreicherung der Tumorzellen in Kultur eine größere Tumorzellmenge zum Nachweis zur Verfügung steht. Die Sensitivitätssteigerung beträgt beim Mammakarzinom etwa zwei log-Stufen [113].

Ross et al. entwickelten ein semisoliden Kultursystem über 14 Tage mit einem „soft Agar-based Medium“. Dieses leitet sich von den üblicherweise in der Hämatologie verwendeten Systemen zum Nachweis der Viabilität hämatopoetischer Zellen ab. Die epitheliale Natur der angezüchteten Tumorzellkolonien kann dann ebenfalls immunzytologisch bestätigt werden [107].

Vorteil der Zellkulturmethoden ist die Zellanreicherung und der damit erleichterte Nachweis klonogener vitaler Zellen. Jedoch kann es zum Auftreten von Karyotypveränderungen in vitro kommen, die sowohl zytogenetische und molekulargenetische Resultate verfälschen, als auch weitere Eigenschaften und Funktionen der Zellen verändern können, wie die Morphologie, den Immunphänotyp oder die Expression von Proteinen [60]. Weiterhin muss bedacht werden, dass

eine Aussage über das in vivo Verhalten in vitro klonogener Zellen nur mit Einschränkungen möglich ist, da grundsätzlich verschiedene Wachstumsbedingungen vorherrschen.

3.3 Polymerase Kettenreaktion – PCR

Die PCR dient zum Nachweis von MRD durch die Detektion von disseminierten Tumorzellen auf der Ebene von Nukleinsäuren.

Für hämatologische Malignome, die häufig eine genetische Aberration finden lassen, als Beispiel sei noch mal das bcr-abl Genprodukt bei der CML erwähnt, ist die Einführung der PCR zum Nachweis minimaler Resterkrankung in die Routinediagnostik teilweise schon verwirklicht worden. Bei den soliden Tumoren hingegen fehlen charakteristische genetische Aberrationen, die sich zum Tumorzellnachweis auf DNS-Ebene eignen würden. Darum versucht man sich zum Nachweis einzelner disseminierter Tumorzellen solider Tumoren spezifischer epithelialer Gewebemarker zu bedienen. Epithelspezifische Gene sind jedoch auf genomischer Ebene grundsätzlich in jeder Körperzelle vorhanden, allerdings sollten sie bei tatsächlicher Spezifität für epitheliale Gewebe nur in Zellen epithelialer Abstammung exprimiert werden. Der Nachweis einer epithelspezifischen Zielsequenz vor mesenchyalem Hintergrund lässt sich darum auf Transkriptionsebene, also auf Ebene der mRNA, über eine Reverse Transkriptase-PCR (rt-PCR) erbringen.

3.3.1 rt-PCR

Für die Verwendung einer rt-PCR zum Nachweis disseminierter Tumorzellen solider Tumoren wird von der zu untersuchenden Zellprobe, wie bei der Immunzytochemie (ICC), die mononukleäre Zellfraktion durch Ficoll Zentrifugation oder Erythrozytenlyse gewonnen. Über die Guanidiniumthiozyanat/Phenol/Chloroform Extraktions-Technik² oder einer Variation derselben wird daraufhin aus den mononukleären Zellen die RNS isoliert. Die gewonnenen Ribonukleinsäuren werden mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in komplementäre DNS (cDNS) umgeschrieben, welche dann in einer PCR amplifiziert werden kann. Für die rt-PCR wählt man intronübergreifende Primer, um eine Differenzierung der cDNS von genomischer DNS zu gewährleisten. Selbst kleinste genomische DNS Kontaminationen der Probe können zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Eine Auswertung der PCR-Produkte erfolgt abschließend entweder über Ethidium-Bromid Färbung und Gel-Elektrophorese oder aber über die Southern Blot-Hybridisierung mit markierten Hybridisierungsproben.

² genaueres Verfahren siehe II. Material und Methoden

In dem Abschnitt '2.4. Sensitivität und Spezifität epithelialer Marker' wurde schon anhand der Muzine und Zytokeratine zur Detektion mikrometastatischer Tumorzellen erläutert, dass die derzeit bekannten rt-PCR Assays hauptsächlich aufgrund von illegitimer Transkription in ihrer Anwendbarkeit und Aussagekraft eingeschränkt sind. Wie schon bei der ICC, nur durch die verbesserte Sensitivität im verstärktem Maße, weisen also auch die jeweiligen rt-PCR Assays, selbst bei Verwendung derselben Marker mRNS, divergierende Angaben hinsichtlich ihrer Positivitätsraten auf. Das Fehlen einer Standardisierung der Methodik, zum Beispiel bei der Wahl der Patientenkollektive, der Probengewinnung und -verarbeitung, Wahl der Primer oder Design der rt-PCR, erschwert einen Vergleich der verschiedenen Ansätze und den daraus folgenden Erkenntnisgewinn. Neben der illegitimen Transkription gibt es noch weitere mögliche Gründe für das Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen.

Das Prostata-spezifische Antigen (PSA) ist ein Enzym, das in Form eines Glykoproteins von den epithelialen Zellen der Vorsteherdrüse produziert wird. Für die mRNS des PSA ist die Spezifität zur Detektion von disseminierten Prostatakarzinomzellen in Blut, Knochenmark und lymphatischem Gewebe mittels rt-PCR mehrfach bewiesen worden [87], [137], [41]. Allerdings gibt es eine Veröffentlichung, die auf die Abhängigkeit der Spezifität vom PCR-Protokoll hinweist. Smith et al. fanden im peripheren Blut bei 13 von 13 Kontrollpatienten (7 Männer und 6 Frauen) ein PSA Transkript mittels rt-PCR. Bemerkenswert war, dass dieses Ergebnis nach 80 Amplifizierungszyklen zustande kam. Mit steigender Anzahl der Amplifizierungszyklen stieg auch der Anteil an positiv getesteten Kontrollpatienten. Erst unterhalb einer Zykluszahl von 41 konnte bei keinem der Kontrollproben mehr ein Transkript nachgewiesen werden [116]. Das Auftreten von falsch-positiven Ergebnissen in Abhängigkeit von der Anzahl der Amplifizierungszyklen konnte auch für die CK-19 rt-PCR bei Mammakarzinompatientinnen, hier ebenfalls oberhalb einer Zyklusgrenze von 40, demonstriert werden [112].

Eine andere Untersuchung zeigte, dass die Transkriptionslevel von PSA mRNS androgenabhängig sind. Bei steigender Androgenmenge nahm auch die Transkriptionsrate der PSA mRNS zu und andersherum verringerte sie sich in schlecht differenzierten Tumorzellen [52].

Der Frage nach dem Einfluss von biologischen Faktoren auf die Spezifität von rt-PCR-Verfahren zur Detektion disseminierter Tumorzellen gingen Jung und Krüger et al. weiter nach. In ihrer Studie wurden Knochenmark, G-CSF mobilisierte Blutstammzellen und periphere Blutproben von gesunden Spendern, von Patienten mit epithelialen und hämatologischen Malignomen und von Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen (CID) hinsichtlich einer CK-19 und CEA mRNS Expression untersucht. Weder CEA noch CK-19 mRNS ließen sich in Knochenmarkproben von gesunden Spendern und Patienten mit hämatologischen Malignomen

nachweisen. Im Gegensatz dazu wurden die Proben von Patienten mit CID in bis zu 60% der Fälle positiv. Um daraufhin den Einfluss von Entzündungsreaktionen auf die Transkription dieser Ziel-mRNS zu untersuchen, wurden hämatopoetische Zellen mit und ohne Zytokinstimulation kultiviert. So konnte die CK-19 mRNA in kultiviertem Knochenmark schon ohne eine Stimulation nachgewiesen werden, die CEA mRNA nach einer Stimulation mit γ -Interferon. G-CSF mobilisierte periphere Blutstammzellen zeigten nach Stimulation mit SCF oder Interleukinen (IL-3 und IL-6) ein CK-19 Transkript. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Transkription so genannter gewebespezifischer Gene in hämatopoetischem Gewebe unter bestimmten Voraussetzungen induzierbar sei und bei der Anwendung von rt-PCR-Verfahren zur Detektion von Mikrometastasen mitbedacht werden müsse [63].

Auch Pseudogene, genomische DNS-Abschnitte, deren Sequenz mit der zellulären mRNA Sequenz nahezu identisch ist, können zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Diese Beobachtung konnte insbesondere bei den Zytokeratinen gemacht werden. Da Pseudogene keine Introns aufweisen, führt ihre Amplifikation zu PCR-Produkten, die von denen, die von einer mRNA gewonnen wurden, nicht zu unterscheiden sind [42]. So ist es umso wichtiger eine DNS Kontamination bei der Probenbearbeitung zu vermeiden. Es gibt methodische Ansätze, um sicher zu gehen, dass ein positives rt-PCR-Produkt nicht durch kontaminierende DNS oder die Amplifizierung eines Pseudogens entstanden ist.

Datta et al. verwendeten Primer für ihre nested CK-19 rt-PCR, die alle fünf Introns des CK-19 Gens überspannten und so nur mRNA spezifische Produkte amplifizierten und keine eventuell vorhandene kontaminierende DNS. Um eine Amplifizierung von dem bekannten CK-19 Pseudogen zu vermeiden, wurden die Primer außerdem so gewählt, dass sie Unterschiede zwischen dem Gen und dem Pseudogen am 3'Ende berücksichtigten [21]. Zusätzlich ist es eine gängige Methode, eine rt-PCR einmal ohne die vorgeschaltete Reverse Transkriptase durchzuführen. Liefert die PCR von der RNS ausgehend keine Amplifikate, kann man davon ausgehen, dass die verwendeten Primer ein Pseudogen nicht amplifizieren würden.

Ein weiterer Ansatz zur Differenzierung zwischen der Amplifizierung eines Pseudogens aus kontaminierender DNS und einer tatsächlich vorhandenen mRNA Expression ist der Einsatz von Restriktionsendonukleasen. Schoenfeld et al. verwendeten für ihre CK-19 rt-PCR eine Endonuklease, die bei der CK-19 RNS Sequenz arbeitet, jedoch nicht beim CK-19 Pseudogen [112].

Das Problem der Kontamination kann durch eine Negativ-Kontrolle, die bei jeder PCR mitläuft, eingegrenzt werden. Hierbei lässt man die PCR ohne den Einsatz von DNS laufen und überprüft, ob es zu einer Kontamination der Reagenzien gekommen ist.

Desgleichen muss das Auftreten von falsch-negativen Ergebnissen berücksichtigt werden und kann durch Positiv-Kontrollen eingegrenzt werden. Hier wird mit einem konstant vorhandenen Transkript, so genannter Housekeeping Gene, wie zum Beispiel dem beta-Globulin oder dem GAPDH, überprüft, ob in der zu untersuchenden Probe tatsächlich Nukleinsäuren vorhanden sind oder vielleicht ein Reagenz vergessen wurde.

Die Vorteile der rt-PCR sind ihre hohe Sensitivität, ihre untersucherunabhängige Auswertung und der gegenüber der Immunzytochemie größere Probenanteil, der einer Suche nach MRD zugänglich wird. Das Problem der rt-PCR bei der Detektion von disseminierten Tumorzellen epithelialer Tumoren bleibt die illegitime Transkription. Des Weiteren erlaubt die rt-PCR im Gegensatz zur ICC keine Quantifizierung der detektierten mRNS, denn es stellt ein rein qualitatives Verfahren dar.

Eine quantitative Bestimmung der Tumorzelllast wäre jedoch von Vorteil. Sie würde die Möglichkeit eröffnen, nicht nur die Tumorzelllast bei Diagnosestellung zu bestimmen, sondern ebenso Verlaufskontrollen während der Therapie, also ein Therapieansprechen zu erkennen. Auch die illegitime Transkription oder die Induktion einer Ziel mRNS durch eine Akute Phase Reaktion, von denen man ausgeht, dass hier nur in geringen Mengen eine mRNS exprimiert wird, könnten möglicherweise durch eine Quantifizierung der Expressionslevel erkannt werden [64]. Diese Möglichkeit hofft man durch eine neuere PCR-Technik, die „real-time TaqMan PCR“, verwirklichen zu können.

3.3.2 TaqMan PCR

Das TaqMan PCR-Verfahren kombiniert eine computergesteuerte PCR mit einer Lasertechnik, die eine Zunahme von Fluoreszenzintensität pro Zunahme an PCR-Produkten misst. Eine spezielle Taq DNS-Polymerase setzt bei jeder Extension eine bestimmte Menge an fluoreszierendem Farbstoff frei, der somit der Menge an entstehenden PCR-Produkten direkt proportional ist. Über die graphische Darstellung der Fluoreszenzzunahme pro PCR Zyklus, lässt sich eine Zykluschwelle bestimmen, ab der PCR-Produkte in bestimmter Menge amplifiziert werden [77]. Dieses Verfahren ermöglicht einen quantitativen und qualitativen Nachweis von Nukleinsäuren. Die hiermit eventuell realisierbare quantitative Bestimmung von „cut-off Expressionsleveln“ könnte dazu führen, die Detektion von disseminierten Tumorzellen durch epithelspezifische mRNS von einer illegitimen Transkription oder einer durch biologische Interferenzen transkribierten mRNS, differenzieren zu können. Damit wäre ein hoch sensitives und spezifisches Ver-

fahren zum Tumorzellnachweis epithelialer Tumoren gefunden, vorausgesetzt, eine illegitime Transkription und auch die durch eine Akute Phase Reaktion induzierte mRNA führen tatsächlich, wie angenommen wird, nur zu einem niedrigeren Expressionslevel der Marker mRNA im Gegensatz zu den Transkriptionsleveln in Tumorzellen.

3.3.3 Immunobead rt-PCR

Die immunomagnetische Zellseparierung mit anschließender rt-PCR, Immunobead rt-PCR, kann zu einer Steigerung der Sensitivität in der Detektion disseminierter Tumorzellen führen. Bei dieser Methode werden in einem vorgeschalteten Prozess epitheliale Zellen *in vitro* mit magnetic-bead-konjugierten Antikörpern markiert. Diese Antikörper sind epithelspezifisch und erkennen Epitope wie zum Beispiel die Zytokeratine oder Muzine. Anschließend werden die gebundenen Zellen im magnetischen Feld aus der zu untersuchenden Probe gewonnen und die so selektierten Zellen können in einer rt-PCR analysiert werden.

Mit dieser Methode, die nach der Immunobead-Isolierung nur noch einen geringen Anteil an hämatopoetischen Zellen in den zu untersuchenden Proben aufweist, lässt sich das Risiko von falsch-positiven Ergebnissen durch eine illegitime Transkription vermindern. Verschiedene Gruppen führten diese Untersuchung mit einem Antikörper gegen das humane epitheliale Antigen (Ber-EP4) und anschließender Muc1- oder CK-19 rt-PCR bei der Suche nach disseminierten Mammakarzinomzellen im Blut durch [22], [26]. Unter Verwendung einer Muc1 rt-PCR nach immunomagnetischer Isolierung von Mammakarzinomzellen einer Zelllinie (MCF7) aus peripherem Blut, ließ sich eine Tumorzelle in 5ml Blut detektieren [22]. Eine Steigerung der Sensitivität und auch der Spezifität durch dieses Verfahren, denn es konnte keine Muc1 Transkription in normalen Blutzellen gefunden werden, wurde mehrfach nachgewiesen [22], [26].

Abschließend sei zu sagen, dass die Immunzytochemie (ICC) dennoch immer die Standardmethode zum Nachweis einer MRD von soliden Tumoren darstellt und nicht die rt-PCR-Verfahren. Dieses ist nicht nur auf die illegitime Transkription in Geweben mesenchymalen Ursprungs zurückzuführen, was zum Teil der hohen Sensitivität der Methode zugeschrieben wird, sondern neben dem Fehlen von wirklich spezifischen Markern auch auf das Fehlen von ausreichenden Langzeitstudien, die wie schon für die ICC vollzogen, einen Beweis für eine prognostische Bedeutung der mittels rt-PCR detektierten Tumorzellen erbringen könnten.

In Tabelle 2 sind die Charakteristika der hier vorgestellten Methoden noch einmal zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 2: Gegenüberstellung der Methoden zum Tumorzellnachweis

Methoden	Ablauf	Sensitivität	Vorteile	Nachteile
Immunzytochemie (ICC)	<ul style="list-style-type: none"> • MNC-Separation • Zytopsinpräparate • Immunzytochemie • Lichtmikroskopie 	$10^{-4} - 10^{-6}$	<ul style="list-style-type: none"> • gleichzeitig Morphologie und immunologische Reaktion beurteilbar • Quantifizierung möglich 	<ul style="list-style-type: none"> • Untersucherabhängigkeit • Kreuzreaktivität • relative Reaktivität der Antikörper • geringer Probenanteil auswertbar
Zellkultur	<ul style="list-style-type: none"> • MNC-Separation • Zellkultur • Zytopsinpräparate • +/- Immunzytochemie • +/- rt-PCR 	je nach Auswertung	<ul style="list-style-type: none"> • Nachweis klonogener vitaler Zellen • Zellanreicherung 	<ul style="list-style-type: none"> • Artefakte • in vitro Bedingungen • hoher Arbeitsaufwand
rt-PCR	<ul style="list-style-type: none"> • MNC-Separation • RNS-Extraktion • Reverse Transkription • PCR • Elektrophorese oder Southern-Blot 	$10^{-6} - 10^{-7}$	<ul style="list-style-type: none"> • hohe Sensitivität • untersucherunabhängige Auswertung • größere Probenmenge auswertbar 	<ul style="list-style-type: none"> • illegitime Transkription • Kontaminationsgefahr • biologische Interferenzen • Pseudogene • nicht quantifizierbar

3.4 Einfluss der Probengewinnung

Ein weiterer Einflussfaktor auf die unterschiedlichen Ergebnisse bei der Suche nach einer möglichen Tumorzell dissemination ist die Art der Probengewinnung. So konnten Berois et al., wenn auch nur an einem kleinen Patientenkollektiv, zeigen, dass bei einer sternalen Aspiration von Knochenmark mehr Patienten mit einer Tumorzell dissemination identifiziert werden als im Vergleich zu einer Aspiration des Knochenmarks von iliakal. Jedoch gab es einige wenige Patienten, die nur in iliakalen Knochenmark aspiraten disseminierte Tumorzellen finden ließen. Darum werden laut dieser Untersuchung die besten Sensitivitäten erreicht, wenn gleichzeitig aus beiden Regionen Knochenmark gewonnen wird [4].

Pantel et al. konnten nachweisen, dass durch die Untersuchung von jeweils zwei Aspiraten der linken und rechten Iliakalregion ungefähr 90% der Mammakarzinompatientinnen mit disseminierten Tumorzellen im Knochenmark identifiziert werden konnten. Ferner soll sich die Zusammensetzung der Knochenmarkprobe mit zunehmender Menge an kontaminierendem peripherem oder sinusoidalem Blut bei der Aspiration ändern. Und zwar dahingehend, dass die Kontamination mit peripherem Blut signifikant die Frequenz an malignen Zellen im Knochenmark aspirat reduziere [99].

Die optimale Vorgehensweise ist nicht geklärt. Es steht jedoch fest, dass der Nachweis einer minimalen Resterkrankung von der Anzahl der untersuchten Aspirationsstellen und der Qualität der Probe abhängig ist. Auch hier gilt es ein Standardprotokoll zu erstellen.

3.5 Detektion von MRD in Knochenmark vs. Lymphknotengewebe vs. Blut

Eine prognostische Bedeutung von disseminierten Tumorzellen für den weiteren Verlauf der Erkrankung bei soliden Tumoren, konnte für eine Detektion von MRD in Lymphknotengewebe [61], Knochenmark [25] und peripherem Blut [88] gezeigt werden. Die Frage, welches dieser Gewebe zur Bestimmung einer eventuellen Tumorzelldisseminierung bei den unterschiedlichen epithelialen Tumoren am besten geeignet sei, um möglichst frühzeitig die Hochrisikogruppe für ein Rezidivieren der Erkrankung zu detektieren, ist noch nicht geklärt.

Unter rein pragmatischen Gesichtspunkten, sowohl für die Kliniken, als auch die Patienten selbst, wäre peripheres Blut das ideale Gewebe. Peripheres Blut ist durch einfache periphere Punktion der Gefäße zu gewinnen. Es bedarf dabei keiner Anästhesie, ganz im Gegensatz zur Knochenmarkaspiration und der Gewinnung von lymphatischem Gewebe. Jedoch ließ sich an einem kleinen Patientenkollektiv zeigen, dass ein Nachweis disseminierter Tumorzellen bei Mammakarzinompatientinnen in verschiedenen Stadien der Erkrankung mittels CK-19 rt-PCR häufiger in Knochenmarkaspiraten gelang (40%) als in den korrespondierenden Blutproben (14%). Dabei waren 77% (10/13) der positiven Blutproben auch in den korrespondierenden Knochenmarkproben von derselben Patientin positiv [4].

Eine andere Untersuchung brachte genau dem entgegen gesetzte Ergebnisse. Man prüfte ebenfalls korrespondierende Blut- und Knochenmarkproben von Patientinnen mit Mammakarzinom in einer anderen CK-19 rt-PCR. Die Proben dieser Studie waren zum Zeitpunkt der primären Diagnosestellung gewonnen worden. Hier wurden disseminierte Mammakarzinomzellen häufiger in Blutproben (46%) als im dazu gehörigen Knochenmark detektiert (21%). Bemerkenswert war außerdem, dass alle positiven Knochenmarkproben auch einen positiven Tumorzellnachweis in korrespondierenden Blutproben zeigten, jedoch andersherum bei keiner Patientin eine Knochenmarkprobe allein positiv war. Die Autoren deuteten dieses Ergebnis als einen Hinweis für einen hämatogenen Weg der Metastasierung in das Knochenmark. Dieses gilt es natürlich noch an einem größeren Patientinnenkollektiv zu beweisen [72].

Knochenmetastasen sind häufig bei soliden Tumoren zu finden. Um beim Mammakarzinom zu bleiben, ist hier das Skelettsystem nicht nur der häufigste, sondern meist auch der erste Ort der

Metastasierung. Zum Zeitpunkt des ersten Rezidivs fanden Redding et al. bei 57% der Patientinnen mit einem Mammakarzinom Knochenmetastasen [104]. Gleichzeitig gehört der axilläre Lymphknotenstatus beim primär operablen Mammakarzinom zu den entscheidenden Faktoren im Hinblick auf die empfohlene Therapie, wie auch die Prognose. Eine signifikante Korrelation zwischen einer Tumorzelldetektion im Knochenmark und dem Lymphknotenstatus konnte bei Mammakarzinompatientinnen nachgewiesen werden [4], [25].

Eine weitere Untersuchung an Patienten mit einem Lungenzellkarzinom (NSCLC) konnte keine Korrelation zwischen der Immunodetektion von disseminierten Tumorzellen im Knochenmark und der im Lymphknotengewebe nachweisen. Dieses ließ die Autoren dieser Studie vermuten, dass beide Vorgänge, die Ausbreitung von Mikrometastasen in lymphatisches Gewebe und die Ausbreitung in das Knochenmark, auf stark voneinander abweichenden biologischen Hintergründen beruhen [99]. Es kann bedeuten, dass die Suche nach einer Mikrometastasierung in das Lymphknotengewebe zusätzliche Informationen bei der Frage nach der Ausdehnung von okkulten Tumorzell dissemination liefern kann.

In denen im Verlaufe dieses Textes erwähnten Studien, konnten disseminierte Tumorzellen bei Mammakarzinompatientinnen mittels rt-PCR in Lymphknotengewebe in 10% bis 36% [112], [94], in peripherem Blut zwischen 21% und 53% [21], [4], [72] und in Knochenmark in 48% bis 75% [4], [72], [21] der untersuchten Proben detektiert werden (siehe auch Tabelle 1). Hier wird nur eine Tendenz gezeigt, die das Knochenmark als den scheinbar wesentlichen Ort zur Detektion disseminierter Tumorzellen bei Patientinnen mit einem Mammakarzinom auszeichnet. Ein aussagekräftiger Vergleich ist jedoch auch hier aufgrund einer mangelnden Standardisierung der verschiedenen Studien, in Bezug auf die Spezifität der Marker, Erkrankungsstadium der Patientenkollektive, Gewinnung der Proben, um nur einige Aspekte zu nennen, nicht möglich.

Die Frage welches Medium sich nun am besten eigne, dass heißt, durch die Untersuchung welchen Gewebes findet man am zuverlässigsten die Hochrisikogruppe für ein Rezidiv bei unterschiedlichen epithelialen Tumoren, bleibt vorerst ungeklärt.

In der Frage, ob zur autologen hämatopoetischen Rekonstitution nach einer Hochdosistherapie entweder zytokinstimuliertes Blut oder Knochenmark besser geeignet sei, wurde ebenfalls versucht den relativen MRD Status beider Gewebe zu testen. Es gibt Untersuchungen, die zu dem Schluss kommen, dass Stammzelltransplantate eine geringere Tumorzellkontamination aufweisen, als das Knochenmark [113]. Andere Untersuchungen widersprechen hier und meinen, wenn das Knochenmark kontaminiert sei, müssten auch Tumorzellen im Blut vorhanden sein

[91]. Damit stellt sich die zentrale Frage nach dem Ablauf und den Mechanismen beim Vorgang der Metastasierung. Wegen der Bedeutung der MRD in Bezug auf die Entwicklung von Metastasen soll im folgenden Kapitel auf den Prozess der Metastasierung eingegangen werden.

4.0 Prozess der Metastasierung

Maligne Neoplasien unterscheiden sich von benignen Neoplasien durch invasives, destruierendes Wachstum in angrenzende Gewebe und die Fähigkeit zur Metastasierung. Metastasen sind Absiedlungen vom Primärtumor in entfernte Kompartimente des Organismus und stellen die Hauptursache für die Mortalität von malignen Erkrankungen dar. Daher ist das Ziel eines kurativen Therapieansatzes nicht nur die komplette Entfernung des Primärtumors, sondern insbesondere auch die Verhinderung einer Metastasenbildung. Letzteres ist der Hauptansatz für die Verabreichung von Chemotherapien.

Vom Primärtumor abgesiedelte Tumorzellen, die zur Formation von Metastasen führen können, breiten sich grundsätzlich entweder über das lymphatische System, auf hämatogenem Wege oder innerhalb einer Körperhöhle aus [2]. Dabei konnte in mehreren Studien, zum Teil am Tiermodell, demonstriert werden, dass systemisch zirkulierende Tumorzellen sehr ineffizient in der Formation von Metastasen sind [31], [79], [43].

Glaves et al. untersuchten renal venöses Blut von Patienten mit primären Nierenkarzinomen direkt vor einer radikalen Nephrektomie auf Tumorzellen. Bei 8 von 10 Patienten fand man über einen immunzytochemischen Nachweis Nierenkarzinomzellen in den Blutproben, entweder als einzelne Zelle oder in kleinen Zellhaufen (multicell emboli). Man entdeckte pro Milliliter Blut zwischen 14 und 7509 Zellen bzw. Emboli. Des Weiteren kam man auf eine mittlere Anzahl von $3,7 \times 10^7$ Tumorzellen, die pro Tag für wenigsten 180 Tage in das Blut gelangt sein mussten. Trotz dieser enormen Tumorzellzahl in der Blutzirkulation zeigten nur 3 von 10 Patienten extraperitoneale Metastasen vor der chirurgischen Intervention. Nach der Nephrektomie und einer maximalen Beobachtungszeit von 35 Monaten trat nur bei einem weiteren Patienten die Entwicklung einer Fernmetastase auf [43].

Liotta et al. zeigten an einem Mausmodell, dass ungefähr 1×10^5 Tumorzellen in die Blutzirkulation gelangt waren, bevor man das Entstehen einer Metastase beobachten konnte [79]. Es ist also davon auszugehen, dass Tumorzellen zwar in großen Mengen in die systemische Zirkulation gelangen, jedoch weniger als 0,01% dieser Zellen tatsächlich zur Bildung von Metastasen füh-

ren [79], [87]. Somit ist die systemische Anwesenheit von Tumorzellen nicht zwangsläufig mit einer Metastasierung gleichzusetzen. Wie in vorherigen Kapiteln gezeigt werden konnte, ist eine prognostische Bedeutung dieser Tumorzellen Gegenstand der derzeitigen Forschung.

Während der Pathogenese von Metastasen müssen diejenigen Zellen, die Metastasen bilden, eine Reihe von potentiell letalen Interaktionen innerhalb des Organismus überstehen. Hierbei handelt es sich um immunologische und mechanische Hindernisse, sowie die Fähigkeit der Tumorzellen eine metastatische Kaskade zu durchlaufen, die in der Formation einer soliden Metastase endet [55].

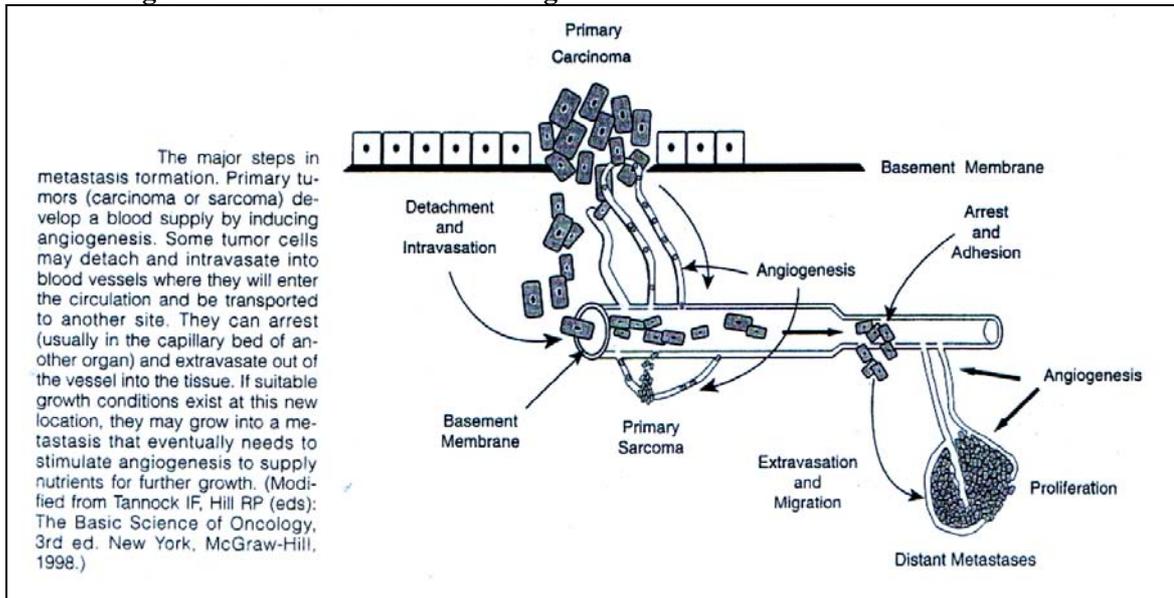
Man geht davon aus, dass nach der initialen Transformation einer Tumorzellpopulation das Wachstum der neoplastischen Zellen progressiv ist und die nutritive Versorgung für den wachsenden Tumor über einfache Diffusion geschieht [32]. Erreicht eine Tumormasse einen Durchmesser von mehr als 1-2mm muss es zu einer Neovaskularisation kommen, damit der Tumor weiter wachsen kann [33], [34], [49].

Die Hauptschritte der Metastasierungskaskade einer Tumorzelle, von der jeder einzelne limitierend ist, sehen danach vereinfacht dargestellt wie folgt aus:

- Adhäsionsverlust vom Primärtumor
- Invasion des umgebenden Gewebes
- Eintritt in vaskuläre Strukturen (Intravasion)
- Überleben der Tumorzelle als Einzelzelle oder als Zellhaufen in der Zirkulation
- Verbleiben der Tumorzelle im kapillären Bett an einem Ort fern des Primarius
- Austritt durch eine Gefäßwand (Extravasion)
- Infiltration des umgebenden Gewebes
- Proliferation zu einer soliden Struktur (Metastase)
- die Kaskade kann von neuem beginnen

[2], [49], [55].

Die metastatische Kaskade wird in Abbildung 2 noch mal schematisch veranschaulicht dargestellt.

Abbildung 2: Kaskade der Metastasierung

aus [108]: Rubin Ph, *Clinical Oncology*, 8th Ed., WB Saunders Company;2000,(II):43.

Systemische Tumorzellen müssen als heterogen angesehen werden und der Prozess der Metastasierung als selektiv [35], [87].

Schon 1889 proklamierte Paget die heute immer noch gültige Theorie von „Seed and Soil“ für die Formation von Metastasen, die er aus klinischen Beobachtungen und Autopsiebefunden von Mammakarzinompatientinnen ableitete. Dabei geht man davon aus, dass der Prozess der Metastasenbildung nicht zufällig geschieht, sondern, dass einige Tumorzellen („seeds“) eine Affinität für bestimmte Gewebe zeigen, die für sie ein geeignetes Wirtsmilieu („soil“) darstellen. Eine Metastase entsteht demnach nur, wenn „Seed“ und „Soil“ zusammenpassen [98]. Das Konzept von „Seed and Soil“ konnte mehrfach bestätigt werden [119], [32], [87].

Bei Mamma- und auch bei Prostatakarzinomen ist das Skelettsystem nicht nur der häufigste, sondern meist auch der erste Ort der Fernmetastasierung. Tumorzellen, die zum Beispiel von einem Mammakarzinom in das Skelettsystem disseminieren, müssen das kapilläre Organbett der Lunge passiert haben; dennoch ist die Formation von Lungenmetastasen bei dieser Tumorentität nicht so häufig zu finden wie eine Metastasierung in das Skelettsystem [35]. Damit wird deutlich, dass sich nicht alle Metastasierungsorte aufgrund der anatomischen Lokalisation des Primärtumors erklären lassen und bestimmte Tumoren ein selektives Metastasierungsmuster durch eine „Organotropie“ der Tumorzellen aufweisen [32], [35], [87], [51].

Die Heterogenität von Tumorzellen wird deutlich, wenn man bedenkt, dass einige Tumorzellen einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Tumorzellen haben, die eine metastatische Kaskade

nicht durchlaufen, sondern zugrunde gehen oder latent im Organismus verbleiben [32]. Darüber hinaus konnte in einem *in vitro* Modell demonstriert werden, dass Zellen einer Metastase gegenüber Tumorzellen aus dem Primärtumor einen Wachstumsvorteil zeigen und, dass selektionierte metastatische Zellklone letztlich den Primärtumor überwuchern können [128].

Eine maligne Entartung und deren Progression wird nach allgemein gültiger Annahme genetischen Veränderungen zugeschrieben [2]. Tumorzellen erwerben die Fähigkeit zur Metastasierung durch eine Anhäufung von genetischen Veränderungen. Diese führen dazu, dass Tumorzellen mit progressiv metastatischen Fähigkeiten ausgestattet werden und zwar durch:

- Alterationen in Zellregulierungsmechanismen
- Sekretion von proteolytischen Enzymen, die in der Lage sind die Extrazelluläre Matrix (ECM) zu degradieren
- Induktion von Angiogenese
- erhöhte zelluläre Motilität
- veränderte Expression von Zelladhäsionsmolekülen,

um nur einige zu nennen [106]. Diese Mechanismen, die eine maligne Disseminierung vorantreiben oder ermöglichen, sind allesamt physiologische Prozesse, die nun aber an „falscher Stelle“ auftreten. Den unterschiedlichen metastatischen Fähigkeiten können bestimmte Phänotypen zugeordnet werden, wobei beispielhaft im Folgenden nur auf zwei Membranrezeptoren, den endothelialen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) und das ErbB2, auch Her2/neu Protoonkogen, eingegangen werden soll.

Die HER Familie von Membranrezeptoren besteht aus HER1 auch als EGFR bezeichnet, HER2 auch ErbB2 oder HER2/neu, HER3 auch ErbB3 und HER4 auch ErbB4 genannt.

Diese Rezeptoren zeigen bis auf das HER3, die gleiche molekulare Struktur, mit einer extrazellulären Liganden-bindenden Domäne, einer kurzen transmembranösen Domäne und einer intrazellulären Domäne mit Tyrosinkinase (TK) Aktivität.

Das Binden von verschiedenen Liganden an die extrazelluläre Domäne initiiert eine Signalkaskade, die eine Vielzahl von Aspekten der Tumorzellbiologie in Gang setzen kann, wie zum Beispiel die gesteigerte Zellproliferation, Stromainvasion, Resistenz auf apoptotische Signale, Migration und Angiogenese [74].

Slamon et al. konnten zeigen, dass die Amplifikation und Überexpression von Her2/neu in Karzinomzellen mit einem aggressiveren Wachstum bei Mamma- und ovariellen Karzinomen assoziiert war [115].

Pantel et al. fanden eine hohe Inzidenz von ErbB2 Expression bei im Knochenmark detektierten disseminierten Mammakarzinomzellen und vermuteten, dass Tumorzellen mit einer ErbB2 Expression einen Wachstumsvorteil für den metastatischen Prozess innehaben könnten [99].

Auch für EGFR konnte man eine Überexpression in verschiedenen Malignomen, darunter auch bei Mammakarzinomen finden [109], [17]. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass eine gesteigerter EGFR Expression mit einem schlechteren klinischen Verlauf bei unterschiedlichen Malignomen, unter anderen bei Karzinomen der Lunge und Blase, assoziiert war [89], [84].

Die Bedeutung des EGFR und Her2/neu für die Entstehung von Metastasen und somit für den progressiven Verlauf einer karzinomatösen Erkrankung, führten zu der Entwicklung und Testung von EGFR- und HER2- Inhibitoren in der Tumorthherapie. Bei der konventionellen Chemotherapie, die unselektiv das Zellwachstum hemmt, werden nicht nur Tumorzellen, sondern auch gesunde Zellen des Körpers mit hohem Zellumsatz (Wechselgewebe) geschädigt. Dies führt zu starken, gelegentlich auch lebenslimitierenden Nebenwirkungen der Chemotherapeutika. Die Verwendung von EGFR- oder HER2- Inhibitoren in Form von monoklonalen Antikörpern, die gegen die extrazelluläre Domäne gerichtet sind und Tyrosinkinase Inhibitoren (TKI), die intrazellulär kompetitiv die Tyrosinkinase Aktivität hemmen, verspricht eine therapeutische Selektivität für Tumorzellen mit weniger Nebenwirkungen.

Ein monoklonaler IgG-Antikörper gegen das HER2, Trastuzumab (Herceptin[®]), wurde bereits im Jahre 2000 zugelassen und wird als adjuvante Therapie bei metastasierten Mammakarzinomen sowohl als Einzeltherapie als auch in Kombination mit einer Chemotherapie eingesetzt.

Der bisher am weitesten entwickelte EGFR-Inhibitor, das Gefitinib, ein selektiver und reversibler kompetitiver Tyrosinkinase Inhibitor wurde in den Vereinigten Staaten schon im Jahre 2003 aufgrund der Ergebnisse von zwei klinischen Studien als third-line Einzeltherapie für das fortgeschrittene Nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC) zugelassen [71], [36]. Es wird derzeit in klinischen Studien für weitere Malignome erprobt und zeigt Erfolg versprechende Ergebnisse für eine zukünftige und breitere Anwendbarkeit in der Tumorthherapie [110], [18].

5.0 Humane Muzine – Muc1, Muc2, Muc3

Im Hinblick auf die hier vorgestellte Arbeit erscheint es sinnvoll, nochmals genauer auf die humanen Muzingene, die dazugehörigen Glykoproteine, ihr Organverteilungsmuster und ihre Rolle als epitheliale Marker in der Tumorzell Diagnostik einzugehen.

Muzine werden von verschiedensten sekretorischen, epithelialen Geweben als membrangebundene oder sekretorische Proteine synthetisiert. Es handelt sich hierbei um Glykoproteine, die aus einem Coreprotein (Apoprotein) bestehen, welches über O-glykosidische Bindungen hochgradig mit Oligosaccharidketten glykosiliert ist. Die Muzine sind aufeinander folgend nach ihrer Entdeckung und Sequenzierung mit fortlaufenden Zahlen benannt worden [39].

Es existieren zahlreiche Veröffentlichungen über die Expressionsmuster der verschiedenen Muzine in unterschiedlichen Geweben und Organen [39], [138], [101]. Man fand heraus, dass die unterschiedlichen Muzine ein bestimmtes Organverteilungsmuster aufweisen und, dass es gerade in Karzinomen und karzinomatösen Metastasen zu einer Veränderung der Muzinexpression kommen kann. Dies hat man versucht sich in der Tumorzell Diagnostik zu Nutze zu machen [56], [82], [138], [5].

Hier soll wegen der Relevanz für diese Arbeit nur auf die ersten drei aus der Gruppe der Muzine (Muc1, Muc2, Muc3) eingegangen werden.

Muc1

Das Muc1, auch Episialin oder PEM genannt, ist ein membrangebundenes Protein, das dazugehörige Gen findet sich auf dem Chromosom 1. Mittlerweile weiß man, dass auch eine sekretorische Form von Muc1 existiert [38], [39].

Muc1 wird physiologischer Weise von den gesunden Epithelien im Bronchialtrakt, in der Brustdrüse, im Endometrium, von der Prostata, in den Nierentubuli, in den Speicheldrüsen, im Ösophagus, von der Magenschleimhaut, der Gallenblase und in der Pankreas synthetisiert [39].

Man konnte nachweisen, dass die Muc1 Expression in Mamma-, Lungen-, Pankreas-, ovariellen und Prostatakarzinomen ansteigt [56], [38]. Bei diesen unterschiedlichen Tumorentitäten findet man immunzytochemisch unterschiedliche antigenetische Formen von Muc1. Man geht davon aus, dass es durch Veränderungen am Coreprotein oder/und auch durch Veränderungen im Grad und der Form der Glykosilierung, und damit in der Antigenität, zu Unterschieden in der Muc1 Expression zwischen den verschiedenen Tumoren untereinander und auch im Vergleich zu gesunden Geweben kommen kann [9], [56], [44]. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für das Muc2 und Muc3 gemacht [58].

Das membrangebundene Muc1 wird von Mammakarzinomzellen exprimiert. Die Transkriptionslevel können stark variieren, sind jedoch meist hochreguliert. Die häufig untersuchte Rolle des Muc1 für die Detektion von disseminierten Tumorzellen beim Mammakarzinom, ihre prognostische Bedeutung und die damit verbundene Problematik ist schon mehrfach im Verlaufe

dieser Arbeit erläutert worden [94], [25], [135], [6], [22]; (siehe auch Kapitel 2.4).

Matsuda et al. untersuchten immunzytochemisch kolorektale Karzinome auf eine Muc1 Expression. Man fand Muc1 positive Zellen signifikant häufiger bei Tumoren im Stadium Dukes C und D, als bei Tumoren im Stadium A und B. Darüber hinaus ließ sich eine Muc1 Expression signifikant häufiger bei hepatisch metastasierten kolorektalen Karzinomen nachweisen, als bei solchen ohne hepatische Metastasen (100% vs 39%; $p < 0.01$). Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von Muc1 bei der Progression vom nicht-metastatischen in das metastatische Stadium [82].

Muc2

Das sekretorische, intestinale Muzin Muc2 wird hauptsächlich von den gesunden Becherzellen des Dün- und Dickdarms, jedoch auch in den Epithelien der Luftwege und Speicheldrüsen synthetisiert [56], [39], [5]. Das dazugehörige Gen befindet sich auf Chromosom 11 [39].

Bei kolorektalen Karzinomen konnte mehrfach eine veränderte Expression von Muc2 festgestellt werden [97], [5], [56], [39]. Man fand eine Überexpression in adenokarzinomatösen Kolongeweben, insbesondere bei muzinösen Karzinomen und eine regelmäßig verminderte Expression in nicht muzinösen Adenokarzinomen. Diese immunzytochemisch gewonnenen Ergebnisse ließen sich auf mRNA Ebene bestätigen [5], [56].

Hingegen fanden Ogata et al. mittels Northern Blot-Analyse eine verminderte Expression von Muc2 und Muc3 mRNA sowohl in Tumorzelllinien als auch in Gewebeproben von Kolonkarzinomen [97].

Trotz dieser widersprüchlichen Ergebnisse wurde das Muc2 als spezifischer Marker für den Nachweis einer Mikrometastasierung in regionären Lymphknoten bei kolorektalen Karzinomen [3], [57] und auch als Marker für muzinöse Karzinome im Allgemeinen vorgeschlagen [48]. Umfassende Ergebnisse, die eine Spezifität dieses Markers und eine prognostische Relevanz für auf diese Weise frühzeitig detektierte Tumorzell dissemination beweisen würden, stehen noch aus.

Muc3

Das sekretorische, intestinale Muzin Muc3 wird in gesunden Dün- und Dickdarmepithelien sowie in den Epithelien von Speicheldrüsen und der Gallenblase exprimiert [39], [56]. Das dazugehörige Gen befindet sich auf Chromosom 7 [39].

Eine veränderte Expression wurde nicht nur in karzinomatösen Geweben des Kolorektums [93], [56], [58], sondern auch in Adenokarzinomen und intestinalen Metaplasien des Magens gefunden [61].

Der veränderte Grad an Expression in Karzinomen und Metastasen lässt eine Rolle der Muzine in der Tumorprogression und Metastasierung vermuten. Es existieren zahlreiche Hinweise auf eine tumorassoziierte Immunsuppression durch die Muzine [101], [39], [67], eine antiadhäsive Funktion konnte bestätigt werden [134], [131].

Tumorassoziierte Antigene sind nicht nur vielversprechend als diagnostische und prognostische Marker, sondern auch als Zielantigene für eine Immuntherapie, wie schon im vorherigen Kapitel dargestellt werden konnte. Man geht davon aus, dass in mesenchymales Gewebe disseminierte Tumorzellen gut durch adjuvante Immuntherapien erreicht werden können. Peat et al. schlugen das SM-3 Epitop von PEM (Muc1) als potentiell Zielantigen einer Immuntherapie für Adenokarzinome vor, nachdem gezeigt werden konnte, dass Karzinome eine andere Antigenität als gesunde Epithelien für Muc1 exprimieren und, dass diese antigene Struktur von T-Zellen erkannt werden kann [102]. Derzeit laufen zahlreiche Untersuchungen im Hinblick auf aktive und passive Immuntherapeutika, die das Muc1 als Zielantigen einer solchen Therapie untersuchen [27], [121], [122], [13], [14], [67], [7], [70]. Jedoch stellen sich die Muzine als Zielantigene einer solchen Immuntherapie immer noch als problematisch dar.

Chan et al. untersuchten die Wirkung von Adenokarzinomen auf T-Lymphozyten von gesunden Spendern anhand von 25 verschiedenen Tumorzelllinien in Kultur. Man fand heraus, dass lösliches Muc1 (sMuc1), welches von den epithelialen Tumorzelllinien in Kultur produziert worden war, eine T-Zellproliferation hemmt. Es kam zu einem Proliferationsstillstand der T-Zellen in G_0/G_1 des Zellzyklus und man konnte nachweisen, dass die T-Zellen in diesem Zustand keine Interleukin-2 (IL-2) Rezeptoren exprimierten. Entfernte man immunopräzipitatorisch sMuc1 aus den Kulturenmedien, wurde der inhibitorische Effekt auf die T-Lymphozyten wieder aufgehoben [13].

Eine T-Zellsuppression durch Muc1 Antigen konnte auch in weiteren Untersuchungen dargestellt werden, sowohl im Versuch mit für humanes Muc1 transgenen Mäusen [14], als auch in einem Kulturverfahren mit löslichem Muc1 und Muc2, wobei sich hier eine fehlende IL-2 Sekretion der T-Zellen nachweisen ließ [67].

Koido et al. untersuchten an einem Tiermodell die Induktion einer Antitumorimmunität durch Impfung mit dendritischen Knochenmarkzellen (DC), welche mit Muc1 mRNA transfiziert worden waren. Die DC exprimierten Muc1 an ihrer Zelloberfläche und wurden in einem Arm der Untersuchung einem Wildtyp von Mäusen injiziert, die daraufhin eine spezifische zytotoxische Aktivität gegen Muc1-positive Tumorzellen zeigten. Der andere Arm bestand aus für humanes Muc1 transgenen Mäusen, bei denen durch Injektion der DC keine Immunantwort ausgelöst werden konnte. Verabreichte man jedoch Interleukin-12 (IL-12) in Kombination mit den DC, kam es auch bei den transgenen Mäusen zu einer Muc1-spezifischen Immunantwort. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Impfung mit Muc1 transfizierten, dendritischen Zellen in der Kombination mit IL-12 die Toleranz des Immunsystems zumindest im Tiermodell gegen Muc1 aufhebt und sich eine Immunantwort gegen Muc1-positive Tumoren induzieren lässt [70].

Die hier erwähnten Untersuchungen lassen einen Teil der Problematik in der Entwicklung einer effizienten Immuntherapie über die antigenetische Struktur der Muzine erkennen. Braun et al. gehen davon aus, dass die Expression von tumorassoziierten Zelloberflächenantigenen auf disseminierten Tumorzellen heterogen ist. Dieses kann die Effektivität von monovalenten immuntherapeutischen Strategien gegen nur ein spezifisches Antigen einschränken. Die Definition oder das Finden eines spezifischen Zielantigens, stellt also das erste Hindernis für ein passendes Immuntherapeutikum dar, welches laut dieser Autoren eventuell in der polyvalenten Form leichter zu finden wäre [7].

Abschließend bleibt zu betonen, dass die Muzine eine Rolle in der Tumorprogression zu spielen scheinen und zwar in dem Sinne, dass Tumorzellen, die Muzine exprimieren, neben einem Adhäsionsverlust auch in der Lage zu sein scheinen sich dem Immunsystem entziehen zu können. Des Weiteren gibt es Hinweise auf Interaktionen der Muzine mit der extrazellulären Matrix [131]. Dies sind nur einige, dennoch allesamt Faktoren, die das Durchwandern einer metastatischen Kaskade wahrscheinlicher machen. Weitere Funktionen der Muzine sind noch unerkannt, jedoch spricht vieles dafür, dass Tumorzellen, die über eine Muzinexpression detektiert werden, eine prognostische Bedeutung haben und zwar dahin gehend, dass sie potentiell Zellen mit erhöhtem Metastasierungsrisiko darstellen. Dieses gilt es jedoch noch in spezifischen Testverfahren und anhand von Langzeituntersuchungen zu beweisen.

II. Fragestellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Beitrag zum Nachweis disseminierter Tumorzellen von epithelialen Tumoren zu leisten. Dabei wurde sich hier auf die Transkription der humanen Muzingene Muc1, Muc2 und Muc3 konzentriert.

Die humanen Muzingene und ihre Rolle als Marker für epitheliale Zellen, insbesondere für den Nachweis von disseminierten Tumorzellen bei epithelialen Tumoren, als auch die Muzine als mögliche Zielantigene für Antikörpertherapien bei epithelialen Tumoren, sowie die Frage nach der Bedeutung der Muzinexpression bei malignen Zellen für eine schlechtere Prognose der Tumorerkrankung und die Formation von Metastasen, führte zu der Frage nach der Transkription dieser Marker. Von Interesse war dabei jedoch nicht nur die Transkription der Muzingene in malignen Tumorzellen epithelialer Herkunft, sondern wegen der häufig proklamierten mangelnden Spezifität der Muzine als Marker für epitheliale Zellen, auch die Frage nach einer „illegitimen Transkription“ in Zellen mesenchymalen Ursprungs.

Die Einrichtung für Knochenmarktransplantation ermöglichte auch die Analyse von klinischen Proben, so dass die hier verwendeten Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktionen auch gleich in ihrer praktischen Anwendbarkeit überprüft werden konnten.

Um die Stabilität der mRNA als Marker oder andersherum die Spezifität der Muc1, Muc2 und Muc3 rt-PCR genauer zu untersuchen, wurden nach Kultivierung der untersuchten Zelllinien und klinischen Proben mit verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die jeweiligen Amplifikationen erneut durchgeführt. Damit wurde der Frage nach dem Einfluss von Akute Phase Reaktionen, biologischen Interferenzen und somit der Frage nach der Stabilität der verschiedenen Muzin mRNA für den Nachweis an klinischen Proben nachgegangen.

Die Fragestellungen lauten wie folgt:

- Lassen sich nach eigenem Primerdesign Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktionen zum spezifischen Nachweis einer Transkription der humanen Muzingene Muc1, Muc2 und Muc3 etablieren?
- Lässt sich im Hinblick auf die Spezifität der humanen Muzine als epitheliale Marker zur Tumorzell-detektion, eine illegitime Transkription in Geweben nicht-epithelialen Ursprungs nachweisen und wie sieht das Transkriptionsmuster in unterschiedlichen klinischen Proben, wie Knochenmark, peripherem Blut und Leukapheresen von Patienten mit epithelialen oder hämatologischen Malignomen oder von gesunden Spendern aus?
- Wie beeinflussen in einem in vitro Modell getestet, unterschiedliche Zytokine und Wachstumsfaktoren das Transkriptionsmuster für die humanen Muzine 1, 2 und 3?

III. Material und Methoden

1. Geräte und Materialien:

Geräte:

Accupipex Pipettierhelfer Assistant[®], Fa. Hecht Assistant GmbH, Schweiz
Auflichtmikroskop Wilovert S, Fa. Hund, Wetzlar
Begasungsbrutschrank BB 6000, Fa. Heraeus, Osterode, BRD
Coulter Counter ZM, Fa. Coulter, Krefeld, BRD
Digital Graphic Printer UP D890, Fa. Sony
Elektrophoresegerät Pharmacia LKB Multidrive XL, Fa. Amersham Pharmacia
Eppendorf Varipette[®], Fa. Eppendorf GmbH, Hamburg, BRD
Fotokammer, Fa. Phase, Lübeck, BRD
Gelelektrophoresekammer Agagel Maxi, Fa. Biometra, Göttingen, BRD
Gelelektrophoreseträger und -kämme Maxicell[®], Fa. E-C Apparatus Corporation, NY, USA
Heizblock Dri Block[®] DB 2A, Fa. Techne
Kryotec, Gefrierschrank, Fa. Hans-S. Schröder GmbH, Hamburg, BRD
Kühlzentrifuge Megafuge 1,0R, Fa. Heraeus Sepatech GmbH
Photo-Printing Paper UPP-110-HD, 110mm x 20m, Fa. Sony
Sicherheitswerkbank LaminAir HB 2472, Fa. Heraeus, Osterode
Spektrophotometer Uvikon 931, Fa. Bio-Tek Kontron Instruments
Stickstofftank IC 50D-Storage Dewar, Fa. International Cryogenics, Inc.
T-Gradient, Fa. Biometra, Göttingen, BRD

Thermocycler:

-Thermomixer 5436, Fa. Eppendorf GmbH, Hamburg, BRD
-UNO-Thermoblock, Fa. Biometra, Göttingen, BRD
Wasserbad GFL[®], Fa. Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, BRD
Zentrifuge GK10, Fa. Sigma Laborzentrifugen GmbH
Zytozentrifuge "Mikroliter", Fa. Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, BRD

Einwegmaterialien:

Einmalpipetten, Fa. Costar, Cambridge, USA
Falcon-Reagenzgläser Blue Max[™], 50 ml, Fa. Becton Dickinson, San Jose, USA
Cryo Tubes, Fa. Nunc[™], Roskilde, Dänemark
Kulturflaschen cellstar[®] 50 ml, 250 ml, Fa. Greiner Labortechnik; BRD
Kulturflaschen Nunclon[™]-Surface, 50 ml, Fa. Nunc[™], Roskilde, Dänemark

PCR Tubes / E-cups: 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml , Fa. Eppendorf AG, Hamburg
Serologische Pipetten Advantage™ , 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, Fa. Falcon

Chemikalien, Enzyme und Reagenzien:

Agarose: Seakem® LE agarose, Fa. BMA, Rockland, USA
Ammoniumchlorid, Fa. Merck, Darmstadt, BRD
AmpliTaq® DNA Polymerase, 5U/μl; Fa. Perkin Elmer, Branchburg, USA
Aqua ad iniectabilia, Fa. Braun, Melsungen, BRD
Chloroform, Fa. Merck, Darmstadt, BRD
DEPC (Diethylpyrocarbonat), Fa. Sigma , St. Louis, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid, getrocknet) SeccoSoh®, Fa. Merck, Darmstadt, BRD
DNA Größenmarker GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, Fa. Fermentas, Vilnius, Litauen
DNA Größenmarker pBR322 DNA/BsuRI(HaeIII) Marker, 5, Fa. Fermentas, Vilnius, Litauen
dNTP Set, Fa. Fermentas, Vilnius, Litauen
EDTA (Ethylenediaminetetracetic Acid), Fa. Sigma, St. Louis, USA
Essigsäure 100%, Fa. Merck, Darmstadt, BRD
Ethanol absolut, Fa. Merck, Darmstadt, BRD
GeneAmp® 10x PCR Buffer, Fa. Perkin Elmer, Branchburg, USA
Glykogen (20 mg/ml), Fa. Boehringer Mannheim
Isopropanol/2-Propanol (zur Analyse), Fa. Merck, Darmstadt, BRD
Kaliumhydrogencarbonat, Fa. Merck, Darmstadt, BRD
L-Glutamine 200MM, Fa. Gibco BRL, Paisley, Schottland
Penicillin-Streptomycin, Fa. Gibco BRL, Paisley, Schottland
RNAzol™ B, Fa. WAK, Bad Soden, BRD
Sodium-Pyruvate MEM 100 MM, Fa. Gibco BRL, Paisley, Schottland
Tris-Base (Trishydroxymethylaminomethan), Fa. Merck, Darmstadt, BRD
Trypsin-EDTA, Fa. Gibco BRL, Paisley, Schottland

Puffer und Medien:

FCS-Foetal Bovine Serum, Fa. Gibco, Paisley, Schottland
MEM-Minimum Essential Medium Eagle, Fa. Sigma, St. Louis, USA
PBS- Phosphate buffered saline, Fa. Gibco, Paisley, Schottland
RPMI 1640 Medium with L-Glutamine, Fa. Gibco, Paisley, Schottland

Kits

First Strand cDNA Synthesis Kit, Fa. Amersham, Freiburg, BRD
QIAamp® DNA Blood Mini Kit, Fa. Qiagen

2. Methode

Es wurden Zellen unterschiedlicher Provenienz auf die Transkription der humanen Muzingene, Muc1, Muc2 und Muc3, in einer jeweils dafür etablierten rt-PCR untersucht. Bei den verschiedenen Zellen handelte es sich zum einen um Zelllinien, zum anderen um die mononukleäre Zellfraktion von Patientenproben – Knochenmarkaspirate, peripheres Blut und periphere Blutstammzellen. Diese Patientenproben stammten sowohl von Patienten mit epithelialen Karzinomen und verschiedenen hämatologischen Erkrankungen, als auch von gesunden Spendern. Des Weiteren wurden verschiedene Zelllinien und klinische Proben unter Zugabe von Zytokinen für 3 Tage kultiviert und danach mit der Muc1-, Muc2- und Muc3- rt-PCR im Hinblick auf eine veränderte Transkription dieser Muzingene untersucht.

3. Zelllinien

Außer den humanen Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen wurden alle Zelllinien von der American Tissue Type Collection - ATCC, Rockville, MD, USA, bezogen. Sie sind in Tabelle 3 mit Angabe des Namens, der Herkunft und der jeweiligen Zelltypen aufgeführt.

Die primären humanen Fibroblasten wurden von Frau Dr. rer. nat. Johanna Brandner aus der Hautklinik der Universität Hamburg und die mesenchymalen Stammzellen von Herrn Dr. med. Norbert Stute aus der Einrichtung für Knochenmarktransplantation, ebenfalls an der Universität Hamburg, zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3: verwendete Zelllinien

Name	Herkunft	Zelltyp
Fibroblasten	Mensch	Primärzellen
HL-60	Mensch	APL (Promyelozytenleukämie)
HT-29	Mensch	Kolonkarzinom
Jurkat	Mensch	akute T-Zell-Leukämie
K-562	Mensch	CML
MCF-7	Mensch	Mammakarzinom
MDA-MB 453	Mensch	Mammakarzinom
mesenchymale Stammzellen	Mensch	Primärzellen
Molt-3	Mensch	ALL
Raji	Mensch	NHL (Burkitt-Lymphom)
TF-1	Mensch	Erythroleukämie
U937	Mensch	histiozytäres Lymphom

4. Zellkultur der Zelllinien

Die Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ gemäß den Anweisungen der Hersteller in den empfohlenen Medien kultiviert.

Bei den adhärenz wachsenden Zelllinien wurde das Medium regelmäßig alle 3 Tage gewechselt, wobei nicht adhärenz wachsende und nekrotische Zellen zusammen mit dem alten Medium verworfen wurden, einmalig mit PBS gespült wurde und danach frisches Medium eingebracht wurde. Nach ausreichendem Zellwachstum am Boden der Kulturflasche wurden die Zellen mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst. Dabei wurde nach einmaliger Spülung mit 5ml PBS, 1ml Trypsin in die Kulturflasche einpipettiert und möglichst gleichmäßig über die adhärenz gewachsenen Zellen verteilt. Nach 4 Minuten konnten die Zellen dann vom Flaschenboden abgeklopft werden. Daraufhin wurde 5ml des entsprechenden Mediums dazugegeben und 1ml dieser Zell-Medium-Suspension in eine neue Kulturflasche überführt. Der Rest konnte verworfen werden. Zu der neuen Kulturflasche wurde dann abschließend 10ml des entsprechenden Mediums gegeben und die Kultur erneut im Brutschrank bebrütet.

Bei den nicht adhärenz wachsenden Zellen wurde ebenso alle 3 Tage das Medium gewechselt. Hierbei wurde die Zell-Medium Suspension für 7 Minuten mit 1400 Upm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde überstehendes Medium verworfen und das Zellpellet am Boden in frischem Medium resuspendiert. Nach ausreichendem Zellwachstum wurde wie eben beschrieben zentrifugiert. Die Zellen sind daraufhin jedoch nach der Resuspension mit frischem Medium im Coulter Counter gezählt worden.

Anschließend wurde die Resuspension für 5 Minuten bei 3000 Upm erneut zentrifugiert, das überstehende Medium verworfen und entweder ist sofort die RNS aus den Zellen extrahiert worden oder das Zellpellet wurde bis dahin bei -80°C kryokonserviert.

5. Zytokinstimulierung der Zelllinien und klinischen Proben

Die Zytokinstimulierung der Zelllinien und klinischen Proben erfolgte ebenfalls unter Standardkulturbedingungen. Die verwendeten rekombinanten humanen Zytokine und ihre Arbeitskonzentrationen sind der unten folgenden Tabelle 4 zu entnehmen. Der Granulozyten Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF), der Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF), das Interleukin-3 (IL-3), das Interleukin-6 (IL-6), der Stammzellsfaktor (SCF) und das Interleukin-1 β (IL-1 β) wurden von der Firma Boehringer Mannheim, der Flt-3 Ligand (Flt3), das Gamma-Interferon (γ -INF) und das Thrombopoietin (TPO) von der PromoCell GmbH, Heidelberg, bezogen.

Tabelle 4: Zytokine und ihre verwendeten Arbeitskonzentrationen (Abkürzungen siehe Text)

Zytokin	Arbeitskonzentration
Flt-3	0,2 U/ml
γ -INF	50 U/ml
G-CSF	500 U/ml
GM-CSF	500 U/ml
IL-1 β	1 000 U/ml
IL-3	20 U/ml
IL-6	10 000 U/ml
SCF	5 U/ml
TPO	1 U/ml

Die Zytokinstimulierung wurde für alle Zelllinien und klinischen Proben nach folgendem Schema durchgeführt:

- Mit **o.WF** (ohne Wachstumsfaktor) wurden die Proben und Zelllinien benannt, die für 3 Tage ohne Zytokine kultiviert wurden. Die klinischen Proben wurden mit 5ml RPMI-Medium, 10% FCS, 1% Natriumpyruvat und 1% Penicillin-Streptomycin kultiviert, die Zelllinien nach den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen. Danach RNS-Extraktion aus 2×10^7 Zellen und Analyse in der rt-PCR im Hinblick auf eine Muc1, 2 oder 3 Transkription.
- Kultivierung der Proben für 3 Tage unter Beifügung des jeweiligen Zytokins zum Medium in den in Tabelle 4 angegebenen Arbeitskonzentrationen. Die auf diese Weise kultivierten Proben wurden nach dem jeweils beigefügten Zytokin benannt.

Von denen unter Zytokinzugabe kultivierten Zelllinien und klinischen Proben wurde ebenfalls aus 2×10^7 Zellen die RNS isoliert und sie wurden in allen drei Muzin rt-PCR Assays, nach unten angegebenem Schema, im Hinblick auf eine Transkription der Muzingene 1, 2 und 3 untersucht.

6. Patienten

Bei allen Patienten und Patientinnen, deren Proben hier untersucht wurden, handelte es sich um Patienten und gesunde Spender der Einrichtung für Knochenmarktransplantation der Universitätsklinik Hamburg.

Es gab keine Ausschlusskriterien. Die Patienten hatten alle ihr schriftliches Einverständnis zur wissenschaftlichen Untersuchung ihrer klinischen Proben gegeben.

7. Klinische Proben

Bei den klinischen Proben handelte es sich um Knochenmark, peripheres Blut und Leukaphereseprodukte (G-CSF mobilisierte periphere Blutstammzellen) von Patienten und gesunden Spendern, die alle im Rahmen der stationären und ambulanten Diagnostik in der Einrichtung für Knochenmarktransplantation gewonnen worden waren und von denen für diese Untersuchung einige Milliliter der jeweiligen Proben zur Verfügung gestellt worden waren.

Die Knochenmarkproben wurden in Lokalanästhesie aus dem Beckenkamm aspiriert. Die peripheren Blutproben wurden entweder durch periphere Venenpunktion oder aus einem zentralvenösen Katheter aspiriert. Die peripheren Blutstammzellen wurden nach vorheriger G-CSF Behandlung ebenfalls durch Venenpunktion und entsprechender Verarbeitung mit einer Leukapheresemaschine gewonnen.

Zellgewinnung und Verarbeitung der klinischen Proben:

Zur weiteren Verarbeitung musste aus den klinischen Proben schnellstmöglich die monozytäre Zellfraktion isoliert werden. Dies geschah durch osmotische Lyse der Erythrozytenfraktion nach dem folgenden Protokoll:

Der zu verwendende Erythrozytenlysepuffer bestand aus 8,3g NH_4CL , 1,0g KHCO_3 und 0,04g EDTA, welches in 50ml Aqua dest. gelöst und auf 1000ml mit Aqua dest. aufgefüllt wurde.

Die klinischen Proben wurden in ein 50ml Falconreagenzglas pipettiert und dieses mit eiskaltem Erythrozytenlysepuffer auf 50ml aufgefüllt und für 3-4 Minuten bei -20°C inkubiert.

Diese Probe wurde dann für 10 Minuten bei 20°C und 1400 Upm mit Bremse zentrifugiert und der sich bildende Überstand anschließend verworfen. Falls das am Boden des Falconreagenzglases entstehende Leukozytenpellet noch keine ausschließlich weiße Farbe hatte, wurde die Erythrozytenlyse für eine weitere Minute wiederholt.

Das Leukozytenpellet wurde daraufhin in 1,5ml PBS resuspendiert und die Resuspension erneut, diesmal für 5 Minuten bei 3000 Upm, zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde wieder verworfen und das Leukozytenpellet konnte bis zur RNS-Extraktion bei -80°C aufbewahrt oder direkt der RNS-Extraktion zugeführt werden.

8. RNS-Extraktion

Die RNS wurde aus den Zellen der Leukozyten- und Zelllinienpellets extrahiert. Zuerst wurden die Pellets je nach Zellzahl, bei mehr als 10^6 Zellen mit 1,5ml RNAzol und bei einer Zellzahl darunter mit 1,0ml RNAzol, homogenisiert. Zur Lyse der Zellen mussten die Proben kräftig gemischt werden.

Zur eigentlichen RNS-Extraktion wurde jeder Probe 200 μl Chloroform hinzupipettiert, die Proben 5 Minuten auf Eis abgekühlt und daraufhin für 15 Minuten mit 15000 Upm zentrifugiert.

Zur Präzipitation musste der RNS-haltige Überstand der Proben mit 750µl Isopropanol und 2,5µl Glykogen für mindestens 30 Minuten bei –20°C inkubiert werden. Um ein RNS-Pellet zu erhalten, wurden daraufhin die Proben bei 4°C für 30 Minuten bei 6000 Upm zentrifugiert und danach zweimalig mit Ethanol (75%) gewaschen.

In den so entstandenen und getrockneten RNS-Pellets konnte mit je 50µl DEPC-H₂O und bei 70°C für 10 Minuten im Heizblock die RNS aufgespalten werden.

DNS-Extraktion:

Die DNS-Extraktion erfolgte mit dem QIAmp[®]DNA Blood Mini Kit der Fa. Qiagen, dem Gebrauchsprotokoll folgend.

Die isolierten RNS- und DNS-Konzentrationen wurden spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Dieses diente zum einen der Konzentrationsbestimmung für die Reverse Transkription, bei der genau 1µg RNS eingesetzt wurde, zum anderen war die spektralphotometrische Bestimmung auch gleichzeitig eine Kontrolle dafür, dass sich Nukleinsäuren in der Probe befanden.

9. Reverse Transkription

Bei diesem Schritt wurde anhand der extrahierten zellulären mRNS enzymatisch mit der M-MuLV-Reverse Transkriptase eine komplementäre DNS (cDNS) gebildet. Dies geschah durch Anlagerung von pd(N)₆ Primern an die mRNS und nachfolgender Synthese der cDNS aus den entsprechenden Mononukleotiden. Die Reverse Transkription aus 1µg RNS wurde nach dem im Folgenden aufgeführten Schema durchgeführt:

- 1µg RNS mit DEPC-H₂O auf 8µl auffüllen
- für 10 Minuten bei 65°C inkubieren
- 5µl Bulk first-strand cDNS Reaktions-Mix, 1µl Pd(N)₆ Primer und 1µl DTT Lösung hinzufügen (alle Reagenzien aus First-strand cDNS Synthesis Kit, Fa. Amersham), vermischen und für eine Stunde bei 37°C inkubieren
- auf diese Weise in einem Gesamtvolumen von 15µl enthaltene Doppelstrang RNS:cDNS Heteroduplex, bei –20°C einfrieren oder direkt mit der PCR beginnen.

10. Polymerase-Kettenreaktion

In jeden Ansatz der Polymerase-Kettenreaktion wurde 7,5µl der cDNS Präparationen eingesetzt. Die Reaktionen fanden in einem Thermocycler der Firma Biometra mit beheizbarem Deckel statt.

Als positive Kontrollreaktion zum Nachweis der Integrität der extrahierten RNS, zur Kontrolle der Reversen Transkription und der PCR Amplifikation wurde aus derselben cDNS- Präparation das Housekeeping Gen GapdH, eine ubiquitär transkribierte Sequenz, koamplifiziert. Als Negativkontrolle zum Nachweis einer eventuellen Kontamination des Ansatzes wurde anstelle von cDNS 7,5µl Aqua ad iniectabilia verwendet. Des Weiteren wurde jede der 3 rt-PCR Assays mit mehreren Proben unter Einsatz von DNS durchgeführt, um sicherzugehen, dass durch eine intronübergreifende Primerwahl die akzidentelle Amplifikation genomischer DNS ausgeschlossen war.

Amplifiziert wurden die mRNA Sequenzen der humanen Muzine Muc1, Muc2 und Muc3. Die Primersequenzen wurden mit der Primer-0.5 Software (EMBO, Heidelberg, BRD) anhand publizierter mRNA Sequenzen für die jeweiligen humanen Muzine ([38] für Muc1; [46] Muc2; [47] für Muc3) bestimmt. Die Primerpaare wurden daraufhin bei der Firma Eurogentec in Belgien bestellt und hergestellt.

Tabelle 5: Primerpaare Muc1, Muc2, Muc3 und GapdH (Abkürzungen siehe Text und unten)

	Primerpaar	Primersequenz	Amplikon	Lokalis.	Konz.
Muc1: Outer	Muc1 OS	CTG ATA CTC CTA CCA CCC TTG C	326 Bp	728-749	20 pmol
	Muc1 OA	GAA GGC CAG AGT CAA TTG TAC C		1053-1032	20 pmol
Muc1: Inner	Muc1 IS	TAG CAC TCA CCA TAG CAC GG	246 Bp	777-796	20 pmol
	Muc1 IA	CCT GGC CTG AAC TTA ATA TTG G		1022-1001	20 pmol
Muc2: PP1	Muc2 1-S	TTC TAC GAG GCC TGT GTG C	460 Bp	1337-1355	20 pmol
	Muc2 1-A	ACG CAG GAC TTG CAG GTC		1761-1744	20 pmol
Muc2: PP3	Muc2 3-S	ACT CCA ACA TCT CCG TGT CC	161 Bp	1581-1600	20 pmol
	Muc2 3-A	TCC TCG ACA TAG CAG CCA C		1704-1686	20 pmol
Muc3: PP1	Muc3 1-S	TGT CAG CTC CAG ACC AGA TG	309 Bp	2621-2640	20 pmol
	Muc3 1-A	AGC GTG GTC TTC ACC TGC		2893-2876	20 pmol
Muc3: PP3	Muc3 3-S	ACC CTT ACA TCA CGC AGG AC	453 Bp	2477-2496	20 pmol
	Muc3 3-A	AGC GTG GTC TTC ACC TGC		2893-2876	20 pmol
GapdH	GapdH S	CTG AGA ACG GGA AGC TTG TC	555 Bp	245-264	1,25 pmol
	GapdH A	AGG TCA GGT CCA CCA CTG AC		799-780	1,25 pmol

(OS: outer sense; OA: outer antisense; IS: inner sense; IA: inner antisense; S: Sense; A: Antisense; Bp: Baasenpaare; PP: Primerpaare.)

Die Muc1 rt-PCR wurde im nested Verfahren etabliert, so dass Muc1 in zwei Schritten amplifiziert wurde. Die rt-PCR Verfahren für Muc2 und Muc3 wurden für einen Zyklus etabliert.

Auch die schon etablierte Positivkontrolle GapdH amplifizierte ihr Transkript in nur einem Zyklus. Alle verwendeten Primerpaare, ihre genauen Sequenzen, die Amplikonlänge, die Lokalisation (Lokalis.) auf der entsprechenden mRNA und die verwendeten Konzentrationen (Konz.) sind der oben stehenden Tabelle 5 zu entnehmen.

Die rt-PCRs wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

- Reaktionsgemisch wie in Tabelle 7 aufgeführt ohne TaqPolymerase zusammenpipettieren und bis zur Verwendung auf Eis lagern
- 7,5µl cDNS in ein Reaktionsgefäß pipettieren
- Reaktionsgemisch ohne TaqPolymerase hinzufügen
- zuletzt einpipettieren von TaqPolymerase
- 1. Zyklus (Tabelle 6 zu entnehmen) im Thermozykler starten
- Herstellung einer 1:100 Verdünnung aus den Reaktionsprodukten des 1. Zyklus
- Pipettieren von 5,0µl dieser Verdünnung in ein neues Reaktionsgefäß
- Reaktionsgemisch für den 2. Zyklus ohne TaqPolymerase hinzufügen
- Taqpolymerase hinzufügen und 2. Zyklus starten
- je 10µl der PCR-Produkte in Agarosegel einpipettieren
- Auftrennen der Reaktionsprodukte in 1,5% Ethidiumbromid-gefärbtem Agarosegel und Visualisierung im UV-Licht sowie photographische Dokumentation

Für die PCR-Verfahren, die in einem Zyklus gelaufen sind, galt bis auf das Weglassen des 2. Zyklus der identische Ablauf. Die Ko-Amplifikation der Kontrollreaktionen fand unter identischen Bedingungen statt.

Zur Kontrolle der amplifizierten Sequenzen wurde von einigen PCR-Reaktionsprodukten abschließend eine Sequenzanalyse der Amplifikate bei der Firma Eurogentec, Belgien, durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit den publizierten Sequenz der jeweiligen mRNA, an denen schon die Primer entwickelt worden waren ([38] für Muc1; [46] für Muc2; [47] für Muc3), mit einer nach einem Needleman & Wunsch Algorithmus arbeitenden Software (Husar) auf dem Rechner des EMBO, DKFZ, Heidelberg, abgeglichen.

In der unten folgenden Tabelle 6 sind die genauen Thermozyklen der Muc1, Muc2 und Muc3 rt-PCRs und der Positivkontrolle GapdH sowie ihre Zykluszahlen zu finden.

In Tabelle 7 sind die eingesetzten Reagenzien in genauen Mengenangaben wiedergegeben.

Tabelle 6: Thermozyklen zur PCR-Amplifikation

	1: Initiale Denaturierung	AT	2: Denaturierung	3: Hybridisierung	4: Polymerisation	5: terminale Polymerisation
Muc1 (1+2.Zyk.)	94°C /300s	30	94°C /65s	55°C /65s	72°C /50s	--
Muc2	94°C /300s	30	94°C /65s	55°C /65s	72°C /50s	--
Muc3	94°C /300s	35	94°C /65s	58°C /65s	72°C /60s	--
GapdH	94°C /240s	35	94°C /60s	62°C /60s	72°C /60s	72°C /11min.

(AT : Anzahl der Thermozyklen) **Heizdeckel während aller PCR-Amplifikationen bei 110°C.**

Tabelle 7: Reaktionsgemisch zur Polymerase Kettenreaktion (Muzine und GapdH)

	1.Zyklus	2.Zyklus	GapdH
10x Puffer	5,0µl	5,0µl	5,0µl
dNTP (je NTP 1,25 mM)	8,0µl	8,0µl	4,0µl
Primer OS/IS/S	1,5µl	1,5µl	10,0µl
Primer OA/IA/A	1,5µl	1,5µl	10,0µl
TaqPolymerase	1,5µl	1,5µl	0,33µl
c-DNS	7,5µl	5,0µl von 1:100 Verd.	7,5µl
ddH₂O	<u>25,0µl</u>	<u>27,5µl</u>	<u>13,2µl</u>
Gesamtvolumen	50µl	50µl	50µl

(OS: outer sense; OA: outer antisense; IS: inner sense; IA: inner antisense; S: Sense; A: Antisense; Verd.: Verdünnung mit Aqua dest.)

11. Datenverarbeitung

Die Daten wurden mit den Programmen Microsoft-Excel, Microsoft Word (Microsoft, München) und Adobe® Photoshop® archiviert.

IV. Ergebnisse

1.0 Etablierung einer Muc1 Reverse Transkriptase–Polymerase Kettenreaktion

Nach eigenem intronübergreifenden Primerdesign für die hier etablierte Muc1 rt-PCR im nested (Zweischritt)-Verfahren, ergab sich nach dem 1. Zyklus mit den äußeren Primern eine Amplikonlänge von 326 Basenpaaren (Bp), nach dem zweiten Zyklus mit den inneren Primern eine Amplikonlänge von 246 Bp für das Muc1 Transkript.

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Amplifikation von zellulärer DNS zu einem Amplifikat mit eindeutig höherer Basenpaarzahl führte (Abbildung 3), so dass durch die intronübergreifende Primerwahl die akzidentelle Amplifikation genomischer DNS ausgeschlossen war.

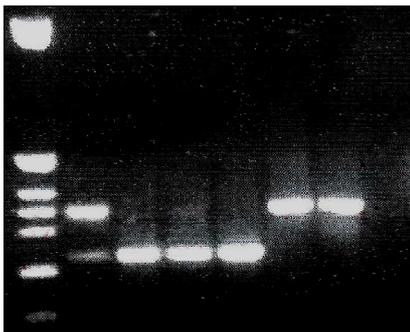


Abbildung 3: PCR Amplifikation von Muc1 nach reverser Transkription und nach Einsatz von zellulärer DNS. Spur 1: pBR322/Hinf-III (1640/516/507/396/344/298/221/220/194 Bp); Spur 2: Raji Zelllinie (RNS); Spur 3: K562 Zelllinie(RNS); Spur 4: klinische Probe, Knochenmark (RNS); Spur 5: MCF-7 Zelllinie (RNS); Spur 6: Raji Zelllinie (DNS); Spur 7: MCF-7 Zelllinie (DNS), Spur 8: H₂O. Die verwendeten Zelllinien sind in [Kapitel III.3; Tabelle 3](#) mit Name, Herkunft und Zelltyp aufgeführt.

Die versehentliche Amplifikation verwandter Sequenzen mit ähnlicher Basenpaarlänge durch die Muc1 Primer, konnte durch Sequenzanalysen einiger Amplifikate und den Vergleich mit der publizierten Sequenz der Muc1 mRNA ausgeschlossen werden. Die Sequenzierungsexperimente ergaben weitestgehende Homologien der Amplifikationsprodukte untereinander sowie mit der publizierten Muc1 mRNA (Abbildung 4).

Abbildung 4: Sequenzanalyse und Sequenzabgleich Muc1 mRNA und Muc1 Transkript-

(47503_2MUC1: Sequenzanalyse eines Muc1 Amplifikats von HT-29 Zellen; 47505_3MUC1: Sequenzanalyse des Muc1 Amplifikats einer Knochenmarkprobe einer Patientin mit Mammakarzinom; hsetmaga.emh: publizierte mRNA-Sequenz nach Gendler et al., 1990;[38].)

47503_2MUC1_	. : . : . : . : . : . : . :	NNANCAAATA-AGNANT-	2040
47505_3MUC1_		CCCA-AG-ACT-	16
hsetmaga.emh	ATGCCAGTAGCACTCACCATAGCACGGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAATCACAGCACTT		2040
47503_2MUC1_	. : . : . : . : . : . : . :	CNCCCNAGTTGTCTACTGGGGTCTCTTTCTTTTCCTGTCTTTTCACATTTCAAACCTCC	2100
47505_3MUC1_		CTCCC-AGT-GTCTACTGGGGTCTCTTTCTTTTCCTGTCTTTTCACATTTCAAACCTCC	76
hsetmaga.emh	CTCCCAGTTGTCTACTGGGGTCTCTTTCTTTTCCTGTCTTTTCACATTTCAAACCTCC		2100
47503_2MUC1_	. : . : . : . : . : . : . :	AGTTTAATTCCTCTCTGGAAGATCCCAGCACCGACTACTACCAAGAGCTGCAGAGAGACA	2160
47505_3MUC1_		AGTTTAATTCCTCTCTGGAAGATCCCAGCACCGACTACTACCAAGAGCTGCAGAGAGACA	136
hsetmaga.emh	AGTTTAATTCCTCTCTGGAAGATCCCAGCACCGACTACTACCAAGAGCTGCAGAGAGACA		2160
47503_2MUC1_	. : . : . : . : . : . : . :	TTTCTGAAATG-----	2220
47505_3MUC1_		TTTCTGAAATG-----	147
hsetmaga.emh	TTTCTGAAATGGTGAGTATCGGCCTTTCCTTCCCCATGCTCCCCTGAAGCAGCCATCA		2220

1.1 Evaluation einer Muc1 Transkription in humanen Zelllinien

Zur Evaluation einer gewebespezifischen Transkription des Muc1 Gens wurde die rt-PCR zuerst an unterschiedlichen humanen Zelllinien von epithelialen Malignomen, von hämatologischen und lymphatischen Malignomen, sowie anhand gesunder Zellen mesenchymalen Ursprungs durchgeführt. Dabei wurden die einzelnen Zelllinien zur Bestätigung der Ergebnisse mindestens im Duplikat untersucht.

(Verwendete Zelllinien mit Name/Herkunft/Zelltyp; siehe Tabelle 3 in Kapitel III.3.;Seite 49.)

Die Zelllinien epithelialer Malignome waren HT-29, MDA-MB453 und MCF-7. Die Ergebnisse sind Tabelle 8 zu entnehmen und zeigen, dass ein Muc1 Transkript in 7 von 7 (100%) untersuchten Fällen von Zelllinien epithelialer Malignome nachweisbar war (Tabelle 8; Spalten 2-4).

Die Zelllinien hämatologischer und lymphatischer Malignome waren U937, K562, HL-60, Raji, Jurkat, TF-1 und Molt-3. Auch hier ließ sich in allen untersuchten Fällen (22/22) eine Muc1 Transkription nachweisen (Tabelle 8; Spalten 5-11).

Auch die Zelllinien von gesunden Zellen mesenchymalen Ursprungs, Fibroblasten und mesenchymale Stammzellen (MSZ), zeigten in 6 von 6 Fällen ein Muc1 Transkript (Tabelle 8; Spalten 12 und 13).

Zusammenfassend sind die hier genannten Ergebnisse in Tabelle 8 dargestellt. In 35 von 35 untersuchten Fällen, also bei allen hier untersuchten Zelllinien, benigner oder maligner Gewebe, epithelialen oder mesenchymalen Ursprungs, konnte eine Muc1 Transkription über das 246 Bp lange Amplikon nachgewiesen werden (Abbildung 5: Muc1 rt-PCR an Zelllinien). Die Sequenzanalysen und der daraufhin folgende Sequenzabgleich mit der publizierten mRNA konnte die Identität des Muc1 Amplikon bestätigen (Abbildung 4: Sequenzabgleich und -analyse Muc1).

Abbildung 5: Muc1 rt-PCR an Zelllinien

von links nach rechts Spuren (Sp) 1-14: Sp1: H₂O, Sp2-3: MDA-MB453/1+2, Sp4-5: Raji/1+2, Sp6-7: HL-60/1+2, Sp8-9: U937/1+2, Sp10-11: K562/1+2, Sp12-13: HT-29/1+2, Sp14: Marker pBR322 DNA/BsuRI (HaeIII): 587-434 Bp, 267-184 Bp, 124-80 Bp.)

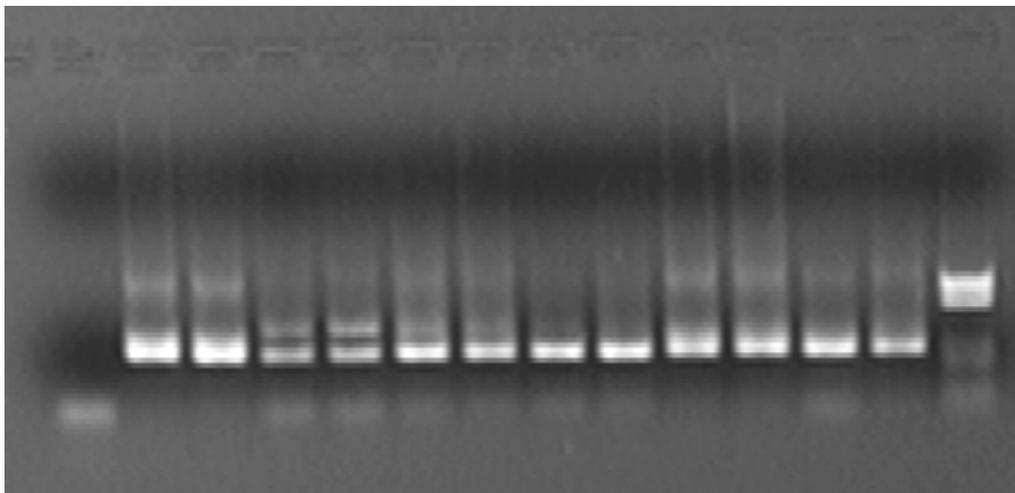


Tabelle 8:

Muc1 rt-PCR an humanen Zelllinien epithelialer Malignome (Spalten 2-4), hämatologischer und lymphatischer Malignome (Spalten 5-11) und gesunden Zellen mesenchymalen Ursprungs (Spalten 12-13).

Zell- linien	HT- 29	MDA- MB	MCF -7	U937	K562	HL-60	Raji	Jurkat	TF-1	Molt-3	Fibro- blasten	MSZ
35/35	3/3	2/2	2/2	4/4	4/4	4/4	4/4	2/2	3/3	1/1	4/4	2/2

(positiver Nachweis/untersuchte Fälle insgesamt)

1.2 Evaluation einer Muc1 Transkription an klinischen Proben

Des Weiteren wurde nach einer Muc1 Transkription in klinischen Proben von Patienten mit epithelialen Malignomen, mit hämatologischen oder lymphatischen Erkrankungen sowie bei gesunden Spendern gesucht. Es wurden insgesamt 24 Knochenmarkproben, 9 Leukapheresepro-

dukte und 4 klinische Proben mit peripherem Blut von diesen Patienten auf eine Muc1 Transkription untersucht.

Knochenmarkproben

Die Transkription von Muc1 konnte in 21 von 24 untersuchten Knochenmarkaspiraten (87,5%) nachgewiesen werden. Die negativen Fälle wurden in einem von 5 Fällen in einer Knochenmarkprobe eines gesunden Spenders, in einem von 7 Fällen bei einer CML und in einem von einem Fall bei einer AML gefunden. Die Weiteren untersuchten Knochenmarkaspirate zeigten alle eine Muc1 Transkription. Die Ergebnisse sind Tabelle 9 zu entnehmen, die Sequenzanalyse des Muc1 Transkriptes einer Mammakarzinompatientin und der Sequenzabgleich mit der publizierten Muc1 mRNA ist in Abbildung 4 (47505_3MUC1_) dargestellt.

Tabelle 9:
Muc1 rt-PCR an Knochenmarkaspiraten (KM)

KM	Mamma- karzinom	CML	ALL	AML	Plasmo- zytom	M.Walden- ström	MDS	SAA	OMF	Gesunde Spender
21/24	1/1	<u>6/7</u>	2/2	<u>0/1</u>	3/3	1/1	2/2	1/1	1/1	<u>4/5</u>

(positiver Nachweis/untersuchte Fälle insgesamt; unterstrichen sind jeweils abweichende Ergebnisse)

Leukaphereseprodukte – periphere Blutstammzellen

Eine Muc1 Transkription ließ sich auch in 9 von 9 untersuchten Patientenproben von peripheren Blutstammzellen nachweisen. Die Ergebnisse sind Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10:
Muc1 rt-PCR an Leukaphereseprodukten (Lp)

Lp	gesunde Spender	AML	Plasmo- zytom	Fibro- sarkom	NHL
9/9	2/2	3/3	2/2	1/1	1/1

(positiver Nachweis/untersuchte Fälle insgesamt)

Periphere Blutproben

Die peripheren Blutproben zeigten in 2 von 4 Fällen eine Muc1 Transkription. Dabei handelte es sich in allen untersuchten Blutproben um das periphere Blut von Mammakarzinompatientin-

nen in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengestellt.

Tabelle 11:
Muc1 rt-PCR an peripheren
Blutproben (pB)

pB	Mamma- karzinom
	2/4

(positiver Nachweis/untersuchte Fälle insgesamt)

2.0 Etablierung einer Muc2 Reverse Transkriptase–Polymerase Kettenreaktion

Für die hier etablierte Muc2 rt-PCR wurden 2 intronübergreifende Primerpaare (PP1 und PP3) synthetisiert. PP 1 führte zu einem 460 Bp langen Amplikon. PP 3 zu einem 161 Bp langen Amplikon. Bei der Amplifikation von zellulärer DNS mit diesen Primerpaaren ließ sich kein eindeutiges Amplifikat nachweisen, so dass eine akzidentelle Amplifikation genomischer DNS mit diesen intronübergreifenden Primern ausgeschlossen werden konnte (siehe Abbildung 6: Muc2 rt-PCR unter Einsatz von cDNS und DNS mit PP1).

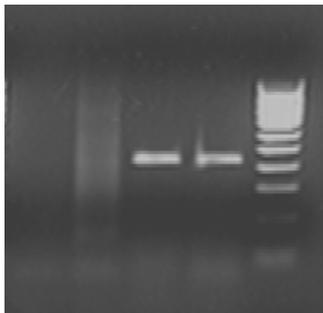


Abbildung 6: Muc2 rt-PCR mit Primerpaar 1 (460 Bp)

von rechts nach links Spuren (Sp) 1-5:

1-Gene Ruler™100bp,DNA Ladder: 80-100/200/300/400/500/600/700-1031

2-HT-29/1-mRNS nach Reverser Transkriptase (cDNS)

3-HT-29/2-mRNS nach Reverser Transkriptase (cDNS)

4-HT-29-zelluläre DNS

5-H₂O

(Verwendete Zelllinien mit Name/Herkunft/Zelltyp; siehe Tabelle 3 in Kapitel III.3.;Seite 49.)

Die versehentliche Amplifikation verwandter Sequenzen mit ähnlicher Basenpaarlänge durch diese Muc2 Primer konnte auch hier durch eine Sequenzanalyse einzelner Amplifikate und deren Vergleich mit der publizierten Sequenz der Muc2 mRNA ausgeschlossen werden. Die Sequenzierungsanalysen ergaben eine weitestgehende Homologie der Amplifikationsprodukte untereinander sowie mit der publizierten Muc2 mRNA (Abbildung 7: Sequenzierungsanalyse und –abgleich Muc2).

nachweisen. Das gleiche galt für die Zelllinien gesunden mesenchymalen Ursprungs, die Fibroblasten und die mesenchymalen Stammzellen (MSZ), bei denen ebenfalls kein Muc2 Transkript nachweisbar war (Tabelle 12 und Abbildung 8).

Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammenfassend dargestellt. Ein Muc2 Transkript ließ sich konstant in HT-29 Zellen (16/16) und einmalig (1/2), allerdings mit sehr schwachem Signal, in MCF-7 Zellen nachweisen. Eine andere epitheliale Zelllinie eines Mammakarzinoms, MDA-MB453, zeigte in keinem von 2 Fällen (0/2) eine Muc2 Transkription.

In den Zelllinien hämatologischer und lymphatischer Malignome und bei den gesunden mesenchymalen Zelllinien konnte ebenfalls in keinem Fall (0/28) eine Muc2 Transkription gefunden werden. Die Sequenzanalyse einzelner Proben und der daraufhin folgende Sequenzabgleich mit der publizierten mRNA konnte die Identität der 460 Bp und 161 Bp langen Muc2 Amplifikate bestätigen (siehe oben, Abbildung 7).

Tabelle 12:

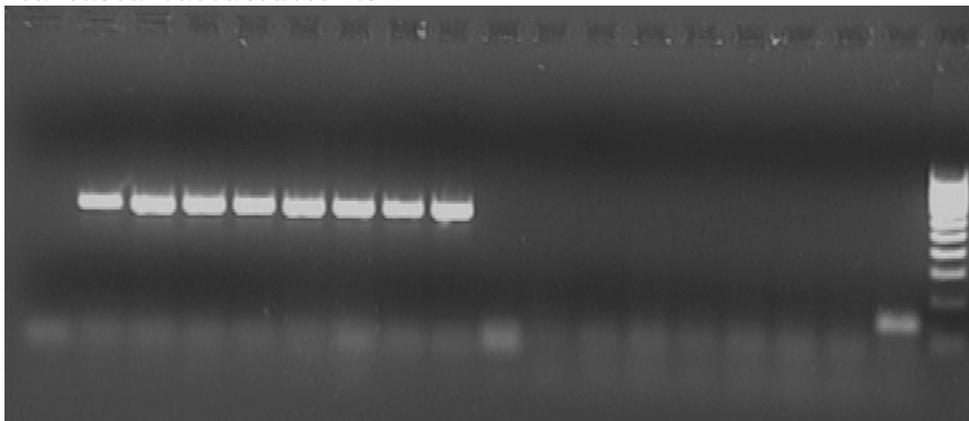
Muc2 rt-PCR mit PP1 und PP3 an humanen Zelllinien epithelialer Malignome (Spalten 2-4), hämatologischer und lymphatischer Malignome (5-11) und gesunden Zellen mesenchymalen Ursprungs (12-13).

Zelllinien	HT-29	MDA-MB	MCF-7	U-937	K562	HL-60	Raji	Jurkat	TF-1	Molt-3	Fibroblasten	MSZ
PP1-460 Bp	<u>13/13</u>	0/3	<u>1/1</u> schwach	0/3	0/3	0/3	0/4	0/1	0/3	0/1	0/3	0/1
PP3-161 Bp	<u>3/3</u>	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	--	--	--	0/1	0/1

(positiver Nachweis/untersuchte Fälle insgesamt; unterstrichen sind jeweils abweichende Ergebnisse; --: nicht untersucht.)

Abbildung 8: Muc2 rt-PCR PP3 (161 Bp) an Zelllinien und Positivkontrolle GapdH

von links nach rechts folgende Spuren (Sp) 1-19. Spur 1-9: GapdH; Spur 10-18 Muc2 rt-PCR mit PP 3, 161 Bp.; Spur 1-9: 1: H₂O, 2: MSZ, 3: Fibroblasten, 4: U937, 5: MCF-7, 6: HL-60, 7: MDA-MB, 8: K562, 9: HT-29. Spur 10-19: 10: H₂O, 11: MSZ, 12: Fibroblasten, 13: U937, 14: MCF-7, 15: HL-60, 16: MDA-MB, 17: K562, 18: HT-29. Spur 20: Gene Ruler™100bp,DNA Ladder: 80-100/200/300/400/500/600/700-1031.



2.2 Evaluation einer Muc2 Transkription an klinischen Proben

Es wurden insgesamt mit beiden Primerpaaren (PP1 und PP3) 23 verschiedene Knochenmark-aspirate, 10 Leukaphereseprodukte und 7 periphere Blutproben auf das Vorhandensein einer Muc2 Transkription untersucht. Die klinischen Proben waren hier von Patienten mit hämatologischen und lymphatischen Erkrankungen, von gesunden Spendern und von Patientinnen mit einem Mammakarzinom gewonnen worden.

Knochenmarkproben

In keiner von 23 untersuchten Knochenmarkproben (0/23) konnte weder unter Verwendung von PP1 noch von PP3 ein Muc2 Transkript nachgewiesen werden. Die Ergebnisse für die hier untersuchten Knochenmarkproben von unterschiedlichen Patienten sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13:
Muc2 rt-PCR an Knochenmarkaspiraten (KM) unter Verwendung von Primerpaar 1 (PP1; Amplikon 460 Bp) und Primerpaar 2 (PP3; Amplikon 161 Bp)

KM	CML	ALL	SAA	M. Wal- denström	Plasmo- zytom	AML	MDS	gesunder Spender
PP1 0/13	0/6	0/1	0/1	0/1	0/2	--	0/1	0/1
PP3 0/10	0/3	0/1	--	--	0/3	0/1	0/1	0/1

(positiver Nachweis/untersuchte Fälle insgesamt; unterstrichen sind jeweils abweichende Ergebnisse; --: nicht untersucht.)

Leukaphereseprodukte – periphere Blutstammzellen

In keiner von 10 untersuchten Leukaphereseprodukten (0/10) ließ sich zusammenfassend mit PP1 und PP3 eine Muc2 Transkription nachweisen. Die Ergebnisse und die Diagnosen zu den untersuchten Proben sind Tabelle 14 zu entnehmen. Dabei sind hier neben den hämatologischen und lymphatischen Malignomen, auch die peripheren Blutstammzellen eines Patienten mit einem Fibrosarkom und 3 Leukaphereseprodukte von gesunden Spendern untersucht worden.

Tabelle 14:
Muc2 rt-PCR an Leukaphereseprodukten (Lp) unter Verwendung von PP1 (460 Bp) und PP3 (161 Bp).

LP	gesunde Spender	AML	Plasmazytom	NHL	Fibrosarkom
PP1 0/9	0/2	0/3	0/2	0/1	0/1
PP3 0/1	0/1	--	--	--	--

(positiver Nachweis/untersuchte Fälle insgesamt; unterstrichen sind jeweils abweichende Ergebnisse; --: nicht untersucht.)

Periphere Blutproben

In den peripheren Blutproben ließ sich in keinem von 7 untersuchten Fällen weder mit PP1 noch mit PP3 eine Muc2 Transkription nachweisen. Es handelte es sich wiederum bei allen untersuchten peripheren Blutproben um das periphere Blut von Mammakarzinompatientinnen in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tabelle 15:
Muc2 rt-PCR an peripheren Blutproben (pB) mit Primerpaar 1 (PP1) und Primerpaar 3 (PP3)

pB	Mammakarzinom
PP1	0/4
PP3	0/3

(positiver Nachweis/untersuchte Fälle insgesamt)

3.0 Etablierung einer Muc3 Reverse Transkriptase–Polymerase Kettenreaktion

Für die hier etablierte Muc3 rt-PCR wurden ebenfalls 2 intronübergreifende Primerpaare (PP1 und PP3) synthetisiert. PP 1 sollte zu einem 309 Bp langen Amplikon führen. PP 3 zu einem 453 Bp langen Amplikon. Bei der Amplifizierung mit diesen Primern kam es jedoch konstant und bei beiden Primerpaaren zu Amplifikaten mit einer Länge von ungefähr 100 zusätzlichen Basenpaaren. Infolgedessen wurde mit PP1 ein Muc3 Transkript bei einer Basenpaarlänge von circa 400, mit PP3 bei einer Basenpaarlänge von circa 550 als positiv gewertet.

durchgeführt. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden die einzelnen Zelllinien mindestens im Duplikat untersucht.

(Verwendete Zelllinien mit Name/Herkunft/Zelltyp; siehe Tabelle 3 in Kapitel III.3.; Seite 49.)

Die Zelllinien von epithelialen Malignomen waren auch hier wieder HT-29, MDA-MB453 und MCF-7. Die erstere stammte von einem humanen Kolonkarzinom, die beiden letzteren von unterschiedlichen humanen Mammakarzinomen. Mit der Muc3 rt-PCR konnte zusammengefasst unter Verwendung beider Primerpaare bei HT-29 Zellen in 17 von 18 untersuchten Fällen ein Muc3 Transkript gefunden werden. Dabei war der einzige negative Nachweis bei einer rt-PCR mit PP1 aufgetreten. Bei den Brustkrebszellen von MCF-7 konnte in keinem von 2 untersuchten Fällen ein Muc3 Transkript nachgewiesen werden. Das gleiche galt für die Untersuchung von MDA-MB453 Zellen, die ebenso in keinem von 2 Fällen eine Muc3 Transkription zeigten (Tabelle 16; Spalten 2-4).

Die Zelllinien hämatologischer und lymphatischer Malignome waren wiederum U937, K562, HL 60, Raji, Jurkat, TF-1 und Molt-3. Hier wurde für beide Primerpaare (PP1 und PP3) zusammengefasst in den Zellen von K562, der Zelllinie einer chronisch myeloischen Leukämie (CML), in 6 von 6 untersuchten Fällen eine Muc3 Transkription nachgewiesen. Alle weiteren Zelllinien hämatologischer und lymphatischer Erkrankungen zeigten zusammengefasst in keinem von 22 weiteren untersuchten Fällen eine Muc3 Transkription (Tabelle 16; Spalten 5-11).

Die Zelllinien der gesunden humanen Zellen mesenchymalen Ursprungs, Fibroblasten und mesenchymale Stammzellen (MSZ), zeigten ebenfalls in keinem von zusammengefasst 5 untersuchten Fällen eine Muc3 Transkription, weder mit PP1 noch mit PP3 (Tabelle 16; Spalten 12-13).

Zusammenfassend konnte hier für PP1 und PP3 in den Zellen von HT-29 und K562 in mehrfacher Bestätigung ein Muc3 Transkript nachgewiesen werden. Alle weiteren untersuchten Fälle von Zelllinien von hämatologischen und lymphatischen Erkrankungen sowie von den gesunden Zellen mesenchymalen Ursprungs zeigten keine Muc3 Transkription (Tabelle 16). Die Muc3 Transkription wurde hier bei Amplifikaten mit einer Länge von 400 Bp bei PP1 und bei PP3 bei einer Länge von 550 Bp als positiv gewertet. Eine Sequenzanalyse und der daraufhin folgende Sequenzabgleich einzelner PCR-Produkte mit der publizierten Muc3 mRNA konnte eine Homologie der hier amplifizierten Sequenzen nur für circa die Hälfte des Amplifikats bestätigen (siehe oben, Abbildung 9).

Tabelle 16:

Muc3 rt-PCR mit PP1 und PP3 an humanen Zelllinien epithelialer Malignome (Spalten 2-4), hämatologischer und lymphatischer Malignome (Spalten 5-11) und von gesunden Zellen mesenchymalen Ursprungs (Spalten 12-13).

Zell-linien	HT-29	MDA-MB	MCF-7	U-937	K562	HL-60	Raji	Jurkat	TF-1	Molt-3	Fibroblasten	MSZ
PP1-400 Bp	<u>15/16</u>	0/1	0/1	0/3	<u>5/5</u>	0/3	0/3	0/3	0/3	0/1	0/3	0/1
PP3-550 Bp	<u>2/2</u>	0/1	0/1	0/1	<u>1/1</u>	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	--

(positiver Nachweis/untersuchte Fälle insgesamt; unterstrichen sind jeweils abweichende Ergebnisse; --: nicht untersucht.)

3.2 Evaluation einer Muc3 Transkription an klinischen Proben

Es wurden klinische Proben von Patienten mit epithelialen Malignomen, mit hämatologischen und lymphatischen Erkrankungen sowie von gesunden Spendern auf eine Muc3 Transkription untersucht. Bei den klinischen Proben von diesen Patienten handelte es sich um 35 verschiedene Knochenmarkaspirationen, 9 Leukaphereseprodukte und 4 periphere Blutproben.

Knochenmarkproben

Die Transkription von Muc3 konnte mit PP1 in 4 von 23 untersuchten Knochenmarkaspirationen nachgewiesen werden. Ein Muc3 Transkript wurde hier in einem von 3 Fällen von Mammakarzinompatientinnen, in einem von 5 untersuchten Proben von Patienten mit einer CML, in einer von einer Knochenmarkprobe eines Patienten mit AML und in einer von 2 untersuchten Proben von Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS) gefunden. Alle weiteren 19 Knochenmarkproben zeigten mit einer rt-PCR unter Verwendung von PP1 keine Muc3 Transkription.

Die Transkription von Muc3 mit PP3 konnte in keiner von 12 untersuchten Knochenmarkproben nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengestellt.

Tabelle 17:

Muc3 rt-PCR an Knochenmarkspiraten (KM) unter Verwendung von Primerpaar 1 (PP1; Amplikon 400 Bp) und Primerpaar 2 (PP2; Amplikon 550 Bp)

KM	Mammakarzinom	CML	ALL	SAA	OMF	Plasmozytom	AML	MDS	Gesunder Spender
PP1 4/23	<u>1/3</u>	<u>1/5</u>	0/1	0/1	0/1	0/5	<u>1/1</u>	<u>1/2</u>	0/4
PP3 0/12	0/3	0/2	--	--	0/1	0/4	--	--	0/2

(positiver Nachweis/untersuchte Fälle insgesamt; unterstrichen sind jeweils abweichende Ergebnisse; --: nicht untersucht.)

Leukaphereseprodukte – periphere Blutstammzellen

Eine Muc3 Transkription ließ sich unter Verwendung von PP1 in einer von 9 untersuchten Proben von peripheren Blutstammzellen nachweisen. Dieser positive Nachweis trat bei einem von 2 untersuchten Fällen von gesunden Spendern auf. Alle weiteren Leukaphereseprodukte von Patienten mit einer AML, einem Plasmozytom, einem Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) und einem Fibrosarkom zeigten keine Muc3 Transkription. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18:
Muc3 rt-PCR an Leukaphereseprodukten (Lp) unter Verwendung von PP1 (400 Bp).

LP	gesunde Spender	AML	Plasmozytom	NHL	Fibrosarkom
PP1 1/9	<u>1/2</u>	0/3	0/2	0/1	0/1

(positiver Nachweis/untersuchte Fälle insgesamt; unterstrichen sind jeweils abweichende Ergebnisse)

Periphere Blutproben

Von 4 untersuchten peripheren Blutproben konnte in keiner, weder unter Verwendung von PP1 noch mit PP3, eine Muc3 Transkription nachgewiesen werden. Bei allen 4 untersuchten Proben handelte es sich um das periphere Blut von Patientinnen mit einem Mammakarzinom in unterschiedlichen Stadien der Erkrankung. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 19 zusammengestellt.

Tabelle 19:
Muc3 rt-PCR an peripheren Blutproben (pB) mit Primerpaar 1 (PP1; 400 Bp) und Primerpaar 3 (PP3; 550 Bp)

pB	Mammakarzinom
PP1	0/3
PP3	0/1

(positiver Nachweis/untersuchte Fälle insgesamt)

4.0 Evaluation der Induzierbarkeit einer Muc1, Muc2 und Muc3 mRNA durch Zytokine in vitro

Die hier etablierten rt-PCR-Verfahren zum Nachweis einer Muc1, Muc2 und Muc3 Transkription wurden weiterhin eingesetzt, um die Induzierbarkeit dieser Mucin mRNA unter dem Einfluss verschiedener Zytokine zu überprüfen.

Nach dreitägiger Kultivierung von unterschiedlichen Zelllinien, Knochenmarkaspiraten und Leukaphereseprodukten unter Zugabe von rekombinant humanen Zytokinen in jeweils getrennten Kulturflaschen, wurde jede dieser Kulturen auf die Transkription von Muc1, Muc2 und Muc3 untersucht. Bei den verwendeten Zytokinen handelte es sich um das Interleukin-3 (IL-3), das Interleukin-6 (IL-6), den Stammzellfaktor (SCF), das Interleukin-1 β (IL1 β), das Interferon- γ (INF- γ), den Flt-3 Ligand (Flt-3), das Thrombopoietin (Tpo), den Granulozyten-Kolonie Stimulierenden Faktor (G-CSF) und den Granulozyten/Makrophagen-Kolonie Stimulierenden Faktor (GM-CSF).

Insgesamt wurden auf jeweils eine Muc1, Muc2 und Muc3 Transkription, die Zelllinien K562, U937, Fibroblasten, TF-1, Raji und HL-60 nach Inkubation für 3 Tage mit den oben genannten 9 verschiedenen Zytokinen und einmalig ohne die Zugabe eines Zytokins (mit o.WF bezeichnet) im Duplikat untersucht, nachdem die Kultivierung der Zelllinien in zweifacher Ausführung durchgeführt worden war. Eine Ausnahme bildeten hier die Fibroblasten, die auf eine Muc1 Transkription nach Zytokinstimulierung nur einmalig und nicht im Duplikat untersucht wurden. Die klinischen Proben bestanden aus 3 Knochenmarkaspiraten und 5 Leukaphereseprodukten. Bei den 3 verschiedenen klinischen Knochenmarkproben handelte es sich um das Knochenmark eines gesunden Spenders, eines Knochenmarks von einem Patienten mit einer CML und einmal um das Knochenmark eines Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS). Die insgesamt 5 verschiedenen Leukaphereseprodukte aus peripheren Blutstammzellen kamen von einem gesunden Spender, einmal von einem Patienten mit einem Fibrosarkom, einmal von einem Patienten mit einer AML, einmal von einem Patienten mit einem Plasmozytom und einmal von einem Patienten mit einem Non-Hodgkin-Lymphom (NHL).

Somit wurden insgesamt unter Verwendung aller Zytokine die Zellen der Zelllinien in 60 verschiedenen Kulturflaschen, die Knochenmarkproben in 30 verschiedenen Kulturflaschen und die Leukaphereseprodukte in 50 verschiedenen Kulturflaschen bebrütet.

Die Zellen dieser insgesamt 140 verschiedenen Kulturen aus Zelllinien und klinischen Proben unter der Zugabe unterschiedlicher Zytokine wurden allesamt auf eine Muc1 Transkription im nested-Verfahren, auf eine Muc2 Transkription unter Verwendung von Primerpaar 1 und auf eine Muc3 Transkription ebenfalls unter Verwendung des Primerpaares 1 untersucht. Jede ein-

zelle Probe wurde im gleichen Ansatz mit einer Positivkontrolle unter Verwendung des „Housekeeping Gens“ GapdH und einer Negativkontrolle unter Einsatz von H₂O durchgeführt.

4.1 Evaluation der Induzierbarkeit einer Muc1 Transkription

Zelllinien

Die Zellen der Zelllinien zeigten im Hinblick auf eine Muc1 Transkription nach der Inkubation mit den unterschiedlichen Zytokinen bis auf 2 Ausnahmen keine Veränderungen. Diese 2 Ausnahmen bestätigten sich nicht im Duplikat. Das Muc1 Transkript wurde also weiterhin in den hier untersuchten Zelllinien auch nach Inkubation mit den unterschiedlichen Zytokinen exprimiert. Die Ausnahmen in einem von 2 untersuchten Fällen waren der negative Nachweis des Muc1 Transkripts in der Zelllinie U937, die Zelllinie eines histiozytären Lymphoms, nach Inkubation mit SCF und bei der Zelllinie eines NHL, Raji, nach Inkubation mit TPO.

Alle weiteren 48 Untersuchungen zeigten eine unveränderte, konstante Transkription von Muc1. Mit Ausnahme der Fibroblasten konnten diese Ergebnisse im Duplikat bestätigt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20:

Muc1 rt-PCR an Zelllinien, nach Inkubation mit unterschiedlichen Zytokinen (Abkürzungen siehe Text)

Zytokin Zelllinie	o.WF	IL-3	IL-6	SCF	IL-1 β	INF- γ	Flt-3	Tpo	G-CSF	GM-CSF
K562	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
U937	2/2	2/2	2/2	<u>1/2</u>	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
Fibroblasten	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
TF-1	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
Raji	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	<u>1/2</u>	2/2	2/2
HL-60	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2

(positiver Nachweis/untersuchte Fälle insgesamt; unterstrichen sind jeweils abweichende Ergebnisse)

Knochenmark

Bei den Knochenmarkproben, die unter Zugabe der Zytokine bebrütet worden waren, handelte es sich, wie schon erwähnt, um die Knochenmarkspirate eines gesunden Spenders, eines Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) und eines Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS). Die Untersuchung auf eine veränderte Transkription von Muc1 wurde nur zum Teil im Duplikat durchgeführt. Insgesamt konnte hier in keinem von 37 untersuchten Fällen eine veränderte Transkription von Muc1 nach Zugabe der verschiedenen Zytokine nachgewiesen werden. Ein Muc1 Transkript ließ sich also in allen hier untersuchten Knochenmarkproben nachweisen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 21:
Muc1 rt-PCR an Knochenmarkproben (KM) nach Inkubation mit unterschiedlichen Zytokinen (Abkürzungen siehe Text)

Zytokin KM	o.WF	IL-3	IL-6	SCF	IL-1 β	INF- γ	Flt-3	Tpo	G-CSF	GM-CSF
CML	2/2	2/2	2/2	2/2	1/1	1/1	2/2	2/2	1/1	2/2
Gesunde Spender	1/1	2/2	2/2	2/2	2/2	--	1/1	1/1	--	1/1
MDS	1/1	--	1/1	1/1	1/1	1/1	--	1/1	1/1	1/1

(positiver Nachweis/untersuchte Fälle insgesamt; unterstrichen sind jeweils abweichende Ergebnisse; --: nicht untersucht.)

Leukaphereseprodukte – periphere Blutstammzellen

Insgesamt wurden die peripheren Blutstammzellen von 5 verschiedenen Patienten mit den unterschiedlichen Zytokinen inkubiert und daraufhin auf eine Muc1 Transkription untersucht. In allen 37 untersuchten Fällen ließ sich auch nach Inkubation mit den unterschiedlichen Zytokinen weiterhin ein Muc1 Transkript nachweisen. Es kam also auch für die peripheren Blutstammzellen zu keinem veränderten Transkriptionsmuster von Muc1 nach Inkubation mit Zytokinen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22 zusammen gestellt.

Tabelle 22:**Muc1 rt-PCR an Leukaphereseproben (Lp) nach Inkubation mit unterschiedlichen Zytokinen (Abkürzungen siehe Text)**

Zytokin Lp	o.WF	IL-3	IL-6	SCF	IL-1 β	INF- γ	Flt-3	Tpo	G-CSF	GM-CSF
Fibrosarkom	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	--	1/1	1/1	1/1	1/1
AML	1/1	1/1	1/1	--	1/1	1/1	--	1/1	1/1	1/1
Plasmozytom	--	1/1	1/1	1/1	--	1/1	1/1	--	1/1	1/1
gesunde Spender	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	--	1/1	1/1	1/1	1/1
NHL	1/1	1/1	--	--	--	--	1/1	--	--	1/1

(positiver Nachweis/untersuchte Fälle insgesamt; unterstrichen sind jeweils abweichende Ergebnisse; --: nicht untersucht.)

4.2 Evaluation der Induzierbarkeit einer Muc2 Transkription

Zelllinien

In den Zelllinien K562, U937, den Fibroblasten, TF-1, Raji und HL-60 ließ sich auch nach der Inkubation mit den unterschiedlichen Zytokinen kein Muc2 Transkript nachweisen. Im Hinblick auf eine Muc2 Transkription zeigten die untersuchten Zelllinien demnach auch nach der Inkubation mit Zytokinen in keinem von 108 untersuchten Fällen ein verändertes Transkriptionsmuster. Die Ergebnisse sind in Tabelle 23 zusammengestellt.

Tabelle 23:**Muc2 rt-PCR an Zelllinien nach Inkubation mit unterschiedlichen Zytokinen (Abkürzungen siehe Text)**

Zytokin Zelllinie	o.WF	IL-3	IL-6	SCF	IL-1 β	INF- γ	Flt-3	Tpo	G-CSF	GM-CSF
K562	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
U937	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Fibroblasten	0/2	0/1	0/1	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
TF-1	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Raji	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
HL-60	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

(positiver Nachweis/untersuchte Fälle insgesamt; unterstrichen sind jeweils abweichende Ergebnisse; --: nicht untersucht.)

Knochenmark

In den 3 verschiedenen Knochenmarkproben, die hier auf eine Muc2 Transkription nach der Inkubation mit Zytokinen untersucht wurden, zeigte sich ebenfalls in keinem von 37 untersuchten Fällen eine Muc2 Transkription. Somit gilt auch für die hier untersuchten Knochenmarkproben, wie auch schon für die untersuchten Zelllinien, dass sich ein Muc2 Transkript auch nach der Inkubation mit den hier verwendeten Zytokinen nicht induzieren ließ. Die Ergebnisse für die Knochenmarkproben und eine Muc2 Transkription sind in Tabelle 24 zusammengestellt.

Tabelle 24:
Muc2 rt-PCR an Knochenmarkproben (KM) nach Inkubation mit unterschiedlichen Zytokinen (Abkürzungen siehe Text)

Zytokin KM	o.WF	IL-3	IL-6	SCF	IL-1 β	INF- γ	Flt-3	Tpo	G-CSF	GM-CSF
CML	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/1	0/2	0/2	0/1	0/2
gesunde Spender	0/1	0/2	0/2	0/2	0/2	--	0/1	0/1	--	0/1
MDS	0/1	--	0/1	0/1	0/1	0/1	--	0/1	0/1	0/1

(positiver Nachweis/untersuchte Fälle insgesamt; unterstrichen sind jeweils abweichende Ergebnisse; --: nicht untersucht.)

Leukaphereseprodukte – periphere Blutstammzellen

Die 5 verschiedenen Proben mit peripheren Blutstammzellen wurden ebenso auf eine Muc2 Transkription untersucht. Auch in den peripheren Blutstammzellen zeigte sich keine Veränderung der Muc2 Transkription nach der Inkubation mit den verschiedenen Zytokinen. Insgesamt zeigte keine von 37 untersuchten Proben eine Muc2 Transkription. Die Ergebnisse sind in Tabelle 25 zusammengefasst.

Tabelle 25:
Muc2 rt-PCR an Leukaphereseproben (Lp) nach Inkubation mit unterschiedlichen Zytokinen (Abkürzungen siehe Text)

Zytokin Lp	o.WF	IL-3	IL-6	SCF	IL-1 β	INF- γ	Flt-3	Tpo	G-CSF	GM-CSF
Fibrosarkom	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	--	0/1	0/1	0/1	0/1
AML	0/1	0/1	0/1	--	0/1	0/1	--	0/1	0/1	0/1
Plasmozytom	--	0/1	0/1	0/1	--	0/1	0/1	--	0/1	0/1
gesunder Spender	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	--	0/1	0/1	0/1	0/1
NHL	0/1	0/1	--	--	--	--	0/1	--	--	0/1

(positiver Nachweis/untersuchte Fälle insgesamt; unterstrichen sind jeweils abweichende Ergebnisse; --: nicht untersucht.)

4.3 Evaluation der Induzierbarkeit einer Muc3 Transkription

Zelllinien

Bei den hier untersuchten Zelllinien traten im Hinblick auf eine Muc3 Transkription nach der Inkubation mit Zytokinen bei den Zelllinien K562 und U937 Veränderungen auf.

Bei den K562 Zellen, die ohne die Inkubation mit Zytokinen konstant eine Muc3 Transkription zeigten, war nach der Inkubation mit Interleukin-6 kein Muc3 Transkript mehr nachweisbar. Dieses Ergebnis wurde im Duplikat bestätigt. Des Weiteren zeigte sich bei den K562 Kulturen, die mit Interferon- γ (INF- γ), dem Flt-3 Ligand (Flt-3) und Thrombopoietin (Tpo) inkubiert worden waren, das Verschwinden des Muc3 Transkriptes. Diese 3 negativ gewordenen Ergebnisse bestätigten sich jedoch nicht im Duplikat. Alle weiteren K562 Kulturen zeigten eine Muc3 Transkription im Duplikat, so dass die Inkubation mit den restlichen Zytokinen zu keiner Veränderungen im Hinblick auf eine Muc3 Transkription führte.

Die Zellen der Linie U937, eines histiozytären Lymphoms, zeigten ohne die Inkubation mit Zytokinen konstant keine Transkription von Muc3. Allerdings wurde hier nach der Inkubation mit dem Stammzellularfaktor (SCF), mit Flt-3 und G-CSF in Zellen der Linie U937 ein Muc3 Transkript nachgewiesen. Jedoch bestätigten sich die Ergebnisse auch hier in allen 3 Fällen nicht im Duplikat. Die weiteren U937 Kulturen führten zu keiner Veränderung der Muc3 Transkription durch die restlichen Zytokine; das heißt, ein Muc3 Transkript konnte auch nach der Inkubation nicht nachgewiesen werden.

Alle weiteren untersuchten Zelllinien, die Fibroblasten, TF-1 Zellen, Raji- und HL-60- Zellen, zeigten keine Veränderung in der Muc3 Transkription durch die Inkubation mit Zytokinen. In keiner der weiteren untersuchten Kulturen konnte eine Muc3 Transkription nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse konnten im Duplikat bestätigt werden und sind in Tabelle 26 für alle untersuchten Kulturen von Zelllinien zusammengefasst.

Tabelle 26:
Muc3 rt-PCR an Zelllinien nach Inkubation mit unterschiedlichen Zytokinen (Abkürzungen siehe Text)

Zytokin Zelllinie	o.WF	IL-3	IL-6	SCF	IL-1 β	INF- γ	Flt-3	Tpo	G-CSF	GM-CSF
K562	2/2	2/2	<u>0/2</u>	2/2	2/2	<u>1/2</u>	<u>1/2</u>	<u>1/2</u>	2/2	2/2
U937	0/2	0/2	0/2	<u>1/2</u>	0/2	0/2	<u>1/2</u>	0/2	<u>1/2</u>	0/2
Fibroblasten	0/2	0/1	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
TF-1	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
Raji	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
HL-60	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

(positiver Nachweis/untersuchte Fälle insgesamt; unterstrichen sind jeweils abweichende Ergebnisse; --: nicht untersucht.)

Knochenmark

Bei den 3 verschiedenen untersuchten Knochenmarkproben kam es nach Inkubation mit den Zytokinen nur einmal bei einem gesunden Spender und der Inkubation der Knochenmarkprobe mit Interleukin-6 (IL-6) zu einem positiven Nachweis eines Muc3 Transkriptes. Dieses Ergebnis konnte nicht im Duplikat bestätigt werden. Alle weiteren 34 untersuchten Proben zeigten keine Veränderung der Muc3 Transkription nach der Inkubation mit Zytokinen und blieben im Hinblick auf ein Muc3 Transkript negativ. Die Ergebnisse sind in Tabelle 27 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 27:**Muc3 rt-PCR an Knochenmarkproben (KM) nach Inkubation mit unterschiedlichen Zytokinen (Abkürzungen siehe Text)**

Zytokin KM	o.WF	IL-3	IL-6	SCF	IL-1 β	INF- γ	Flt-3	Tpo	G-CSF	GM-CSF
CML	0/2	0/2	0/2	0/2	0/1	0/1	0/2	0/2	0/1	0/2
gesunder Spender	0/1	0/2	<u>1/2</u>	0/1	0/2	--	0/1	0/1	--	0/1
MDS	0/1	--	0/1	0/1	0/1	0/1	--	0/1	0/1	0/1

(positiver Nachweis/untersuchte Fälle insgesamt; unterstrichen sind jeweils abweichende Ergebnisse; --: nicht untersucht.)

Leukaphereseprodukte – periphere Blutstammzellen

Bei den 5 verschiedenen Proben von peripheren Blutstammzellen zeigte sich nach der Inkubation mit den hier verwendeten Zytokinen keine Veränderung im Hinblick auf eine Muc3 Transkription, mit zwei Ausnahmen bei der Probe eines gesunden Spenders. Diese zeigte nach der Inkubation mit Interleukin-1 β (IL-1 β) und nach der Inkubation mit GM-CSF eine Muc3 Transkription. In allen weiteren 35 Kulturen von peripheren Blutstammzellen nach Inkubation mit den unterschiedlichen Zytokinen ließ sich kein Muc3 Transkript nachweisen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 28 zusammengefasst.

Tabelle 28:**Muc3 rt-PCR an Leukaphereseproben (Lp) nach Inkubation mit unterschiedlichen Zytokinen (Abkürzungen siehe Text)**

Zytokin Lp	o.WF	IL-3	IL-6	SCF	IL-1 β	INF- γ	Flt-3	Tpo	G-CSF	GM-CSF
Fibrosarkom	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	--	0/1	0/1	0/1	0/1
AML	0/1	0/1	0/1	--	0/1	0/1	--	0/1	0/1	0/1
Plasmozytom	--	0/1	0/1	0/1	--	0/1	0/1	--	0/1	0/1
gesunder Spender	0/1	0/1	0/1	0/1	<u>1/1</u>	--	0/1	0/1	0/1	<u>1/1</u>
NHL	0/1	0/1	--	--	--	--	0/1	--	--	0/1

(positiver Nachweis/untersuchte Fälle insgesamt; unterstrichen sind jeweils abweichende Ergebnisse; --: nicht untersucht.)

V. Diskussion

1.0 Die Transkription humaner Muzingene in Zellen unterschiedlicher Provenienz

Zur molekulargenetischen Detektion disseminierter Tumorzellen epithelialer Tumoren in hämatopoetischen Geweben müssen die hierfür verwendeten Marker mRNS die Kriterien der Gewebespezifität erfüllen. Die humanen Muzine und ihre Rolle als epitheliale Marker, insbesondere als Marker für epitheliale Malignome, sind ausführlich in der Einleitung besprochen worden. In der hier vorgestellten Arbeit ist der Frage nach der Anwendbarkeit der unterschiedlichen humanen Muzine zum Nachweis disseminierter epithelialer Tumorzellen in hämatopoetischen Geweben nachgegangen worden und fordert grundsätzlich die Erfüllung von zwei prinzipiellen Kriterien. Zum einen muss die verwendete Marker mRNS in den gesuchten Karzinomzellen exprimiert werden, zum anderen darf sie nicht in den Zellen von hämatopoetischem Gewebe, dem Ort der Disseminierung, vorkommen. Diese erforderliche Spezifität eines Markers für epitheliale Gewebe stellt das größte Problem für eine Detektion disseminierter Tumorzellen mit Hilfe von molekulargenetischen Methoden dar.

Die hier evaluierte Transkription der humanen Muzingene, Muc1, Muc2 und Muc3, in Zellen unterschiedlicher Provenienz sollen im Folgenden getrennt diskutiert werden.

2.0 Die Transkription des humanen Muc1 in Zellen unterschiedlicher Provenienz

Wegen der scheinbaren Beschränkung einer Muc1 Expression auf epitheliale Drüsengewebe, wurde das Muc1 schon frühzeitig als spezifischer Marker für epitheliale Gewebe vorgeschlagen [38], [138]. Auf der Suche nach einer Methode um eine Tumorzelldisseminierung frühzeitig, dass heißt im Stadium der minimalen Resterkrankung, diagnostizieren zu können, verwendete man unter anderem auch das Muc1 als Marker zur immunzytochemischen und später auch molekulargenetischen Detektion einer Tumorzelldisseminierung bei epithelialen Tumoren.

Antikörper gegen Muc1 (2E11-, Anti-TAG12-, BM-2- und Anti-EMA- Antikörper) konnten erfolgreich zur immunzytochemischen Detektion von Mammakarzinomzellen in Knochenmarkproben verwendet werden [104], [25]. Auch fand man heraus, dass sich die immunzytochemische Tumorzell-detektion im Knochenmark über das Muc1 Protein als guter Vorhersageparameter für eine spätere Rezidivierung der Erkrankung eignet ($p < 0,0005$, Cox Regressionsanalyse) [25]. Darüber hinaus konnte eine Korrelation zwischen einer Tumorzell-detektion im Knochenmark und den Prognoseparametern, wie dem Nodalstatus ($p < 0,0001$), dem Tumor Grading ($p = 0,002$) und dem T-Status ($p < 0,0001$), bei Mammakarzinompatientinnen gefunden werden [25].

Veröffentlichungen von Noguchi et al. aus den Jahren 1994 und 1996 zeigten, dass die molekulargenetische Detektion disseminierter Mammakarzinomzellen mittels Muc1 rt-PCR gegenüber der Immunzytochemie (hier über den SM-3 Antikörper gegen PEM) das sensitivere Verfahren darstellt und demonstrierten die Muc1 rt-PCR als sensitives und spezifisches Verfahren zur Detektion von disseminierten Mammakarzinomzellen in Lymphknotengewebe [94], [96].

Diese Untersuchungen konnten allesamt keine Expression oder Transkription von Muc1 in ihren Kontrollproben finden und erklärten das Muc1 folglich als spezifischen Marker zur Detektion von disseminierten Mammakarzinomzellen (Redding et al. 1983, [104]: 36 negative Knochenmarkproben von Patienten ohne maligne Erkrankung; Diel et al. 1992, [25]: 21 negative Knochenmarkproben von Patienten mit benignen Erkrankungen; Noguchi et al. 1994, [94]: 15 negative Lymphknoten von Patienten mit benignen Erkrankungen).

Dem entgegen stehen jedoch Veröffentlichungen, die eine Expression von Muc1 nicht nur in epithelialen Neoplasien, sondern auch in nicht-epithelialen und hämatologischen Geweben nachgewiesen haben [4], [24], [17], [135], [136].

Berois et al. fanden mittels der Muc1 rt-PCR, die nach den Angaben von Noguchi et al. das Muc1 amplifizierte, in 12 von 20 Fällen eine Muc1 Transkription in peripheren Blutproben von gesunden Spendern [4]. Dent et al. fanden eine Muc1 Transkription mit einem eigenem rt-PCR Verfahren für Muc1 in klinischen Proben von 4 gesunden Spendern. In allen 4 Fällen konnte eine Muc1 Transkription jeweils in peripherem Blut, Knochenmark und Lymphknotengewebe nachgewiesen werden [24]. Corradini et al. fanden eine Muc1 Transkription mittels eigener Muc1 rt-PCR, allerdings im nested-Verfahren, in 5 von 11 Fällen (45%) bei gesunden Knochenmarkproben, in 1 von 2 (50%) untersuchten Proben von peripheren Blutstammzellen gesunder Spender und in 12 von 12 Fällen (100%) in peripheren Blutstammzellen von Patienten mit hämatologischen Malignomen [17]. Die Transkription von Muc1 in Knochenmarkproben von gesunden Spendern und Patienten mit hämatologischen und lymphatischen Malignomen (Multiples Myelom, NHL und CML) konnten durch Zhong et al., ebenfalls in einem nested Muc1 rt-PCR Verfahren und über den immunzytochemischen Nachweis mit BM-2 und BM-7 Antikörpern gegen Muc1 Protein, bestätigt werden [135], [136].

Diese Untersuchungen zeigen, dass die Expression von Muc1 nicht auf epitheliale Gewebe limitiert ist. Eine spezifische Detektion von disseminierten Tumorzellen epithelialer Malignome über Muc1 muss daher, wegen ubiquitärer Transkription dieses Markers auch in hämatopoetischen Geweben, für nicht zulässig erklärt werden.

Zu dieser Schlussfolgerung muss man auch aufgrund der im Rahmen dieser Untersuchung gefundenen Ergebnisse für eine Transkription von Muc1 in Zellen unterschiedlicher Provenienz

kommen. In 35 von 35 Fällen (100%) von 12 verschiedenen Zelllinien, in 21 von 24 (87,5%) Knochenmarkaspiraten, in 9 von 9 Proben (100%) von peripheren Blutstammzellen und in 2 von 4 Proben (50%) von peripherem Blut konnte eine Muc1 Transkription nachgewiesen werden. Dabei wurde eine Muc1 Transkription sowohl in Zellen epithelialer Malignome, als auch in Zellen von hämatologischen Malignomen der lymphatischen und myeloischen Reihe sowie in Zellen gesunden mesenchymalen Ursprungs nachgewiesen.

Da Muc1 daher sowohl in Zellen benigner und maligner Gewebe, als auch in Zellen epithelialen und mesenchymalen Ursprungs transkribiert wird, muss auch aufgrund der hier gefundenen Ergebnisse geschlussfolgert werden, dass sich eine Muc1 Transkription nicht zum Nachweis von disseminierten epithelialen Tumorzellen in hämatopoetischen Materialien eignet. Die anhand der Zelllinien gefundenen Ergebnisse konnten durch die Evaluation der klinischen Proben bestätigt werden. Unter Einsatz von auch zellulärer DNS konnte gezeigt werden, dass die akzidentelle Transkription genomischer DNS ausgeschlossen war. Ferner konnte erstmals durch die Sequenzanalyse von Muc1 Amplifikaten, was die anderen Untersuchungen nicht vollzogen haben, die Identität der hier amplifizierten Muc1 Transkripte eindeutig bestätigt werden.

Durch die nachgewiesene Identität des Muc1 Transkriptes in dieser Untersuchung ist abschließend davon auszugehen, dass zumindest über den Nachweis auf Ebene der mRNA, Muc1 wegen ubiquitärer Transkription und damit mangelnder Gewebespezifität nicht zum Nachweis disseminierter epithelialer Tumorzellen geeignet ist.

Brugger et al. fanden eine Expression von Muc1 mittels immunzytochemischen Nachweis in 2-10% von mononukleären Knochenmarkzellen gesunder Individuen [8]. De Cremoux et al. konnten über eine Muc1 rt-PCR im Taqman Verfahren nachweisen, dass bei der Untersuchung von peripherem Blut gesunder Probanden eine Muc1 Transkription konstant erst oberhalb einer Grenze von 38 Amplifizierungszyklen auftrat [22]. Die Frage, ob es sich bei der hier gefundenen ubiquitären Transkription von Muc1 in Zellen hämatopoetischen Ursprungs, sowohl gesunder Spender als auch bei hämatologischen Malignomen, um ein reines Hintergrundphänomen handelt, kann mit der im Rahmen dieser Untersuchung verwendeten Muc1 rt-PCR, welche ein rein qualitatives Verfahren darstellt, abschließend nicht geklärt werden.

Im Gegensatz zu der Muc1 rt-PCR von Noguchi et al., die nicht im nested-Verfahren mit einmal 35 Amplifizierungszyklen etabliert worden ist [94], [96], ist die hier vorgestellte Muc1 rt-PCR im nested-Verfahren mit zweimal 30 Amplifizierungszyklen etabliert worden. Diese 60 Amplifizierungszyklen könnten dazu geführt haben, dass im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchung eine ubiquitäre Transkription von Muc1 gefunden worden ist (78,5-100% in Knochenmark- und Leukaphereseproben gesunder Spender und in nicht-malignen Zelllinien mesen-

chymalen Ursprungs). Diese Aussage lässt sich auf Publikationen von Smith et al. und Schoenfeld et al. beziehen, die zeigen konnten, dass mit steigender Anzahl an Amplifizierungszyklen auch die Positivitätsrate bei Kontrollpatienten ansteigt [116], [112].

In einer Korrespondenz zwischen Hoon et al. und Noguchi et al., die im Jahre 1995 veröffentlicht wurde, erklären Noguchi et al. auch tatsächlich, dass bei der Verwendung ihrer Muc1 rt-PCR im nested-Verfahren alle Kontrollproben eine Muc1 Transkription zeigten und sie das nested-Verfahren wegen der Vermutung einer niedrigen Hintergrundtranskription von Muc1 darum wieder verlassen haben [59], [95]. Laut dieser Autoren ist die klinische Anwendbarkeit einer Methode von entscheidender Bedeutung, die sie aufgrund ihrer Untersuchungen als bestätigt ansehen [94], [96], und nicht das Erreichen einer höchst möglichen Sensitivität [59], [95].

Dagegen muss jedoch betont werden, dass auch schon bei dem Auftreten von Hintergrundphänomenen die Kriterien der Spezifität eines Marker zum Tumorzellnachweis nicht mehr erfüllt sind und es darf als nicht zulässig angesehen werden, die Sensitivität einer Methode soweit abzusenken, bis sie die gewünschte Spezifität erreicht. Ergebnisse, die nicht unter Ausnutzung der größtmöglichen Sensitivität einer Methode gefunden worden sind [112], [116], [59], [94], [95], [96], müssen als eingeschränkt verwertbar gelten, auch wenn sich klinisch eine prognostische Bedeutung der auf diese Weise detektierten Tumorzellen finden lässt.

Allerdings würde eine eindeutige Differenzierung eines Hintergrundphänomens von regulärer Transkription eine Perspektive eröffnen die Muc1 mRNA doch noch als Marker zur Detektion disseminierter Tumorzellen in den klinischen Gebrauch einzuführen. Dieses könnte sich durch die Anwendung der quantitativen Analyse einer Muc1 Transkription in Zellen unterschiedlicher Provenienz mit einer Muc1 rt-PCR im Taqman Verfahren verwirklichen lassen, vorausgesetzt, es lässt sich eine Amplifizierungsgrenze finden, die zwischen der Transkription von Muc1 in Tumorzellen, von der man vermutet das sie höher angesiedelt ist, und der niedrigeren Hintergrundtranskription in hämatopoetischen Geweben differenzieren kann. Dies ist von De Creoux et al. in Ansätzen schon verwirklicht worden und die Ergebnisse deuten auf eine potentielle Verwirklichung dieses Ansatzes hin [22]. Ausführliche, systematische Untersuchungen, eine Standardisierung der Verfahren und eine klinisch prognostische Bedeutung einer auf diese Weise gefundenen Tumorzelldisseminierung müssten die Anwendbarkeit eines solchen Verfahrens erst noch bestätigen.

Ein weiterer Aspekt bleibt die Frage nach der Anwendbarkeit des Muc1 als antigenetisches Ziel einer Immuntherapie von epithelialen Malignomen und, wie auch derzeitiger Gegenstand von Untersuchungen, für das maligne Myelom [67], [70], [121], [10]. Grundsätzlich muss im Hin-

blick auf die im Rahmen dieser Untersuchung bestätigte ubiquitäre Transkription davon ausgegangen werden, dass die translatierte Form der Muc1 mRNA, das Muc1 Protein, kein geeignetes Zielantigen für eine Immuntherapie von Malignomen darstellt. Jedoch konnte immunzytochemisch nachgewiesen werden, dass sich die Antigenität von Muc1 im Verlauf der Transformation zum Malignom verändern kann und zwar dahingehend, dass das vorher im gesunden Gewebe durch hochgradige Glykosilierungen maskierte Coreprotein von Muc1, auf malignen Zellen durch veränderte Glykosilierungsformen demaskiert sein kann [121], [56], [44], [9]. Es gibt Forschungsansätze, die versuchen sich dieses demaskierte Coreprotein von Muc1 als antigenetische Zielstruktur zur spezifischen Tumorthherapie zu Nutze zu machen [70], [121] und es könnte dann auch zur spezifischen, immunzytochemischen Tumorzelldetektion Verwendung finden. Weiterhin unklar bleibt, wie das Problem des sekretorischen Muc1 Proteins [13] in der Immuntherapie gelöst werden kann, wobei in Bezug auf einen immunzytochemischen Tumorzellnachweis zu bemerken ist, dass eine ektopische Expression von Muc1 auch auf sekretorisches und zirkulierendes Muc1 Protein zurückzuführen sein könnte.

Abschließend sei nochmals zusammengefasst, dass der Nachweis einer Muc1 Transkription sich nicht zum Nachweis einer Tumorzell dissemination epithelialer Tumorzellen in hämatopoetischen Materialien eignet und zwar wegen ubiquitärer Transkription und daher fehlender Gewebespezifität der Muc1 mRNA für Zellen epithelialen Ursprungs.

2.1 Stabilität der Muc1 Transkription nach der in vitro Stimulation mit unterschiedlichen Zytokinen

Reddy et al. zeigten in einer Untersuchung aus dem Jahre 2003 in einem semi-quantitativen rt-PCR-Verfahren, dass es unter dem Einfluss von $\text{INF-}\gamma$ in hämatopoetischen und epithelialen Tumorzelllinien zu einer mehrfach gesteigerten Transkription der Muc1 mRNA kommt [105]. Treon et al. konnten durchflusszytometrisch und im Western Blot-Verfahren zeigen, dass Dexamethason die Muc1 Expression auf Tumorzelllinien von Multiplen Myelomen steigert [121]. Grunberg et al. demonstrierten, dass $\text{INF-}\gamma$ phenotypisch zu einer gesteigerten Muc1 Expression in humanen Mammakarzinomzellen führt [45].

Dem gegenüber stehen die hier gefundenen Ergebnisse, die auch nach der Inkubation mit unterschiedlichen Zytokinen in einem in vitro Kulturmodell keine Veränderung des Transkriptionsmusters von Muc1 in Zelllinien, Knochenmarkproben und Proben von peripheren Blutstammzellen zeigten. Der Einfluss von biologischen Interferenzen auf das Transkriptionsmuster, wie

er von Jung et al. für das CK-19 und das CEA dargestellt worden ist, lässt sich für die Muc1 mRNA nicht bestätigen [63]. Da es sich hier allerdings um ein rein qualitatives Verfahren handelt, bleibt die Frage offen, ob es eventuell zu einer gesteigerten Transkription durch die hier verwendeten Zytokine gekommen ist, wie es von Reddy et al. demonstriert werden konnte [105]. Jedoch sei zu bemerken, dass durch die Anwendung der hoch sensitiven Muc1 rt-PCR (nested-Verfahren mit 60 Amplifizierungszyklen) sich eine Steigerung in der Transkriptionsrate, wie von Reddy et al. berichtet um das 10,6fache bei HL-60 Zellen nach der Inkubation mit INF- γ , auch hier in Form von stärkeren Amplifizierungsbanden hätte zeigen müssen. Dies war jedoch nicht der Fall. Auf der anderen Seite kann durch die Untersuchung von Reddy et al. bestätigt werden, dass nach der Inkubation mit INF- γ auch weiterhin in allen untersuchten Zelllinien, die zu einem großen Teil mit denen im Rahmen dieser Untersuchung verwendeten Zelllinien identisch waren, ein Muc1 Transkript nachgewiesen werden konnte [105]. Da die Muc1 mRNA als stabiles Transkript in den hier untersuchten Proben auch nach der Inkubation mit 9 verschiedenen Zytokinen in einem in vitro Kulturmodell ubiquitär exprimiert wurde, wird deutlich, dass eine ubiquitäre Muc1 Transkription in Zellen unterschiedlicher Provenienz mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf biologische Interferenzen in vivo zurückzuführen ist.

3.0 Die Transkription des humanen Muc2 in Zellen unterschiedlicher Provenienz

Das intestinale Muzin Muc2 ist in den einleitenden Kapiteln schon mit seinem Expressionsmuster unter anderem in den gesunden Becherzellen des Dünn- und Dickdarms erwähnt worden [39]. Diese Muc2 Expression konnte auch in unterschiedlichen Expressionsleveln in Karzinomen des Kolorektums gefunden werden [97], [5], [56].

Hollingsworth et al. wiesen mittels Northern Blot-Analyse die Expression von Muc2 mRNA in 6 von 6 verschiedenen Tumorzelllinien des Kolons nach, unter anderem auch in HT-29 Zellen [58]. Eine konstante Expression von Muc2 mRNA in karzinomatösen Tumorzelllinien des Kolons konnte von Cho et al. ebenfalls mittels Northern Blotting bestätigt werden. Eine Expression in Gewebeproben von Kolonkarzinomen wurde immunhistochemisch bestätigt [15].

Dagegen fanden Sylvester et al. über die in situ Hybridisierung eine Expression der Muc2 mRNA nur in 5 von 27 Fällen in nicht-muzinösen kolorektalen Adenokarzinomen und in 4 von 9 Fällen in Gewebeproben von muzinösen kolorektalen Karzinomen. Die Untersuchung von 25 gesunden kolorektalen Gewebeproben zeigte die Expression der Muc2 mRNA in allen untersuchten Fällen [118].

Bernini et al. gingen der Frage nach, ob sich die Muc2 mRNA als Marker zur Detektion einer okkulten Tumorzell dissemination bei kolorektalen Karzinomen eigne und beurteilten eine von ihnen etablierte Muc2 nested rt-PCR als sensitives und spezifisches Verfahren zur Detektion einer Tumorzell dissemination in Lymphknotengewebe. Diese Arbeitsgruppe fand eine Muc2 Transkription in 42 von 43 untersuchten Primärtumoren (98,1%). Mit steigendem T-Status (T_{is} bis T_4) wurde eine Muc2 Transkription auch mit steigendem Prozentsatz in untersuchtem Lymphknotengewebe gefunden (T_{is}/T_1 : 0%; T_2 : 16,2%; T_3 : 40%; T_4 : 50%). Bei den Kontrolllymphknoten von Patienten mit nicht-malignen Darmerkrankungen konnte mit dieser nested Muc2 rt-PCR (2x 35 Amplifizierungszyklen) kein Muc2 Transkript nachgewiesen werden, so dass man schlussfolgerte, eine Muc2 rt-PCR als spezifisches Verfahren zur Detektion einer Tumorzell dissemination bei kolorektalen Karzinomen anwenden zu können [3].

Zu diesem Ergebnis muss man auch aufgrund der hier vorgestellten Untersuchung einer Muc2 Transkription in Zellen unterschiedlicher Provenienz kommen, die eine Spezifität der Muc2 Transkription für epitheliale Gewebe erkennen lässt.

Unter Anwendung von 2 verschiedenen Primerpaaren (PP1 und PP3) konnte in den untersuchten Zelllinien von hämatologischen und lymphatischen Malignomen sowie in Zelllinien gesunden mesenchymalen Ursprungs, in keinem Fall eine Muc2 Transkription, weder mit PP1 noch mit PP3 nachgewiesen werden. Die Tumorzelllinien von epithelialen Malignomen (HT-29, MCF-7 und MDA-MB453) zeigten hingegen unterschiedliche Ergebnisse, wobei die Zelllinie eines gut differenzierten Adenokarzinoms des Kolons, HT-29, konstant eine Transkription von Muc2 zeigte (in 16 von 16 Fällen). Im Falle der Tumorzelllinien von Mammakarzinomen, MCF-7 und MDA-MB453, konnte für letztere in keinem Fall (0/2) und für MCF-7 in einem von 2 Fällen (1/2) eine sehr schwache Transkription von Muc2 und zwar mit PP1 nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse deutet sich an, dass eine Muc2 Transkription auf Gewebe epithelialen Ursprungs limitiert ist. In 23 verschiedenen Knochenmarkaspiraten, in 10 verschiedenen Proben von peripheren Blutstammzellen und in 7 verschiedenen Proben von peripherem Blut, ließ sich in keinem Fall ein Muc2 Transkript finden, so dass die Untersuchung von hämatopoetischen Materialien eine Limitierung der Muc2 Transkription auf Gewebe epithelialen Ursprungs bestätigt. Die akzidentelle Amplifikation von genomischer DNA war ausgeschlossen worden und die Identität der Amplifikate konnte durch eine Sequenzanalyse, die eine Homologie mit der Muc2 mRNA zeigte, bestätigt werden.

Zusammenfassend ist damit zu sagen, dass die hier gefundenen Ergebnisse erstmals die Perspektive eröffnen, ein Muc2 Transkript als spezifischen Marker zur Detektion einer okkulten Tumorzell dissemination von Muc2 positiven epithelialen Malignomen in hämatopoetischen Geweben einsetzen zu können.

Gegenstand der Untersuchungen zur Detektion einer Tumorzell dissemination bei kolorektalen Karzinomen waren bisher die mRNS des CEA und des CK-20 als Marker [130], [132]. Jedoch kam es bei der Untersuchung von peripheren Blutproben von gesunden Probanden zu einem positiven Nachweis sowohl von CEA als auch von CK-20 mRNS [130], so dass nach der hier vorliegenden Untersuchung, diese beiden Marker gegenüber der Muc2 mRNS hinsichtlich der Spezifität für epitheliale Gewebe als unterlegen in der Detektion disseminierter Tumorzellen von Kolonkarzinomen in hämatopoetischen Materialien angesehen werden müssen.

Hanski et al. kommen in ihrer 1997 veröffentlichten Untersuchung zu dem Ergebnis, dass eine Muc2 Expression kennzeichnend bei muzinösen Karzinomen, nicht nur des Kolorektums, sondern auch bei Mamma-, Pancreas- und ovariellen Karzinomen, zu finden ist. Sie fanden eine Muc2 Expression immunzytochemisch in allen untersuchten muzinösen kolorektalen Karzinomen und nur in 47% der Fälle bei nicht-muzinösen Karzinomen des Kolorektums. Bei der Untersuchung von muzinösen und nicht-muzinösen Karzinomen der Brustdrüse konnte immunzytochemisch und mittels rt-PCR in den nicht-muzinösen Gewebeproben keine Muc2 Expression und in muzinösen Karzinomen der Brustdrüse eine Expression in allen untersuchten Fällen nachgewiesen werden. Die dargestellte Überexpression von Muc2 in muzinösen Karzinomen deuten die Autoren als einen möglichen Hinweis für eine allgemeine genetische Läsion, welche mit einem muzinösen Phänotyp assoziiert ist [48]. Diese Annahme kann, wenn auch nur in geringster Probenzahl, durch die hier gefundenen Ergebnisse nicht unterstützt werden. Es konnte, wenn auch nur einmalig und in schwacher Ausprägung, ein Muc2 Transkript in der Tumorzelllinie eines Adenokarzinoms der Brustdrüse (MCF-7) nachgewiesen werden. In den Angaben der Hersteller dieser Tumorzelllinie lässt sich kein Hinweis für muzinöse Anteile dieses Adenokarzinoms finden, so dass dieses Ergebnis den Aussagen von Hanski et al., die eine Beschränkung der Muc2 Transkription auf muzinöse Karzinome der Brustdrüse vermuten, widerspricht.

Grundsätzlich muss anhand der hier gefundenen Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass ein Muc2 Transkript sich als spezifischer Marker zur Tumorzell detektion von Muc2 positiven epithelialen Malignomen, insbesondere für Karzinome des Kolorektums, in hämatopoetischen Materialien eignet. Fraglich ist, ob dieses Ergebnis mit einem sensitiveren PCR-Design (hier nicht-nested-Verfahren und 30 Amplifizierungszyklen), also im nested-Verfahren und mit höherer Zykluszahl, bestätigt werden kann. Die schon erwähnte Untersuchung von Bernini et al. unterstützt jedoch diese Annahme, denn diese Arbeitsgruppe konnte auch nach 70 Amplifizierungszyklen keine illegitime Transkription von Muc2, wenn auch nur in Lymphknotengewebe, finden [3]. Darüber hinaus bleibt die Frage offen, da Muc2 auch in gesunden epithelialen Zellen des Kolons exprimiert wird, wie stark die Spezifität dieses Markers durch gesunde zirkulierende Zellen, insbesondere im postoperativen Intervall, eingeschränkt werden kann. Auch

bleibt zu bedenken, dass es im Verlaufe einer Tumorerkrankung zu einer Veränderung des genetischen Musters in einzelnen Tumorzellen kommen kann, so dass sich Tumorzellen mit aberrantem Transkriptionsmuster dem molekulargenetischen Nachweis einer Tumorzell dissemination entziehen können. Auf dieses Problem machten auch schon Henttu et al. bei der Evaluation der PSA mRNA als Marker für disseminierte Prostatakarzinomzellen aufmerksam [52].

Letztendlich wäre der nächste Schritt für die Evaluierung dieses Markers, die Untersuchung von verschiedenen karzinomatösen Gewebeproben und korrespondierenden hämatopoetischen Materialien von Patienten mit Kolonkarzinomen. Eine sich anschließende Langzeituntersuchung, die eine eventuelle prognostische Bedeutung einer Tumorzell detektion in peripherem Blut, Knochenmark und peripheren Blutstammzellen über die Muc2 mRNA aufdecken könnte, müsste folgen. Die hier vorgestellte Untersuchung, im Einklang mit den Studien von Hollingsworth et al., Cho et al. und Bernini et al., liefert mit ihren Ergebnissen eine gute Vorarbeit für die Realisierung einer spezifischen Detektion von disseminierten Tumorzellen in hämatopoetischen Materialien bei kolorektalen Karzinomen über den Nachweis eines Muc2 Transkriptes [58], [15], [3]. Die frühzeitige Identifikation von Patienten, die ein höheres Risiko für ein Rezidivieren der Erkrankung innehaben, würde dann die Möglichkeit eröffnen durch eine rechtzeitige Therapieanpassung die Prognose dieser Hochrisikogruppe entscheidend zu verbessern.

3.1 Stabilität der Muc2 Transkription nach der in vitro Stimulation mit unterschiedlichen Zytokinen

Die schon erwähnte nachgewiesene Induktion einer Transkription von CEA und CK-19 mRNA aufgrund von biologischen Interferenzen, wie zum Beispiel durch Entzündungsreaktionen, konnte für die Transkription von Muc2 nicht bestätigt werden [63]. In 172 untersuchten Zellkulturen kam es auch nach der Inkubation mit den unterschiedlichen Zytokinen zu keiner Veränderung des Muc2 Transkriptionsmusters, so dass anhand dieser Ergebnisse geschlussfolgert werden muss, dass die Muc2 mRNA einen stabilen Marker darstellt und die Transkription von Muc2 mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf biologische Interferenzen zurückzuführen ist. Diese Aussage gilt selbstverständlich unter dem Vorbehalt, dass dieses Resultat in einem in vitro Kulturmodell gewonnen wurde, welches nicht ohne weiteres mit den in vivo vorherrschenden Bedingungen gleichzusetzen ist.

Darüber hinaus zeigten verschiedene Untersuchungen, dass unter dem Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen ein verändertes Glykosilierungsmuster [68], [75] und eine verstärkte Expression von Muc2 mRNA nachzuweisen ist [30]. Lamblin et al. wiesen die Induktion einer

phänotypisch veränderte Muzinexpression durch TNF- α in Epithelien der Luftwege nach [75]. Kim et al. zeigten ebenfalls an epithelialen Zellen der Luftwege eine Hochregulierung der Muc2 Genexpression und Sekretion durch das proinflammatorische Zytokin IL-1 β [67]. Enss et al. demonstrierten anhand einer intestinalen Tumorzelllinie (LS180), dass es unter dem Einfluss von IL-1 zu einer transienten Stimulierung einer Muc2 mRNA, unter dem Einfluss von IL-6 zu einer frühen und unter Einfluss von TNF- α zu einer kurzzeitigen transienten Hochregulierung der Muc2 mRNA kommen kann. Fazit dieser Untersuchung war, dass die Muzinsynthese, -sekretion und -komposition durch unterschiedliche Zytokine ausgelöst werden kann und diese Veränderungen für eine defiziente Mukusschicht bei Kolitiden verantwortlich sein könnten [30]. Grundsätzlich widersprechen diese Ergebnisse jedoch nicht den hier gefundenen Resultaten. Zwar zeigen die hier zitierten Studien die Interaktion der Muzinexpression mit verschiedenen Parametern einer Entzündungsreaktion, jedoch ist ein de Novo Muc2 Transkript unter dem Einfluss von Zytokinen nicht dokumentiert worden und konnte auch in der hier vorgestellten Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Darum lässt sich hier im Einklang mit der bisher publizierten Literatur abschließend sagen, dass eine Transkription von Muc2 nicht auf biologische Interferenzen zurückzuführen ist, sondern, dass verschiedene Botenstoffe einer Entzündungsreaktion nur eine verstärkte Transkription und Expression dieses Markers hervorbringen können. Diese Tatsache bedeutet jedoch keine Limitierung für den Nachweis einer Tumorzell-disseminierung, sondern eröffnet die Perspektive durch eine hoch regulierte Transkription und Expression, so lange sie nicht de Novo auftritt, die Detektionswahrscheinlichkeit von Muc2 positiven Karzinomzellen erhöhen zu können.

4.0 Die Transkription des humanen Muc3 in Zellen unterschiedlicher Provenienz

Auch für das intestinale Muzin Muc3 konnte eine Expression in der Mukosa von gesunden Dün- und Dickdarmepithelien [39], in Karzinomen des Kolorektums [56], [58] sowie in intestinalen Metaplasien und Adenokarzinomen des Magens nachgewiesen werden [56].

Wang et al. fanden immunzytochemisch eine Expression von Muc3 in kanzerösem Gewebe des Magens und zwar vermehrt bei Patienten mit einer nachgewiesenen Lymphknotenmetastasierung ($p < 0,01$), einer Invasion der Serosa ($p < 0,05$) und in den klinischen Stadien III-IV ($p < 0,05$). Laut dieser Untersuchung stand das Auftreten der Muc3 Expression in Zusammenhang mit einer neoplastischen Transformation der Magenmukosa und eröffnete die Perspektive eine Muc3 Expression möglicherweise zum signifikanten Nachweis für eine schlechtere Prognose bei Magenkarzinomen verwenden zu können [129].

Die Evaluation der Transkription des humanen Muc3 in Zellen unterschiedlicher Provenienz zeigte in der hier durchgeführten Untersuchung zwei formelle Einschränkungen, die eine Verwertbarkeit der gefundenen Resultate grundsätzlich in Frage stellen. Zum einen lieferten die beiden eingesetzten Primerpaare (PP1 und PP3), trotz intronübergreifender und computergestützter Generierung, konstant Amplifikate mit zirka 100 zusätzlichen Basenpaaren, zum anderen ergab eine Sequenzanalyse dieser Amplifikate nur für die letzte Hälfte des Amplifikationsproduktes eine Homologie mit der Sequenz der Muc3 mRNA. Damit muss die hier etablierte Muc3 rt-PCR sowohl unter Verwendung von PP1 als auch unter Verwendung von PP3 als eingeschränkt verwertbar zum Nachweis einer Muc3 Transkription angesehen werden. Es kann vermutet werden, dass diese Gegebenheiten aufgrund von alternativen Splicevorgängen der Muc3 mRNA auftreten und zwar wegen der durchgängig längeren Amplifikate mit dennoch konstanter Basenpaarlänge und dem Ergebnis in der Sequenzanalyse, die eine Identität der Muc3 Amplifikate zur Hälfte bestätigte.

Auch Crawley et al. fanden Hinweise für ein alternatives Splicing des Muc3 Gens und zwar zum einen zu einer membrangebundenen Form des Muc3 Proteins und zum anderen zu einer löslichen Form von Muc3 Protein. Diese Arbeitsgruppe geht von einem Muc3 Gen aus, das in 2 verschiedenen Formen translatiert werden kann [19]. Diese Annahme wird durch eine Untersuchung von Williams et al. unterstützt, die mit einer rt-PCR für Muc3 ebenfalls 2 verschiedene, ein kurzes und ein langes PCR-Produkt gefunden haben und diese Tatsache ebenfalls auf alternatives Splicing des Muc3 Gens zu einem transmembranösen und nicht-transmembranösen Muc3 Protein zurückführen. Die genauen Mechanismen konnten auch hier nicht geklärt werden [133].

Pratt et al. berichten von einer so genannten „Transkriptionsheterogenität“ für das Muc3 Gen. Sie fanden für jedes untersuchte Individuum drei verschiedene Muc3 Transkripte und führen dieses Ergebnis auf eine zweite Kopie des Muc3 Gens und einen Austausch von Allelen („allelic change“) zurück. Es gelang die Sequenzierung dieses zweiten Muc3 Gens. Dabei fand man in den Exonabschnitten eine 94-100%ige Identität auf Ebene der Nukleotide und damit auch nur eine geringe Abweichung der Aminosäuresequenzen. Die Intronabschnitte zeigten auf Nukleotidebene eine ungefähr 95%ige Identität. Diese Arbeitsgruppe schlägt eine neue Nomenklatur vor, und zwar Muc3A für das alte Muc3 Gen und Muc3B für das neue, hier identifizierte Muc3 Gen [103].

Es ist also davon auszugehen, dass für das Muc3 tatsächlich eine „Transkriptionsheterogenität“ besteht. Die Mechanismen, die ein jeweiliges Transkript induzieren sind noch nicht geklärt und auch ihre Bedeutung kann bislang nur vermutet werden. Fraglich ist, warum im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchung nur Transkripte mit einer einzigen konstanten Länge bei dem

jeweiligen Primerpaar aufgetreten sind, wenn es sich tatsächlich um eine alternative Splicevariante der Muc3 mRNA handelt. Die Ursachen können nicht abschließend bewertet werden, denn es kann von Anfang bis Ende der Untersuchung eine Vielzahl von Parametern die Expression nur einer Form der Muc3 mRNA herbeigeführt haben. Um nur einige mögliche Einflussgrößen zu nennen, kann die Ursache in der Zellbearbeitung und Kultivierung, bei der RNA Isolierung oder auf die individuelle Primersequenz zurückzuführen sein.

Mit dem Wissen, dass die hier evaluierte Transkription in Zellen unterschiedlich Provenienz nur unter Vorbehalt zu verwehrt ist, soll dennoch kurz darauf eingegangen werden.

In den untersuchten Zelllinien konnte mit beiden Primerpaaren (PP1 und PP3) in 17 von 18 untersuchten Fällen eine Muc3 Transkription in den Zellen von HT-29, die Tumorzelllinie eines Adenokarzinoms des Kolons, gefunden werden. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Williams et al., die ebenfalls in 9 von 10 Fällen ein Muc3 Transkript mittels rt-PCR in Zelllinien von kolorektalen Karzinomen nachweisen konnten und wie schon erwähnt, hier 2 verschieden lange PCR-Produkte fanden [133]. Pratt et al. konnten in Zellen des Intestinums und in einer Tumorzelllinie des Kolons, Caco-2, die Expression von Muc3A und Muc3B nachweisen [103]. Somit ist davon auszugehen, dass es in karzinomatösen Zellen des Kolons zur Expression der Muc3 mRNA kommt, was durch die hier gefundenen Ergebnisse bestätigt werden kann.

Allerdings konnte auch im Rahmen dieser Untersuchung in der Zelllinie einer CML, K562, in 6 von 6 untersuchten Fällen eine Muc3 Transkription gefunden werden. Diese illegitime Transkription macht das Muc3 somit als Marker für epitheliale Gewebe unbrauchbar. Bemerkenswert ist hierbei jedoch eine Untersuchung von Järvinen et al., die epitheliale Anteile, wie Zytokeratine und das epitheliale Membranantigen (EMA), immunzytochemisch und im Western Blot-Verfahren in K562 Zellen nachweisen konnten. Die Autoren gehen davon aus, da K562 von einem Patienten mit CML in einer terminalen Blastenkrise stammt, dass diese epithelialen Anteile, die nach induzierter Differenzierung nicht mehr nachweisbar waren, eher auf eine „abnormale Zytodifferenzierung“ oder „Retrodifferenzierung“ zu früh embryonalen, mesenchymalen Zellen zurückzuführen ist, als auf epitheliale Anteile in diesen humanen Leukämiezellen der myeloischen Reihe [62]. Damit bleibt eine Muc3 mRNA zwar immer noch als Marker zum Nachweis einer Tumorzell dissemination ungeeignet, jedoch könnten mit dieser Annahme auch die hier gefundenen Resultate der Evaluation von Knochenmarkproben erklärt werden, denn es ließ sich bei der Untersuchung von 35 verschiedenen Knochenmarkaspiraten in 4 Fällen ein Muc3 Transkript nachweisen. Die positiven Knochenmarkproben stammen interessanterweise von Patienten mit einer AML, einer CML, mit myelodysplastischem Syndrom (MDS) und einmal von einer Patientin mit Mammakarzinom. Die Stadien der Erkrankung sind nicht bekannt, jedoch könnte bei den Patienten mit hämatologischer Erkrankung die Muc3 mRNA auf das Vor-

handensein von Blasten in den untersuchten Knochenmarkproben zurückzuführen sein. Bei der Untersuchung von peripheren Blutstammzellen eines gesunden Spenders ist einmalig eine Muc3 Transkription gefunden worden, bei der Untersuchung von peripheren Blutproben in keinem Fall.

Es bleibt abschließend zu sagen, dass eine Transkription von Muc3 in kolorektalen Karzinomen bestätigt werden konnte, sich Muc3 dennoch nicht zum Nachweis einer Tumorzell dissemination von epithelialen Malignomen in hämatopoetischen Materialien eignet. Es konnte eine illegitime Transkription von Muc3 im Knochenmark von Patienten mit hämatologischen Erkrankungen und in gesunden peripheren Blutstammzellen nachgewiesen werden, die möglicherweise auf eine Transkription von Muc3 in frühen embryonalen Zellen mesenchymalen Ursprungs, die Blasten, zurückzuführen ist. Es sei nochmals betont, dass diese Ergebnisse mittels einer rt-PCR mit eingeschränkter Spezifität gefunden worden sind, da die Identität der Muc3 Amplifikate nicht in voller Länge bestätigt werden konnte und damit letztendlich die hier gefundenen Resultate für eine Transkription von Muc3 in Zellen unterschiedlicher Provenienz nur unter Vorbehalt berücksichtigt werden dürfen.

4.1 Stabilität der Muc3 Transkription nach der in vitro Stimulation mit unterschiedlichen Zytokinen

Eine Veröffentlichung von Shekels et al. aus dem Jahre 2003 zeigte für das membrangebundene Muc3 im Tierversuch, dass dieses intestinale Muzin bei Mäusen durch unterschiedliche Zytokine und Wachstumsfaktoren in seiner Genexpression reguliert werden kann und vermuten eine aktive Rolle von Muc3 in der Schleimhautbarriere des Intestinums bei pathologischen Prozessen [114].

Die Evaluation der hier vorgestellten Ergebnisse im Hinblick auf eine Muc3 Transkription nach der Inkubation mit unterschiedlichen Zytokinen, zeigte kein eindeutiges Ergebnis. Zum Teil konnte eine Muc3 Transkription nach der Inkubation in Kultur induziert werden, des gleichen kam es aber auch zum Verschwinden eines Muc3 Transkriptes. Das einzige im Duplikat bestätigte Ergebnis trat jedoch nach der Inkubation von K562 Zellen mit Interleukin-6 (IL-6) auf, und zwar kam es hier zum Verschwinden des Muc3 Transkriptes. Bedenkt man, dass es sich bei K562 um eine CML in terminaler Blastenkrise handelt und, dass IL-6 unter anderem im Synergismus mit anderen Zytokinen zu einer Stimulation der Proliferation myeloischer Zellen führt, könnte das Verschwinden einer Muc3 Transkription, wenn diese tatsächlich auf den Blastenanteil in dieser Tumorzelllinie zurückzuführen ist [62], dadurch erklärt sein, dass es durch IL-6 bei der Proliferation myeloischer Zellen auch zu deren Ausreifung in adultere Formen gekommen

ist, welche Muc3 nicht mehr exprimieren. Durch die Vorbehandlung mit IL-6 könnte sich eine theoretische Perspektive eröffnen Muc3 als spezifischen Marker für epitheliale Gewebe verwenden zu können. Jedoch bleiben noch weitere „falsch-positive“ Resultate für eine Muc3 Transkription in dieser Untersuchung übrig, die hier von IL-6 unbeeinflusst geblieben sind. Darüber hinaus zeigte sich in 6 weiteren Fällen nach der Induktion von Zellen unterschiedlicher Provenienz mit verschiedenen Zytokinen, dass ein Muc3 Transkript keinen stabilen Marker darstellt und es kann aufgrund dieser Resultate nicht ausgeschlossen werden, dass eine Muc3 Transkription nicht auf biologische Interferenzen in vivo zurückzuführen ist. Damit kann auch nach diesem Untersuchungsabschnitt für eine Muc3 Transkription nur wiederholt werden, dass sich die Muc3 mRNA nicht als Marker zum Nachweis einer Tumorzell dissemination von epithelialen Malignomen eignet und zwar wegen des Auftretens von illegitimer Transkription in nicht-epithelialen Geweben und wegen einer Instabilität der Transkription von Muc3 gegenüber biologischer Interferenzen. Auch für diesen Teil der Evaluation einer Muc3 Transkription muss betont werden, dass die Resultate mit der nicht eindeutig für Muc3 mRNA spezifischen Muc3 rt-PCR gewonnen worden sind.

VI. Zusammenfassung der Arbeit

Im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchung wurde die Transkription der humanen Muzingene, Muc1, Muc2 und Muc3, in verschiedenen Zelllinien, Knochenmarkaspiraten, peripheren Blutproben und Leukaphereseprodukten im molekulargenetischen Verfahren der rt-PCR evaluiert.

Zur Untersuchung der Muc1 Transkription wurde eine nested Muc1 rt-PCR mit computergenerierten, intronübergreifenden Primern etabliert. Die Amplifikation von genomischer DNS konnte ausgeschlossen werden und die Identität der Amplifikationsprodukte mit der Muc1 mRNA durch eine Sequenzanalyse bestätigt werden. Die Evaluation von Zellen unterschiedlicher Provenienz ergab eine ubiquitäre Transkription von Muc1 und damit keine Spezifität dieses Transkriptes für epitheliale Gewebe. Zusätzlich wurden Zelllinien und klinische Proben jeweils mit den Zytokinen IL-3, IL-6, SCF, IL-1 β , INF- γ , Flt-3, Tpo, G-CSF und GM-CSF inkubiert, so dass eine Interferenz der Muc1 Transkription mit diesen Zytokinen ausgeschlossen werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass sich der Nachweis einer Muc1 Transkription nicht zur Detektion disseminierter epithelialer Tumorzellen in hämatopoetischen Materialien eignet und zwar wegen fehlender Spezifität dieses Markers für epitheliale Gewebe.

Die Transkription von Muc2 wurde in einer rt-PCR mit zwei verschiedenen Primerpaaren ebenfalls nach computergeneriertem, intronübergreifendem Primerdesign evaluiert und zeigte eine Spezifität für epitheliale Gewebe. Eine Muc2 Transkription konnte weder in hämatopoetischen Zelllinien noch in klinischen Proben nachgewiesen werden. Auch die Inkubation mit den oben genannten Zytokinen brachte keine Veränderung des Transkriptionsmusters von Muc2, so dass auch hier eine Induktion oder verminderte Transkription der Muc2 mRNA durch diese Zytokine ausgeschlossen werden konnte. Eine Sequenzanalyse bestätigte die Identität der Amplifikationsprodukte mit der Muc2 mRNA. Zusammengenommen konnte damit demonstriert werden, dass sich der Nachweis einer Muc2 Transkription zur Detektion disseminierter epithelialer Tumorzellen in hämatopoetischen Materialien eignet.

Der Nachweis einer Muc3 Transkription ist ebenfalls mit zwei verschiedenen Primerpaaren nach computergeneriertem, intronübergreifendem Primerdesign angestrebt worden. Allerdings zeigten die PCR-Produkte dieser Muc3 rt-PCR konstant und mit beiden verwendeten Primerpaaren eine höhere Basenpaarlänge als errechnet worden war und in einer Sequenzanalyse der Amplifikationsprodukte konnte eine Homologie mit der Muc3 mRNA nur für die Hälfte des Amplifikates bestätigt werden. Es kann vermutet werden, dass es sich hier um eine alternative Splicevariante der Muc3 mRNA handelt. Unter dieser Annahme zeigte sich die Muc3 Transkription konstant in der Zelllinie eines Adenokarzinoms des Kolons und in der Zelllinie einer CML in terminaler Blastenkrise. Des Weiteren konnte eine Muc3 mRNA in 5 von 47 ver-

schiedenen klinischen Proben nachgewiesen werden, darunter auch in der Probe eines gesunden Spenders. Die Inkubation mit den oben genannten Zytokinen zeigte eine Instabilität der Muc3 Transkription, so dass eine Zytokin-vermittelte Induktion oder verminderte Transkription nicht ausgeschlossen werden konnte. Damit muss der Nachweis einer Muc3 Transkription als nicht geeignet zur Detektion disseminierter epithelialer Tumorzellen in hämatopoetischen Materialien angesehen werden. Grundsätzlich ist jedoch zu betonen, dass für diesen Teilbereich der hier vorgestellten Untersuchung die Ergebnisse nur unter dem Vorbehalt Berücksichtigung finden dürfen, dass die hier etablierte Muc3 rt-PCR keine eindeutige Spezifität für den Nachweis einer Muc3 mRNA gezeigt hat.

VII. Literaturverzeichnis

- [1] **Ashworth TR.** A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Aust Med J* 1869;14:146.
- [2] **Bani MR et Giavazzi R.** Invasion and Metastasis. *Principles of Molecular Oncology*; Ed: Bronchud MH, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2000;Ch.12,p.297-321.
- [3] **Bernini A, Spencer M, Frizelle S, Madoff RD, Willmott LD, McCormick SR, Niehans GA, Ho SB, Kratzke RA.** Evidence for Colorectal Cancer Micrometastases using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction Analysis of MUC2 in Lymph Nodes. *Cancer Detection and Prevention* 2000;24(1):72-97.
- [4] **Berois N, Varangot M, Aizen B, Estrugo R, Zarantonelli L, Fernandez P, Krygier G, Simonet F, Barrios E, Muse I, Osinaga E.** Molecular detection of cancer cells in bone marrow and peripheral blood of patients with operable breast cancer. Comparison of CK 19, Muc 1 and CEA using RT-PCR. *European Journal of Cancer* 2000;36:717-23.
- [5] **Blank M, Klussmann E, Krüger-Krasagakes S, Schitt-Gräff A, Stolte M, Bornhoff G, Stein H, Xing PX, McKenzie IFC, Verstijnen C, Riecken EO, Hanski C.** Expression of Muc2-Mucin in colorectal adenomas and carcinomas of different histological types. *International Journal of Cancer* 1994;59:301-6.
- [6] **Bostick PJ, Chatterjee S, Chi DD, Huynh KT, Giuliano AE, Cote R, Hoon DSB.** Limitations of Specific Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction Markers in the Detection of Metastases in the Lymph Nodes and Blood of Breast Cancer Patients. *J Clinical Oncol* 1998;16(8):2632-40.
- [7] **Braun S, Hepp F, Sommer HL, Pantel K.** Tumor-Antigen Heterogeneity of disseminated breast cancer cells: Implications for Immunotherapy of minimal residual disease. *Int J Cancer (Pred. Oncol.)* 1999;84:1-5.
- [8] **Brugger W, Bühring HJ, Grünebach F, Vogel W, Kaul S, Müller R, Brümmendorf TH, Ziegler BL, Rappold I, Brossart P, Scheduling S, Kanz L.** Expression of MUC-1 Epitopes on Normal Bone Marrow: Implications for the Detection of Micrometastatic Tumor Cells. *Journal of Clinical Oncology* 1999;17(5):1535-44.

- [9] **Burchell J, Gendler S, Taylor-Papadimitriou J, Girling A, Lewis A, Millis R, and Lamport D.** Development and Characterization of Breast Cancer Reactive Monoclonal Antibodies Directed to the Core Protein of the Human Milk Mucin. *Cancer Research* 1987;47:5476-5482.
- [10] **Burton J, Mishina D, Cardillo T, Lew K, Rubin A, Goldenberg DM, Gold DV.** Epithelial Mucin-1 (MUC1) Expression and MA5 Anti-MUC1 Monoclonal Antibody Targeting in Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research* 1999;5,Suppl:3065s-3072s.
- [11] **Campana D, Pui CH.** Detection of minimal residual disease in acute leukemias: methodological advances and clinical significance. *Blood* 1995;85:1416-34.
- [12] **Cave H, Guidal P, Rohrlich P, Delfau MH, Broyart A, Lescoeur B.** Prospective monitoring and quantitation of residual blasts in childhood acute leukemias by polymerase chain reaction of delta and gamma T-cell receptor genes. *Blood* 1994;83:1892-902.
- [13] **Chan AK, Lockhart DC, von Bernstorff W, Spanjaard RA, Joo HG, Eberlein TJ, Goedegebuure PS.** Soluble Muc1 Secreted by Human Epithelial Cancer Cells Mediates Immune Suppression by Blocking T-Cell Activation. *Int J Cancer* 1999;82:721-26.
- [14] **Chen D, Koido S, Li Y, Gendler S, Gong J.** T cell suppression as a mechanism for tolerance to MUC1 antigen in MUC1 transgenic mice. *Breast Cancer Res Treat* 2000;60:107-115.
- [15] **Cho M, Dahiya R, Choi SR, Siddiki B, Yeh MM, Sleisenger MH, Kim YS.** Mucins secreted by cell lines derived from colorectal mucinous carcinoma and adenocarcinoma. *European Journal of Cancer Part A* 1997; 33(6):931-941.
- [16] **Christopherson WM.** Cancer Cells in the Peripheral Blood: A Second Look. *Acta Cytologica* 1965;9(2):169-174.
- [17] **Corradini P, Voena C, Astolfi M, Dell’Oro S, Pilotti S, Arrigoni G, Bregni M, Pileri A, Gianni AM.** Maspin and Mammaglobulin genes are specific markers for RT-PCR detection of minimal residual disease in patients with breast cancer. *Annals of Oncology* 2001;12:1693-1698.

[18] **Courtney EDJ, Melville DM, Leicester RJ.** Chemoprevention of Colorectal Cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19(1):1-24.

[19] **Crawley SC, Gum JR, Hicks JW, Pratt WS, Aubert JP, Swallow DM, Kim YS.** Genomic organization and structure of the 3' region of human MUC3: alternative splicing predicts membranebound and soluble forms of the mucin. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;263(3):728-36.

[20] **Cross NPC.** Minimal residual disease in chronic myeloid leukaemia. *Hematology and Cell Therapy* 1998;40:224-228.

[21] **Datta YH, Adams PT, Drobyski WR, Ethier SP, Terry VH, Roth MS.** Sensitive Detection of Occult Breast Cancer by the Reverse Transkriptase - Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Oncology* 1994,12(3):475-482.

[22] **De Cremoux P, Extra JM, Denis MG, Pierga JY, Bournstyn E, Nos C, Clough KB, Boudou E, Martin C, Müller A, Pouillart P, Magdelénat H.** Detection of Muc1-expressing Mammary Carcinoma Cells in the Polymerase Chain Reaction. *Clinical Cancer Research* 2000;6:3117-3122.

[23] **De Mascarel I, Bonichon F, Coindre JM, Trojani M.** Prognostic significance of breast cancer axillary lymph node micrometastases assessed by two special techniques: reevaluation with longer follow up. *Brit J Cancer* 1992;66:523-527.

[24] **Dent G, Civalier CJ, Brecher ME and Bentley SA.** Muc 1 Expression in Hematopoietic Tissues. *Am J Clin Pathol* 1999;111:741-747.

[25] **Diel IJ, Kaufmann M, Goerner R, Costa SD, Kaul S, Bastert G.** Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: a prognostic factor for distant metastasis. *Journal of Clinical Oncology* 1992;10(10):1534-1539.

[26] **Dobrovic A.** Short Technical Reports: Immunobead RT-PCR: A sensitive Method for detection of circulating tumor cells. *Biotechniques* 1997;21:100-105.

[27] **Doehn C, Jocham D.** Technology Evaluation: TG-1031, Transgene SA. *Curr Opin Mol Ther* 2000;2(1):106-11.

[28] **El-Rifai WM.** Rare event cells in hematologic neoplasms. Lineage involvement and minimal residual disease. Academic Dissertation, Haartman Institute, 1997, University of Helsinki, Finland.

[29] **Engell HC.** Cancer cells in the circulating blood. *Acta Chir Scan* 1955;Suppl 201.

[30] **Enss ML, Cornberg M, Wagner S, Gebert A, Henrichs M, Eisenblatter R, Beil W, Kownatzki R, Hedrich HJ.** Proinflammatory cytokines trigger Muc gene expression and mucin release in the intestinal cancer cell line LS180. *Inflamm Res* 2000;49(4):162-9.

[31] **Fidler IJ et Hart IR.** Biologic diversity in metastatic neoplasms-origins and implications. *Science* 1982;217:998-1001.

[32] **Fidler I.** The biology of human cancer metastasis. *Acta Oncol* 1991, 30:669-675.

[33] **Folkman J, Klagsburn M.** Angiogenic factors. *Science* 1987;235:444-7.

[34] **Folkman J.** Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med.* 1995;333:1757-63.

[35] **Frost P, Levin B.** Clinical implications of metastatic process. *Lancet* 1992;339:1458-61.

[36] **Fukuoka M, Yano S, Giaccone G.** A multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced NSCLC. *J Clin Oncol.* 2003;21:2237-2246.

[37] **Funke I, Schraut W.** Meta-Analyses of Studies on Bone Marrow Micrometastases: An Independent Prognostic Impact Remains to Be Substantiated. *Journal Clin Oncol* 1998;16(2):557-566.

[38] **Gendler SJ, Lancaster CA, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Peat N, Burchell J, Pemberton L, Lalani EN, Wilson D.** Molecular Cloning and Expression of Human Tumor-associated Polymorphic Epithelial Mucin. *Journal of Biological Chemistry* 1990;265(25):15286-93.

[39] **Gendler SJ, Spicer AP.** Epithelial Mucin Genes. *Annu Rev Physiol* 1995;57:607-634.

-
- [40] **Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, Schreiber HW, Wagener C, Neumaier M.** Specific detection of carcinoembryonic antigen - expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Oncology* 1994;12(4):725-729.
- [41] **Ghossein RA, Rosai Juan.** Polymerase Chain Reaction in the Detection of Micrometastases and Circulating Tumor Cells. *Cancer* 1996;78(1):10-16.
- [42] **Ghossein RA, Bhattacharya S, Coit DG.** Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction Detection of Melanoma-Related Transcripts in the Peripheral Blood and Bone Marrow of Patients with Malignant Melanoma. What have we learned? *Recent Results in Cancer Research* 2001;158:63-75.
- [43] **Glaves D, Huben RP, Weiss L.** Haematogenous dissemination of cells from human renal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 1988;57:32-35.
- [44] **Gollub EG, Goswami S, Kouba D, Marom Z.** Regulation of Mucin Gene Expression in Secretory Epithelial Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1993;197(2):667-673.
- [45] **Grunberg E, Eckert K, Karsten U, Maurer HR.** Effects of differentiation inducers on cell phenotypes of cultured nontransformed and immortalized mammary epithelial cells: a comparative immunocytochemical analysis. *Tumour Biol* 2000;21(4):211-23.
- [46] **Gum JR, Hicks JW, Toribara NW, Rothe EM, Lagace RE, Kim YS.** The human MUC2 intestinal mucin has cysteine-rich subdomains located both upstream and downstream of its central repetitive region. *J Biol Chem* 1992;267(30):21375-383.
- [47] **Gum JR; Ho J JL, Pratt WS, Hicks JW, Hill AS, Vinall LE, Robertson AM, Swallow DM, Kim YS.** MUC3 human intestinal mucin. Analysis of gene structure, the carboxyl terminus, and a novel upstream repetitive region. *J Biol Chem* 1997;272(42):26678-686.
- [48] **Hanski C, Hofmeier M, Schmitt-Gräf A, Riede E, Hanski ML, Borchard F, Sieber E, Niedobitek F, Foss HD, Stein H, and Riecken EO.** Overexpression of Ectopic Expression of MUC2 is the Common Property of Mucinous Carcinomas of the Colon, Pancreas, Breast, and Ovary. *J Path* 1997;182:385-391.

[49] **Hart IR, Saini A.** Biology of tumour metastasis. *Lancet* 1992;339:1453-7.

[50] **Heim S, Mitelman F.** *Cancer Cytogenetics: Chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells.* 2nd ed., 1995; Wiley-Liss, Inc. New York.

[51] **Heiss MM, Allgayer H, Gruetzner KU, Funke I, Babic R, Jauch KW et Schildberg FW.** Individual development and uPA-receptor expression of disseminated tumour cells in bone marrow: a reference to early systemic disease in solid cancer. *Natur Medicine* 1995;1(10):1035-39.

[52] **Henttu P, Liao S, Vihko P.** Androgens up-regulate the human prostate-specific antigen messenger ribonucleic acid, but down-regulate the prostatic acid phosphatase mRNA in the LNCaP cell line. *Endocrinology* 1992;130:766-72.

[53] **Hermanek P, Henson DE, Hutter RV, Sobin LH.** *TNM Supplement* 1993. Springer, Berlin 1993.

[54] **Hermanek P.** pTNM and residual tumor classifications: problems of assessment and prognostic significance. *World Journal of Surgery* 1995;19(2):184-190.

[55] **Hill RP.** *The Biology of Cancer. Clinical Oncology,* 8th Ed, 2001;W.B Saunders Company; Philip Rubin:p 32-46.

[56] **Ho SB, Niehans GA, Lyftogt C, Yan PS, Cherwitz DL, Gum ET, Dahiya R, Kim YS.** Heterogeneity of Mucin Gene Expression in Normal and Neoplastic Tissues. *Cancer Research* 1993;53:641-651.

[57] **Ho SB.** Mucin gene expression in normal and neoplastic tissue and the use of mucin mRNAs as markers for micrometastatic disease. *Journal of Clinical Ligand Assay* 1999;22(4):358-363.

[58] **Hollingsworth MA, Strawhecker JM, Caffrey TC, Mack DR.** Expression of MUC1, MUC2, MUC3 and MUC4 Mucin mRNAs in human pancreatic and intestinal tumor cell lines. *Int J Cancer* 1994;57:198-203.

[59] **Hoon DSB, Fukashi D, Guiliano AE.** The Detection of Breast Carcinoma Micrometastases in Axillary Lymph Nodes by Means of Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Cancer* 1995, 76(3):533-534.

[60] **Huber H, Löffler H, Faber V (Hrsg.).** Methoden der diagnostischen Hämatologie. Springer Verlag Berlin - Heidelberg, 1994.

[61] **International (Ludwig) Breast Cancer Study Group.** Prognostic importance of occult axillary lymph node micrometastases from breast cancers. *Lancet* 1990;335:1565-68.

[62] **Järvinen M, Andersson LC, Virtanen I.** K562 Erythroleukemia Cells Express Cytokeratins 8, 18, and 19 and Epithelial Membrane Antigen That Disappear After Induced Differentiation. *Journal of Cellular Physiology* 1990;143:310-320.

[63] **Jung R, Krüger W, Hosch S, Holweg M, Kröger N, Gutensohn K, Wagener C, Neumaier M, Zander AR.** Specificity of reverse transcriptase polymerase chain reaction assays designed for the detection of circulating cancer cells is influenced by cytokines in vivo and in vitro. *British Journal of Cancer* 1998;78(9):1194-8.

[64] **Jung R, Soondrum K, Krüger W, Neumaier M.** Detection of Micrometastasis through Tissue-Specific Gene Expression: Its Promise and Problems. *Recent Results in Cancer Research* 2001;158:32-39;Springer Verlag.

[65] **Jurcic JG, Nimer SD, Scheinberg DA, DeBlasio T, Warrell RP, Miller WH.** Prognostic significance of minimal residual disease detection and PML/RAR- α isoform type: long-term follow-up in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 2001;98(9):2651-2656.

[66] **Kawasaki ES, Clark SS, Coyne MS, Smith SD, Champlin R, Witte ON, McCormick FP.** Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:5698-702.

[67] **Kim JA, Dayton MA, Aldrich W, Triozzi PL.** Modulation of CD4 cell cytokine production by colon cancer-associated mucin. *Cancer Immunol Immunother* 1999;48:525-32.

[68] **Kim YD, Jeon JY, Woo HJ, Lee JC, Chung JH, Song SY, Yoon SK, Baek SH.** Interleukin-1beta induces Muc2 gene expression and mucin secretion via activation of PKC-MEK/ERK, and PI3K in human airway epithelial cells. *Journal of Korean Medical Science* 2002;17(6):765-71.

[69] **Köhler G, Milstein C.** Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975;256:495-7.

[70] **Koido S, Kashiwaba M, Chen D, Gendler S, Kufe D, Gong J.** Induction of Antitumor Immunity by Vaccination of Dendritic Cells Transfected with MUC1 RNA. *Journal of Immunology* 2000;165:5713-19.

[71] **Kris MG, Natale RB, Herbst RB, Lynch TJ, Prager D, Belani CP, Schiller JH, Kelly K, Spiridonidis H, Sandler A, Albain KS, Cella D, Wolf MK, Averbuch SD, Ochs JJ, Kay AC.** Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with NSCLC. *JAMA* 2003;290:2149-58.

[72] **Krüger W, Krzizanowski C, Holweg M, Stockschräder M, Kröger N, Jung R, Mross K, Jonat W, Zander AR.** Reverse transcriptase - polymerase chain reaction detection of cytokeratin-19 mRNA in bone marrow and blood of breast cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996;122:679-686.

[73] **Krüger W, Kröger N, Zander AR.** MUC1 expression in hemopoietic tissues (letter). *J Hematother Stem Cell Res* 2000;9(4):409-410.

[74] **Laheru D.** Highlights of the AACR-NCI-EORTC International Conference on Molecular Targets and Therapeutics; Bosten, 2003. *Hematology-Oncology* 2004;(7)1.

[75] **Lamblin G, Degroote S, Perini JM, Delmotte P, Scharfman A, Davril M, Lo-Guidice JM, Houdret N, Dumur V, Klein A, Roussel P.** Human airway mucin glycosylation: A combinatory of carbohydrate determinants which vary in cystic fibrosis. *Glycoconjugate Journal* 2001;18(9):661-84.

[76] **Lee MS, Chang KS, Cabanillas F, Freireich EJ, Trujillo JM, Stass SA.** Detection of minimal residual cells carrying the t(14;18) by DNA sequence amplification. *Science* 1987;237:175-8.

[77] **Leutenegger CM.** The Real-Time TaqMan PCR and Applications in Veterinary Medicine. *Vet Sciences Tomorrow* 2001; Issue 1.

[78] **Lindblom A, Liljegren A.** Tumour markers in malignancies. *BMJ* 2000;(320):424-427.

[79] **Liotta LA, Kleinerman J, Saidel GM.** Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res* 1974;34:997-1003.

[80] **Löwenberg B, Downing JR, Burnett A.** Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 1999, 341(14):1051-1062.

[81] **Lopez-Guerrero JA, Bolufer-Gilabert P, Sanz-Alonso M, Barragán-Gonzalez E, Paulau-Perez J, De la Rubia-Comos J, Sempere-Talens A, Bonanad-Boix S.** Minimal illegitimate levels of cytokeratin K19 expression in mononucleated blood cells detected by reverse transcription PCR method (RT-PCR). *Clinica Chimica Acta* 1997;263:105-116.

[82] **Matsuda K, Masaki T, Watanabe T, Kitayama J, Nagawa H, Muto T, Ajioka Y.** Clinical Significance of Muc1 and Muc2 Mucin and p53 Protein Expression in Colorectal Carcinoma. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 1999;30(2):89-94.

[83] **Mattano LA, Moss TJ, Emerson SG.** Sensitive detection of rare circulating neuroblastoma cells by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1992;52:4701-05.

[84] **Mendelsohn J, Baselga J.** Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J Clin Oncol* 2003;21:2787-99.

[85] **Miyajama Y, Kato K, Numata S, Kudo K, Horibe K.** Detection of neuroblastoma cells in bone marrow and peripheral blood at diagnosis by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction for Tyrosine Hydroxylase mRNA. *Cancer* 1995;75:2757-61.

[86] **Molino A, Colombatti M, Bonetti F, Zardini M, Pasini F, Perini A, Pelosi G, Tridente G, Veneri D, Cetto GL.** A comparative analysis of three different techniques for the detection of breast cancer cells in bone marrow. *Cancer* 1991;67:1033-1036.

[87] **Moreno JG, Croce CM, Fischer R, Monne M, Vihko P, Mulholland SG, Gomella LG.** Detection of Hematogenous Micrometastasis in Patients with Prostate Cancer. *Cancer Research* 1992;52:6110-6112.

[88] **Mori M, Mimori K, Ueo H, Tsuji K, Shiraishi T, Barnard GF, Sugimachi K, Akiyoshi T.** Clinical significance of molecular detection of carcinoma cells in lymph nodes and peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction in patients with gastrointestinal or breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 1998;16(1):128-132.

[89] **Moscatello DK.** Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res.* 1995;55:5536-9.

[90] **Mullis KB, Faloona FA, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT and Erlich HA.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol* 1986;51:263-273.

[91] **Nagafuji K, Harada M, Takamatsu Y, Eto T, Teshima T.** Evaluation of leukaemic contamination in peripheral blood stem cell harvest by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Br J Hematol* 1993;85:578-583.

[92] **Neumaier M, Gerhard M, Wagener C.** Diagnosis of micrometastases by the amplification of tissue-specific genes. *Gene* 1995;159:43-47.

[93] **Niv Y, Byrd JC, Ho SB, Dahiya R, Kim YS.** Mucin Synthesis and Secretion in Relation to Spontaneous Differentiation of Colon Cancer Cells in vitro. *Int J Cancer* 1992;50:147-52.

[94] **Noguchi S, Aihara T, Nakamori S, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H.** The Detection of Breast Carcinoma Micrometastases in Axillary Lymph Nodes by Means of Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Cancer* 1994;74(5):1595-1600.

[95] **Noguchi S, Aihara T.** The Detection of Breast Carcinoma Micrometastases in Axillary Lymph Nodes by Means of Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Cancer* 1995;76(3):534-35.

[96] **Noguchi S, Aihara T, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H.** Detection of Breast Cancer Micrometastases in Axillary Lymph Nodes by Means of Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction; Comparison between MUC1 mRNA and Keratin 19 mRNA Amplification. *Am J Path* 1996;148:649-656.

[97] **Ogata S, Uehara H, Chen A, Itzkowitz SH.** Mucin Gene Expression in Colonic Tissues and Cell Lines. *Cancer Research* 1992;52:5971-5978.

[98] **Paget S.** The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet* 1889;5:29-49.

[99] **Pantel K, Braun S, Passlick B, Schlimok G.** Minimal Residual Epithelial Cancer: Diagnostic Approaches and Prognostic Relevance. *Progr Histochem Cytochem* 1996;30(3).

[100] **Pantel K, Otte M.** Disseminated Tumor Cells: Diagnosis, Prognostic Relevance, and Phenotyping. *Recent Results in Cancer Research* 2001;(158);Springer-Verlag.

[101] **Patton S, Gendler SJ, Spicer AP.** The epithelial mucin, Muc1, of milk, mammary gland, and other tissues. *Biochimica et Biophysica Acta* 1995;(1241):407-424.

[102] **Peat N, Gendler SJ, Lalani EN, Duhig T, Taylor-Papadimitriou J.** Tissue-specific Expression of a Human Polymorphic Epithelial Mucin (MUC1) in Transgenic Mice. *Cancer Research* 1992;(52):1954-60.

[103] **Pratt WS, Crawley S, Hicks J, Ho J, Nash M, Kim YS, Gum JR, Swallow DM.** Multiple Transcripts of MUC3: Evidence for Two Genes, MUC3A and MUC3B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000;275:916-923.

[104] **Redding WH, Coombes RC, Monaghan P, Clink HM, Imrie SF, Dearnaley DP, Ormerod MG, Sloane JP, Gazet JC, Powles TJ, Neville AM.** Detection of Micrometastases in patients with primary breast cancer. *Lancet* 1983;2:1271-3.

[105] **Reddy PK, Gold DV, Cardillo TM, Goldenberg DM, Li H and Burton JD.** Interferon-gamma upregulates Muc1 expression in haematopoietic and epithelial cancer cell lines, an effect associated with MUC1 mRNA induction. *European Journal of Cancer* 2003;39:397-404.

[106] **Rinker-Schaeffer CS, Partin AW, Isaacs WB, Coffey DS, Isaacs JT.** Molecular and cellular changes associated with the acquisition of metastatic ability by prostatic cancer cells. *Prostate* 1994;25:249-65.

[107] **Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, Mackay W, Moss TJ, Ciobanu N, Tallman MS, Kennedy MJ, Davidson NE, Sweet D, Winter C, Akard L, Jansen J, Copelan E, Meagher RC, Herzig RH, Klumpp TR, Kahn DG, Warner NE.** Detection and Viability of Tumor Cells in Peripheral Blood Stem Cell Collections from Breast Cancer Patients using Immunocytochemical and Clonogenic Assay Techniques. *Blood* 1993;82(9):2605-2610.

[108] **Rubin Ph.** *Clinical Oncology*, 8th Ed., WB Saunders Company; 2001,(II):32-45.

[109] **Salomon D, Brandt R, Ciardiello F.** Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995;19:183-232.

[110] **Schiller JH.** New directions for ZD1839 in the treatment of solid tumors. *Semin Oncol* 2003;30:Supp.55.

[111] **Schlimok G, Funke I, Holzmann B, Göttlinger G, Schmidt G, Häuser H, Swierkot S, Warnecke HH, Schneider B, Koprowski H, Riethmüller G.** Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:8672-8676.

[112] **Schoenfeld A, Luqmani Y, Smith D, O'Reilly S, Shousha S, Sinnott D, Coombes RC.** Detection of Breast Cancer Micrometastases in Axillary Lymph Nodes by Using Polymerase Chain Reaction. *Cancer Research* 1994;54:2986-2990.

[113] **Sharp JG, Bishop M, Chan WC, Greiner T, Joshi SS, Kessinger A, Reed E, Sanger W, Tarantolo S, Traystman M, Vose J.** Detection of Minimal Residual Disease in Hematopoietic Tissues. *Annals New York Academy of Science* 1995;9(770):242-261.

[114] **Shekels LL, Ho SB.** Characterization of the mouse Muc3 membrane bound intestinal mucin 5' coding and promoter regions: Regulation of inflammatory cytokines. *Biochimica et Biophysica Acta Gene Structure and Expression* 2003;1627(2-3):90-100.

[115] **Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, Press MF.** Studies of the HER-2/*neu* Proto-oncogene in Human Breast and Ovarian Cancer. *Science* 1989;244:707-712.

[116] **Smith M, Biggar S, Hussain M.** Prostate-specific antigen messenger RNA is expressed in non-prostate cells: implications for detection of micrometastases. *Cancer Research* 1995;55:2640-4.

[117] **Stahel RA, Mabry M, Skarin AT, Speak J, Bernal SD.** Detection of bone marrow metastasis in small-cell lung cancer by monoclonal antibody. *J Clin Oncol* 1985;3:455-61.

[118] **Sylvester PA, Myerscough N, Warren BF, Carlstedt I, Corfield AP, Durdey P, Thomas MG.** Differential expression of the chromosome 11 mucin genes in colorectal cancer. *Journal of Pathology* 2001;195:327-35.

[119] **Tarin D, Price JE, Kettlewell MG, Souter RG, Vass AC and Crossley B.** Mechanisms of Human Tumor Metastasis Studied in Patients with Peritoneovenous Shunts. *Cancer Research* 1984;44:3584-3592.

[120] **Traweek ST, Liu J, Battifora H.** Keratin Gene Expression in Non-Epithelial Tissues-Detection with Polymerase Chain Reaction. *American Journal of Pathology* 1993;142(4):1111-1118.

[121] **Treon SP, Mollick JA, Urashima M, Teoh G, Chauhan D, Ogata A, Raje N, Hilgers JHM, Nadler L, Belch AR, Pilarski LM, Anderson KC.** Muc-1 Core Protein Is Expressed on Multiple Myeloma Cells and Is Induced by Dexamethasone. *Blood* 1999;93(4):1287-1298.

[122] **Treon SP, Maimonis P, Bua D, Young G, Raje N, Mollick J, Chauhan D, Tai YT, Hideshima T, Shima Y, Hilgers J, Von Mensdorff-Pouilly S, Belch AR, Pilarski LM, Anderson KC.** Elevated and soluble MUC 1 levels and decreased anti-MUC 1 antibody levels in patients with multiple myeloma. *Blood* 2000;96(9):3147-3153.

[123] **Trojani M, De Mascarel I, Bonichon F, Coindre JM, Delsol G.** Micrometastases to axillary lymph nodes from carcinoma of breast: Detection by immunohistochemistry and prognostic significance. *British Journal of Cancer* 1987;55:303-306.

[124] **Trojani M, De Mascarel I, Coindre JM, Bonichon F.** Micrometastases to axillary lymph nodes from invasive lobular carcinoma of breast: Detection by immunohistochemistry and prognostic significance. *British Journal of Cancer* 1987;56:838-839.

[125] **Van Dongen JJM and Wolvers-Tettero ILM.** Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part I: Basic and technical aspects. *Clinical Chimica acta* 1991;198(1-2):1-91.

[126] **Van Dongen JJM and Wolvers-Tettero ILM.** Analysis of immunoglobulin and T cell receptor genes. Part II: Possibilities and limitations in the diagnosis and management of lymphoproliferative diseases and related disorders. *Clinical Chimica acta* 1991;198(1-2):93-174.

[127] **von Knebel Doeberitz M, Weitz J, Koch M, Lacroix J, Schrödel A, Herfarth C.** Molecular Tools in the Detection of Micrometastatic Cancer Cells-Technical Aspects and Clinical Relevance. *Recent Results in Cancer Research* 2001;158:181-186.

[128] **Waghorne C, Thomas M, Lagarde A, Kerbel RS, Breitman ML.** Genetic evidence for progressive selection and overgrowth of primary tumors by metastatic cell subpopulations. *Cancer Res.* 1988;48:6109-114.

[129] **Wang R, Fang D, Liu W, Luo Y.** Aberrant expression of MUC2 and MUC3 genes in gastric carcinoma and its significance. *Chin Med J (Engl)* 2000;113(6):502-507.

[130] **Weitz J, Kienle P, Magener A, Koch M, Schrödel A, Willeke F, Autschbach F, Lacroix J, Lehnert T, Herfarth C, von Knebel-Doeberitz M.** Detection of Disseminated Colorectal Cancer Cells in Lymph Nodes, Blood and Bone Marrow. *Clinical Cancer Research* 1999;5:1830-36.

[131] **Wesseling J, Van der Valk SW, Vos HL, Sonnenberg A and Hilkens J.** Episialin (Muc1) Overexpression Inhibits Integrin-mediated Cell Adhesion to Extracellular Matrix Components. *J Cell Bio* 1995;129(1):255-65.

[132] **Wharton RQ, Jonas SK, Glover C, Khan Z, Klokouzas A, Quinn H, Henry M, Allen-Mersh TG.** Increased Detection of Circulating Tumor Cells in the Blood of Colorectal Carcinoma Patients Using Two Reverse Transcription-PCR Assays and Multiple Blood Samples. *Clinical Cancer Research* 1999;5:4158-4163.

[133] **Williams SJ, Munster DJ, Quin RJ, Gotley DC, McGuckin MA.** The MUC3 gene encodes a transmembrane mucin and is alternatively spliced. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261(1):83-9.

[134] **Yamamoto M, Bharti A, Li Y and Kufe D.** Interactions of the DF3/Muc1 Breast Carcinoma-associated Antigen and beta-Catenin in Cell Adhesion. *J Bio Chem* 1997;272(19):12492-94.

[135] **Zhong XY, Kaul S, Eichler A, Bastert G.** Low Specificity of MUC1 as a Marker to Detect Epithelial Cancer Dissemination in Human Bone Marrow and Blood. *Clin Lab* 1998;12:971-978.

[136] **Zhong XY, Kaul S, Bastert G.** Evaluation of MUC1 and EGP40 in bone marrow and peripheral blood as a marker for occult breast cancer. *Arch Gynecol Obstet* 2001;264:177-181.

[137] **Zippelius A, Kufer P, Honold G, Köllermann R, Oberneder R, Schlimok G, Riethmüller G, Pantel K.** Limitations of Reverse Transkriptase - Polymerase Chain Reaction Analyses for Detection of Micrometastatic Epithelial Cancer Cells in Bone Marrow. *Journal of Clinical Oncology* 1997;15(7):2701-2708.

[138] **Zotter S, Hageman PC, Lossnitzer A, Mooi WJ, Hilgers J.** Tissue and tumor distribution of human polymorphic epithelial mucin. *Cancer Rev* 1988;11-12:55-101.

VIII. Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Axel R. Zander FACP für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. William H. Krüger für die Initiierung dieser Arbeit und die stete, kollegiale und gute Betreuung.

Des Weiteren gilt mein herzlicher Dank Frau Anita Badbaran für das gewissenhafte und gute Anlernen der Arbeiten im Labor, sowie für die weitere unterstützende und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Herzlich danken möchte ich auch Herrn PD Dr. Boris Fehse für ein immer offenes Ohr und zahlreiche gute Ratschläge.

Dem gesamten KMT II Labor und seinen Mitarbeitern möchte ich darüber hinaus für die freundliche und gute Zusammenarbeit danken, die ein Arbeiten in angenehmer Atmosphäre ermöglicht hat.

IX. Lebenslauf

- Geburtstag: 14. Januar 1975 in Hamburg
- Schulausbildung: 1981-1985 Grundschule Winsen/Luhe
1985-1987 Orientierungsstufe Winsen/Luhe
1987-1992 Gymnasium Winsen/Luhe
1992-1993 Murphy High School in Mobile, Alabama, USA,
mit Schulabschluss: High School Diploma
1993-1995 Gymnasium Winsen/Luhe mit Schulabschluss: allgemeine Hochschulreife am 15.05.1995
- Hochschulstudium: 04/1996 Aufnahme des Medizinstudiums an der Universität Hamburg
03/1998 bestandenes Physikum
09/1999 bestandenes 1. Staatsexamen
04/2002 bestandenes 2. Staatsexamen
10/2002 Studienortwechsel an die Freie Universität Berlin
- Praktisches Jahr: 10/2002-02/2003 - 1. Trimester- Vivantes Klinikum Neukölln in Anästhesiologie und operativer Intensivmedizin
02/2003-04/2003 - 1. Hälfte des 2. Trimester- Wenckebach-Klinikum in Chirurgie
04/2003-06/2003 - 2. Hälfte des 2. Trimester- University of the West Indies, Trinidad, Port of Spain, General Hospital in Chirurgie
06/2003-09/2003 - 3. Trimester- Vivantes Klinikum Neukölln in Innere Medizin- Hämatologie und Onkologie

10/2003 bestandenes 3. Staatsexamen und Abschluss des Medizinstudiums an der Freien Universität Berlin.
- Promotion: 10/2000 Beginn der experimentellen Arbeit in der Einrichtung für Knochenmarktransplantation, KMT II Labor, des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
01/2002 Abschluss der experimentellen Arbeiten
11/2004 Abschluss der schriftlichen Abfassung der Promotion und Antrag auf Zulassung zur Promotion

Veröffentlichung: **Krüger WH, Gröger T, Jung R, Badbaran A, Zander AR.**
Transcription of human epithelial mucins MUC1, MUC2 and MUC3 in
non-epithelial cells. *Onkologie* 2004;27(Suppl 3):214.

ÄiP: 03/2004 Beginn der Tätigkeit als Ärztin im Praktikum am Vivantes Kli-
nikum Neukölln, II. Innere Klinik, Abteilung für Hämatologie und On-
kologie, Berlin.

Vollapprobation: 10/2004 Assistenzärztin am Vivantes Klinikum Neukölln, II. Innere
Klinik, Abteilung für Hämatologie und Onkologie, Berlin.

Berlin, November 2004

X. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Christina Gröger