

MOLEKULÁRNÍ DETEKCE VOLNÝCH NÁDOROVÝCH BUNĚK A MIKROMETASTÁZ U KARCINOMU PRSU A KOLOREKTA POMOCÍ RT-PCR SPECIFICKÉ PRO CYTOKERATINY 19 A 20

MOLECULAR DETECTION OF ISOLATED TUMOR CELLS AND MICROMETASTASIS IN BREAST AND COLORECTAL CARCINOMA BY CYTOKERATINS 19 AND 20 SPECIFIC RT-PCR

SEDLÁČEK J., VYZULA R.

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV, BRNO

Souhrn: Výskyt metastáz u pacientů se solidními nádory velmi negativně ovlivňuje prognózu. Současné zobrazovací techniky však nemají dostatečnou rozlišovací schopnost pro zachycení časných stádií metastatického procesu. V posledních letech se proto s rozvojem nových molekulárně-biologických metod soustřeďuje pozornost na včasné rozpoznání diseminace nádorových buněk. Tyto techniky umožňují rozpoznání jednotlivých nádorových buněk mezi řádově 10^4 až 10^6 zdravých buněk a tím mohou přispět k dřívějšímu zachytu metastáz. Zvláštní pozornost je věnována detekci mikrometastáz stanovením mRNA cytokeratinů 19 a 20 u nádoru prsu a kolorektálního karcinomu pomocí zpětné polymerázové řetězové reakce (RT-PCR). Touto metodou je možné zjistit přítomnost nádorových buněk v periferní krvi, lymfatických uzlinách nebo biopsii u vysokého procenta pacientů s tímto maligním nádorovým onemocněním. Dodnes však není zcela vyjasněn skutečný přínos stanovení volných nádorových buněk a mikrometastáz pro klinickou praxi. Bude proto zapotřebí dalších studií, které by pomohly definovat použitelnost těchto metod pro určení dalšího léčebného postupu.

Klíčová slova: cytokeratin, volné nádorové buňky, mikrometastázy, kolorektální karcinom, karcinom prsu, RT-PCR

Abstract: The metastasis occurrence very negatively affects prognosis of solid tumor patients. However, current imaging techniques do not have sufficient resolution for detection of early stages of metastatic process. Along with recent development of new molecular-biological methods, the attention has been focused on early diagnosis of tumor cells dissemination. These techniques make possible to distinguish single tumor cell among on order of 10^4 - 10^6 healthy cells and thereby they can contribute to earlier catchment of metastase formation. Special attention is dedicated to micrometastasis determination by detection of cytokeratin 19 and 20 mRNA in breast and colorectal carcinoma by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). This method is able to find out the presence of tumor cells in peripheral blood, lymphatic nodes or biopsies in high percentage of patients with malignant tumor. However, real contribution of assessment of isolated tumor cells and micrometastases for clinical practice has not been clarified up to the present day. There will be needed next studies to define applicability of these methods for determination of further patient treatment.

Keywords: cytokeratin, isolated tumor cells, micrometastases, colorectal carcinoma, breast carcinoma, RT-PCR

Klasická TNM klasifikace rozděluje pacienty do několika skupin na základě statutu primárního nádoru, lymfatických uzlin a vzdálených metastáz. V rámci těchto skupin lze pro každého jednotlivého pacienta stanovit míru rizika vzniku metastatického ložiska, případně relapsu nemoci po odstranění primárního nádoru. Nicméně, jedná se pouze o statistické vyjádření pravděpodobnosti založené na výsledcích rozsáhlých studií. Adjuvantní terapii proto mohou obdržet i pacienti, u kterých nemá žádný dodatečný léčebný účinek. Na druhou stranu, u pacientů, kteří adjuvantní terapii z důvodu zařazení do nižšího stadia TNM klasifikace neobdrží, může dojít k relapsu nádorového onemocnění. Pro lepší rozlišení těchto dvou skupin je proto důležité individualizovat možná rizika a na základě těchto faktorů rozhodnout o vhodnosti další léčby.

Jedním z možných přístupů je co nejčasnější zachycení diseminace nádorových buněk. První zmínka o volných nádorových buňkách (VNB) pochází z roku 1869. Asworth (1) popsal případ rakoviny, kdy ještě po smrti pacienta byly v jeho krvi objeveny buňky připomínající nádorové. Tyto buňky se po uvolnění z nádoru šíří jak krevní, tak i lymfatickou cestou a po jejich extravazaci do cílového orgánu může dojít ke vzniku mikrometastáz (MMTS) a následně tvorbě makroskopických metastáz. Jak VNB, tak také MMTS (z důvodu malé velikos-

ti a nepřítomnosti vaskularizace) představují velice vhodný cíl pro protinádorovou terapii. Dostatečně citlivé metody pro detekci těchto buněk však byly vyvinuty až v posledních přibližně 20 letech (imunohistochemie, flowcytometrie, PCR). V této době bylo otestováno mnoho markerů pro rozlišení buněk nádorového původu (VNB a MMTS) od buněk okolní tkáně (viz. kapitola 2). Tento článek podává stručný přehled o metodách, které mohou sloužit k detekci VNB a MMTS, hlavně se však zaměřuje na využití polymerázové řetězové reakce a konkrétně na použití cytokeratinových markerů u nádoru prsu a kolorektálního karcinomu.

1. Metody umožňující detekci volných nádorových buněk a mikrometastáz

1.1. Histologie a imunohistochemie. Velkou pozornost vyvolala v polovině 50. let možnost detekce VNB pomocí histologických metod (2). Mezi lety 1955-65 bylo vyšetřeno na přítomnost VNB asi 5.000 pacientů s rakovinou (3). VNB byly detekovány téměř ve 100% případech. Velmi brzy se však ukázalo, že často docházelo k záměně hematopoetických buněk (zvláště megakaryocytů) s nádorovými buňkami (3). Znovuoživení v oblasti mikroskopických technik detekce VNB a MMTS přinesl až v 80. letech objev imunohistochemie (IHC). Použití této metody umožňuje detekci 1 nádorové buňky mezi

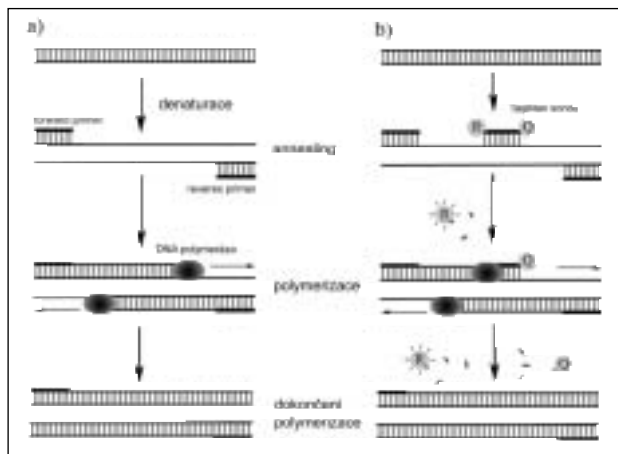
10 000 – 100 000 mononukleáry za pomoci obarvení preparátu monoklonálními protilátkami proti antigenům specifickým pro nádorové buňky. Nevýhodou je však omezený počet hodnocených buněk. Navíc i přes využití automatizovaného zpracování obrazu metoda zdaleka nedosahuje citlivosti polymerázové řetězové reakce. Nevýhodou je také možnost křížové reakce protilátek s epitopy příbuzných proteinů.

1.2. Průtoková cytometrie je založena na vytvoření proudu suspenzních buněk, které jsou obklopeny izotonickým roztokem vytvářejícím laminární proudění a které prochází individuálně průtokovou komorou. V průtokové komoře jsou buňky ozařovány monochromatickým světlem, většinou emitovaným laserem. Světlo vyzařované buňkami je následně vedeno přes sérii filtrů a dichroických zrcadel, které izolují jednotlivá spektra. Fotony jednotlivých vlnových délek jsou poté detekovány fotonásobiči a naměřené hodnoty jsou počítačově zpracovány (4). Často se využívá měření obsahu jaderné DNA za použití fluorescenčních barviv interkalujících do struktury DNA helixu, jako je například propidium jodid. Aneuploidie nádorů je obecně spojena s malignitou a horší prognózou (5), avšak může se vyskytovat i u benigních onemocnění (6). Jako marker určující stupeň proliferace se často užívá procentuální poměr buněk v S-fázi (7). Průtoková cytometrie umožňuje také stanovit množství jak povrchových, tak i vnitrobuněčných proteinů s využitím širokého spektra monoklonálních protilátek konjugovaných s fluorescenčním barvivem. Tento způsob je použitelný pro stanovení VNB a MMTS. Hlavní výhoda oproti IHC spočívá ve schopnosti vyhodnotit velké množství buněk a také v objektivitě hodnocení. Velkého uplatnění se průtoková cytometrie dočkala hlav-

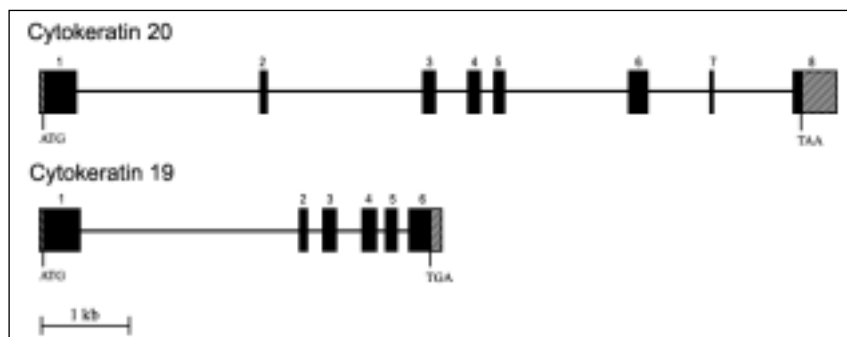
ně v hematologii a hematonekologii (shrnutí v ref. 4). V biologii solidních nádorů jsou však výsledky mnohem více protichůdné. Existuje množství studií potvrzujících možnost použití průtokové cytometrie v praxi (7-10), avšak také práce, kde nebyla nalezena žádná asociace mezi zkoumanými parametry a klinickým výstupem (11-14).

1.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla poprvé popsána roku 1985 Karry B. Mullisem (15), který za ni roku 1993 obdržel Nobelovu cenu. Jedná se o jednoduchou a rychlou metodu umožňující detekci vybrané sekvence DNA její mnohonásobnou amplifikací za použití sekvence specifických oligonukleotidů (primerů) a DNA polymerázy. Typický průběh PCR zahrnuje 35 – 40 cyklů, přičemž každý cyklus sestává z následujících kroků (obr. 1a): (a) dvouřetězcová DNA je separována tepelnou denaturací; (b) následně po ochlazení dochází k nasednutí primerů (annealing); (c) po ohřátí na teplotu optimální pro funkci DNA polymerázy je syntetizován komplementární řetězec. Vzniklé fragmenty DNA jsou poté detekovány elektroforeticky. Citlivost PCR je podstatně vyšší než citlivost tradičních histologických a imunohistochemických metod. Zpětná polymerázová řetězová reakce (RT-PCR), poprvé použitá v roce 1987 (16), je modifikací dovolující detekci úseku mRNA, která je nejprve enzymem reverzní transkriptázy přepsána do komplementární DNA (cDNA). Použitím více sad primerů (nested PCR) je možné stanovit dokonce pouze 1 nádorovou buňku v 1 ml periferní krve (17). Jedním z faktorů komplikujících klasickou PCR je možnost amplifikace nespecifických sekvencí - při málo stringentních (málo přísných) podmínkách mohou primery nasedat na místa pouze částečně homologní s cílovou sekvencí a tak může dojít i k amplifikaci jiných částí genomu. Tomuto problému se dá zčásti vyhnout výběrem vhodných primerů a používáním vysoce stringentních podmínek. Hlavní nevýhodou klasické PCR je však nemožnost přesně kvantifikovat množství templátové DNA ve vzorku. Je to způsobeno povahou této metody – v závěrečné fázi reakce není už pro množství vznikajícího produktu limitující počet templátových molekul DNA, ale kompetice o DNA polymerázu, primery a nukleotidy.

Obr. 1: Princip (a) klasické PCR, (b) kvantitativní PCR v reálném čase. Q – žhášedlo (quencher), R – fluorescenční barvivo (reporter)



Obr. 1b: Intron-exonová organizace genů pro lidský cytokeratin 19 a 20. Obdélníky představují exony, introny jsou reprezentovány horizontálními liniemi. Vyznačeny jsou pozice iniciačních a terminačních kodonů. Gen pro cytokeratin 20 se skládá z 8 exonů o délce 38 – 518 bp, zaujímá 9,29 kb na chromozomu 17q21.2. Gen pro cytokeratin 19 se skládá z 6 exonů o délce 83 – 473 bp a zaujímá 4,69 kb na chromozomu 17q21.2.



1.4. Základy kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR) byly položeny již na počátku 90. let (18, 19). Jednou z možností je využití fluorescenčního barviva interkalujícího mezi báze DNA (ethidium bromid, SYBR Green) a detekce takto vzniklé fluorescence (19). Tento přístup bohužel neodstraňuje problémy spojené s nespecifickou amplifikací, protože detekována je každá dvouřetězcová DNA. V současné době je asi nejvíce rozšířena tzv. 5'-nukleázová reakce využívající TaqMan sond. První využití 5'-exonukleázové aktivity DNA polymerázy pro účely přesné kvantifikace DNA se sice datuje do roku 1991, kdy Holland a kol. popsali kvantifikaci DNA za použití terminálně radioaktivně značené sondy (18), ale první prakticky použitelné systémy (založené na fluorescenčně značených sondách) se objevily až v druhé polovině 90. let (20-22). Hlavní změnou proti klasické PCR je použití oligonukleotidu (TaqMan sonda), který se specificky váže na sekvenci mezi oba primery (obr. 1b). Na 5'-konci je sonda naznačena kovalentně navázaným fluorescenčním barvivem (reporter, „R“), jehož emisní spektrum je zhášeno druhým fluorescenčním barvivem navázaným na 3'-konci sondy (zhášedlo, quencher, „Q“). Dále je sonda na 3'-konci modifikována fosfátem, který zabraňuje extenzi sondy během amplifikace. Při polymerizaci z primeru dojde působením 5'-exonukleázové aktivity DNA polymé-

rázy k odstěpení reportérového barviva a tím k jeho uvolnění z blízkosti zášedla, což vede ke vzrůstu fluorescence. Cyklus, ve kterém dojde k nárůstu fluorescence na detekovatelnou úroveň, je nazýván Ct (threshold cycle) a je nepřímo úměrný koncentraci cílové DNA. Čím větší je množství templátové DNA, tím menší množství cyklů je zapotřebí k dosažení Ct (pro přehled (23, 24).

2. Možné způsoby detekce volných nádorových buněk a mikrometastáz pomocí PCR

2.1. Detekce chromozomálních aberací a mutací specifických pro daný nádor. Přes rozsáhlý výzkum nebyla dodnes nalezena žádná mutace nebo chromozomální aberace specifická pro nádorové buňky většiny solidních nádorů. Naproti tomu chromozomální aberace asociované s určitým typem vykazují leukémie (např. reciproká translokace t(15;17) způsobující tvorbu fúzního genu PLM/RAR α je specifická pro akutní promyelocytární leukémii). Tento rozdíl je způsoben na jedné straně difúzní povahou hematologických malignit a na straně druhé vysokou heterogenitou solidních nádorů. Pokud se jedná o mutace, je situace velice podobná. Pravděpodobně nejčastěji mutovaným genem v nádorech je gen pro nádorový supresor p53, který se účastní mnoha buněčných procesů, včetně transkripce, opravy DNA, udržování stability genomu, stárnutí buňky, kontroly buněčného cyklu a apoptózy (25). Jeho mutace proto mohou mít dalekosáhlé důsledky v regulaci buněčných pochodů. Využití stanovení p53 v primárním nádoru pro prognostické účely se potenciálně jeví jako velice zajímavé (25, 26). I když je p53 asi nejvíce mutovaným genem v lidských nádorech, jeho mutace se vyskytují jen v necelé polovině všech nádorů (27). Dalším problémem je široké spektrum mutací (25), které znemožňuje vytvoření univerzálních primerů schopných detekovat tento mutovaný gen. Mutace genu p53 navíc pravděpodobně nejsou potřebné pro časnou diseminaci nádorových buněk (27). Tím se použití p53 pro detekci VNB stává velice diskutabilní (28). Podobné výhrady platí i pro další markery této skupiny, např. Ras (25).

2.2. Detekce tkáňově specifických markerů. Jedná se o markery (mRNA, proteiny), které musí splňovat několik základních kritérií. Za prvé musí být exprimovány v tkáni, odkud nádor pochází. Jejich výskyt by se v průběhu karcinogeneze neměl pokud možno výrazněji měnit. Za druhé nesmí být exprimovány (nebo alespoň ve významném množství) v místě detekce, tj. periferní krvi, kostní dřeni nebo lymfatických uzlinách. Tento jednoduchý požadavek je často komplikován nelegitimní transkripcí v místě detekce (viz. dále). V současné době je asi nejintenzivněji studována skupina cytoskeletárních proteinů – cytokeratinů, na které je tento článek zaměřen.

2.3. Jiné možné markery. Dalším často studovaným markerem je karcinoembryonální antigen (CEA). Za normálních podmínek není exprimován v buňkách tkání dospělého člověka, při vývoji nádoru se však jeho hladina zvyšuje s pokračující dediferenciací buněk. Ve většině studií však vykazuje horší výsledky než cytokeratiny. Tvorba nádoru je doprovázena zvýšenou genomovou nestabilitou a nádorové buňky vykazují rozsáhlé chromozomové přestavby včetně amplifikací, duplikací, delecí a translokací. Některé z těchto změn mohou být detekovány pomocí alel-specifických markerů, jako např. mikrosatelitů. Mikrosatelity jsou malé repetitivní sekvence rozptýlené v genomu, které vykazují vysoký polymorfismus v populaci. Takto lze detekovat například ztrátu heterozygosity (loss of heterozygosity, LOH), která může způsobit vyrazení funkční alely genu. Tato metoda se však v praxi potýká s mnoha problémy: výběr mikrosatelitních markerů; nutnost mikrodisekce nádorové tkáně, neboť přítomnost nepoškozené DNA z okolní tkáně může způsobit ztrátu signálu; nutnost standardizace množství vstupní DNA nebo např. chyby polymerázy způsobující 3' netemplátovou extenzi (28). Potenciál vyu-

žití analýzy mikrosatelitů by však mohl spočívat v ověření nádorového původu buněk detekovaných za pomoci histologie nebo imunohistochemicky (28).

3. Lesk a bída PCR

Citlivost PCR reakce je o několik řádů vyšší než citlivost mikroskopických technik. Dokáže spolehlivě zachytit nepatrné množství buněk, které je hluboko pod detekčním limitem histologických metod. Další výhodou je fakt, že vyhodnocování výsledků PCR, a obzvláště kvantitativní PCR v reálném čase, není tak výrazně zatíženo rozdílnou zkušeností pracovníků jako v případě histologie nebo imunohistochemie. Nicméně také PCR má mnoho úskalí, kterým je nutné se vyhnout a na něž považujeme za nezbytné upozornit. Některé z těchto příčin jsou uvedeny v tab. 1 a podrobněji popsány v dalším textu.

Tab. 1: Možné příčiny falešné pozitivita a negativita.

Falešná pozitivita	Falešná negativita
<i>Kontaminace epiteliálními buňkami</i>	<i>Špatná kvalita RNA/DNA</i>
<i>Kontaminace genomovou DNA</i>	<i>Inhibice reakce</i>
<i>Křížová kontaminace</i>	<i>Jiné faktory</i>
<i>Přítomnost pseudogenů</i>	
<i>Nelegitimní transkripce</i>	

3.1. Možné příčiny falešně pozitivních výsledků

3.1.1. Kontaminace epiteliálními buňkami. Pokud se při detekci VNB u pacientů se solidními nádory využívá markerů specifických pro epiteliální buňky, je nezbytně nutné věnovat maximální pozornost eliminaci příčin možné kontaminace vzorku těmito buňkami. Jedním ze zdrojů jsou buňky kůže (např. Merkelovy buňky exprimující cytokeratin 20 (29), které se mohou dostat do vzorku periferní krve při odběru. Proto je zapotřebí pro účely stanovení VNB odebrat několik frakcí krve a vyhnout se analýze první frakce následující bezprostředně po vpichu. Při operaci dochází k uvolnění jak nádorových, tak i normálních epiteliálních buněk zdravé tkáně (30, 31), které mohou způsobit falešnou pozitivitu, pokud je vzorek odebrán při operačním zákroku nebo bezprostředně po něm. Periferní krev pro analýzu by proto měla být odebírána vždy až několik dnů po operaci. Dalším možným způsobem, jak se mohou do vzorku dostat epiteliální buňky, je z rukou laboratorních pracovníků. Proto je důležité dodržovat maximální opatrnost a pracovat zásadně v rukavicích.

3.1.2. Kontaminace genomovou DNA. Detekce VNB je ve většině případů závislá na stanovení tkáňově specifické mRNA metodou RT-PCR. Je proto důležité, aby vzorek nebyl kontaminován genomovou DNA, což by vedlo k falešně pozitivním výsledkům. Protože však není možné vyizolovat zcela čistou RNA, bylo vyvinuto několik postupů, které řeší tuto situaci. Jednou z možností je použití enzymu DNázy I, který nespecificky štěpí DNA. Dále lze při návrhování primerů využít faktu, že mnoho genů je složeno z exonů a intronů, a navrhnout primery nacházející se na různých exonech. Amplikony získané PCR z cDNA jsou v důsledku nepřítomnosti intronů v mRNA elektroforeticky rozlišitelné na základě velikosti od amplikonů obdržených z genomové DNA, které introny zahrnují. Lze také navrhnout primer (TaqMan sondu) tak, aby zahrnoval sekvenci ze dvou vedle sebe se nacházejících exonů. PCR potom proběhne pouze tehdy, je-li mezilehlý intron vyštěpen a dojde tak ke spojení obou exonů. Tento způsob bohužel nelze uplatnit, vyskytuje-li se u daného genu alternativní sestřih.

3.1.3. Křížová kontaminace. Další častou komplikací je kontaminace PCR produkty z předchozích amplifikací prováděných ve stejné laboratoři. Řešením je fyzické oddělení prostor

sloužících k přípravě a analýze vzorků, což není bohužel vždy proveditelné. Další možností je použití dUTP (deoxyuridinu) místo dTTP (deoxytymidinu) v PCR reakci. Možné kontaminující produkty dřívějších reakcí jsou na začátku nové PCR reakce rozloženy enzymem deoxyuracil-N-glykosylázou (UNG). Templátová DNA však zůstane intaktní, neboť přírodní DNA uracil neobsahuje.

3.1.4. Nelegitimní transkripce. Obecně je přijímán ne zcela správný názor, že buňka exprimuje dvě skupiny genů – tzv. provozní („housekeeping“) geny kódující proteiny základního buněčného metabolismu, které jsou nutné pro fungování buněk všech typů, a tkáňově specifické geny, jejichž exprese je omezena pouze na úzce vymezenou skupinu buněk. V roce 1988 však Chelly a kolektiv zjistili expresi genu pro lidský dystrofin také v několika jiných tkáních (32). Tento jev byl potvrzen také u jiných tkáňově specifických genů – genu pro MIH (hormon pollačující vývoj Müllеровých vývodů), β -globin, aldolázu A a faktor VIIIc v buňkách lidských tkání, pro které není exprese těchto genů specifická (33). Fenomén ekto-pické exprese mRNA byl nazván nelegitimní transkripce. Frekvence transkriptů byla vypočítána jako 1 molekula mRNA na 100 až 1000 buněk, což znamená mnohem méně než jednu kopii na buňku (34). Naproti tomu však byla detekována exprese 26 různých mRNA, považovaných za tkáňově specifické, v jednom lymfocytu, spermii nebo nádorové buňce (35). Tato hladina transkriptů je sice naprosto nedostatečná pro tvorbu funkčně relevantního množství proteinu, nicméně může znamenat velmi vážnou komplikaci pro detekci MMTS v klinických vzorcích, kde jsou normální buňky ve velkém nadbytku nad buňkami nádorovými. V případě klasické RT-PCR může být nelegitimní transkripce téměř neproblematickým problémem, neboť ekto-pická exprese mRNA v nenádorových tkáních může být zdrojem falešně pozitivních výsledků. S nástupem kvantitativních technik (komparativní nebo kompetitivní end-point PCR, ale hlavně kvantitativní PCR v reálném čase) se začíná stále více využívat možnosti stanovit na základě znalosti přesného množství transkriptu hranici rozdělovací normální a patologickou (způsobenou přítomností VNB a MMTS) hladinu mRNA.

3.1.5. Přítomnost pseudogenů. Dalším zdrojem falešně pozitivních výsledků při detekci markerové mRNA může být přítomnost pseudogenů a genových fragmentů v genomu. Jedná se o sekvence blízké příbuzné funkčním genům a až na výjimky transkripčně inaktivní z důvodu nepřítomnosti promotorové oblasti. Mechanismus jejich vzniku je dvojitý: (a) genová duplikace a (b) reverzní transkripce mRNA a následné začlenění zpět do genomu. Genová duplikace je mechanismus podílející se mimo jiné na vzniku nových genů zdvojením původního genu. Duplikovaná sekvence si zachovává svou exon-intronovou strukturu, avšak u pseudogenů duplikace nezahrnuje regulační oblasti a proto nejsou schopny přepisu do funkční mRNA. Upravené pseudogeny (processed pseudogenes) vzniklé přepisem z mRNA kromě regulačních oblastí navíc ve srovnání s pseudogeny vzniklými duplikací postrádají introny. V důsledku sníženého selekčního tlaku na oblasti DNA neobsahující geny potřebné pro funkci buňky, dochází v pseudogenech k podstatně rychlejšímu mutačním změnám než v původním genu (shrnuté v ref. 36). Při navrhování primerů je proto nutné využívat rozdílů v sekvencích funkčního genu a pseudogenu.

3.2. Možné příčiny falešně negativních výsledků

3.2.1. Špatná kvalita RNA/cDNA. RNA je velice citlivá molekula. RNázy jsou hojně přítomné v okolním prostředí a vysoce stabilní. Velmi proto záleží na zvoleném způsobu manipulace se vzorkem (vzorek je nutné dostatečně rychle zpracovat, nebo zamrazit na teplotu minimálně -70°C) a na použité metodě izolace RNA. Chadderton a kol. například porovnávali tři

reagencie používané k izolaci RNA a shledali Trizol-LS vhodnější pro izolaci dostatečného množství čisté RNA než RNA-STAT-50 a Ultraspec-3 (37).

3.2.2. Inhibice reakce. Původ klinických vzorků zpracovávaných metodou PCR může být velmi různý – nejčastěji se jedná o vzorky periferní krve, punkce kostní dřeně, biopsie nádorů nebo lymfatické uzliny. Rozdílné jsou i postupy používané při uchování a zpracování vzorků – některé z těchto technik mohou využívat chemikálie inhibující průběh PCR nebo reverzní transkripce (RT). Heparin, hojně využívaný jako anti-koagulant pro uchování vzorků krve, inhibuje DNA polymerázu (38). Řešením je ošetření vzorku heparinázou (39), nebo použití jiného antikoagulantu, jako například EDTA nebo citrátu (40). Průběh reakce může být ovlivněn i dalšími látkami používanými k purifikaci DNA (SDS, fenol, etanol, izopropanol, acetat sodný, NaCl) nebo k jejímu uchovávání (EDTA v TE pufru) (41, 42). Jiné inhibitory mohou být obsaženy přímo ve vzorku – například hemová složka hemoglobinu (41). Proto je velice důležité věnovat pozornost látkám s možným inhibičním efektem používaným při zpracování vzorku nebo v něm přímo obsažených.

3.2.3. Jiné faktory. Další možné vlivy mohou zahrnovat kontaminaci velkým množstvím DNA, která může kompetovat s cDNA o primery a snižovat tak citlivost RT-PCR. Výběr špatných housekeepingových genů pro normalizaci může také způsobit falešnou negativitu. Pokud je referenční gen exprimován v buňkách ve velkém množství, může být detekován i při špatné kvalitě cDNA, kdy již není zachycena mRNA markeru s expresí o několik řádů nižší (43). Samozřejmě nemohou být vyloučeny ani lidské chyby.

3.3. Další stinné stránky PCR

PCR je sice metoda podstatně citlivější než histopatologie, imunohistochemie nebo průtoková cytometrie, jde však o techniku do značné míry destruktivní. Po provedení analýzy již není možné zpětné ověření morfologické povahy buněk, ani jejich množství. V posledním bodě může být velice užitečná kvantitativní PCR, nicméně vzhledem k možnosti změny exprese genů v nádorové tkáni nemůže v tomto bodě nahradit tradiční metody. V případě RT-PCR je nevýhodou oproti histologii a IHC podstatně snížená možnost provádění retrospektivních studií. Materiál bývá většinou konzervován formaldehydem a parafínem a vzhledem k velice nízké kvalitě RNA se nehodí pro zpracování touto metodou.

4. Cytokeratiny

4.1. Cytoskelet

Cytoplazma není jen beztvorou polotekutou hmotou, ale vysoce organizovanou strukturou. Její kostru tvoří cytoskelet – jedná se o komplexní síť vláken, jejichž úkolem je udržovat dynamickou morfologii buňky v neustále se měnícím prostředí. Hlavními funkcemi je poskytovat buňce oporu a udržovat její integritu, zakotvení vnitřních organel k cytoplazmatické membráně, cytoskelet se dále podílí na mitóze, přenosu signálů apod. Cytoskelet vyšších eukaryot se skládá ze tří hlavních komponent: (a) mikrotubulů, které jsou tvořeny α a β tubulinem uspořádaným do dutých vláken o průměru 25 až 28 nm; (b) mikrofilament o průměru 6-8 nm a (c) středních (intermediálních) filament o průměru 8-11 nm. Tyto tři hlavní složky cytoskeletu je nutné posuzovat v celku – teprve ve vzájemné interakci a v kombinaci s dalšími proteiny jsou schopny zajišťovat tvorbu vysoce dynamické cytoarchitektury specifické pro jednotlivé buněčné typy (44). Mikrotubuly se podílí na tvorbě mitotického vřeténka při rozdělování chromozomů do jednotlivých dceřinných jader při buněčném dělení, hrají důležitou roli při udržování tvaru buňky, podílí se také na pohybu organel i celých buněk apod. Mikrofilamenta jsou tvořena aktinovými proteiny a v buňce zajišťují hlavně pohybové funkce –

udržování a změnu tvaru buňky, proudění cytoplazmy, jsou součástí děličního vřetenka atd.

4.2. Intermediární filamenta

Intermediární filamenta (IF) ve spojení s mikrotubuly a mikrofilamenty stabilizují strukturu buňky a její tvar (svou vysokou stabilitou a elasticitou) a představují tak velice důležitou součást nitrobuněčné kostry. Zatímco aktiny a tubuliny jsou vysoce konzervativní globulární proteiny schopné vázat a hydrolyzovat nukleotidtrifosfáty, IF jsou tvořena vláknitými proteiny bez známé enzymatické aktivity. Jsou charakterizovány výskytem α -helikální tyčinkovité („rod“) domény tvořené svnutým helixem, která má sice velmi konzervovanou strukturu, nicméně se může podstatně lišit v primární sekvenci. IF lze rozdělit na základě biochemických a imunologických kritérií do minimálně pěti tříd (45): (a) keratinová filamenta nacházející se v epitelálních buňkách a buňkách epitelálního původu; (b) desminová filamenta převážně buněk hladkého, kosterního a srdečního svalstva; (c) vimentinová filamenta vyskytující se v buňkách mezenchymálních a mezenchymálního původu; (d) neurofilamenta nacházející se v neuronech; (e) gliová filamenta typická pro všechny typy gliových buněk. Další možné rozdělení vychází ze sekvenční homologie proteinů IF a dělí je do pěti genových rodin (44). Ty zahrnují keratiny, které reprezentují skupiny homologie I a II kódované více než 20 geny a dalších 15 genů pro trichocytární keratiny („hair“ keratiny); proteiny typu III – desmin, vimentin, GFAP a peripherin; skupinu IV zahrnující α -internexin, syncoilin, nestin, synemin a neurofibrilární proteiny NF-L, -M a -H. Nukleární laminy A/C, B1 a B2 tvoří typ V; proteiny oční čočky phakinin a filensin jsou začleněny do zvláštní skupiny.

4.3. Cytokeratiny

V nedávné době byla publikována studie, ve které se Hesse a kol. (46) pokusili určit počet genů pro IF s využitím databází NCBI a Celera Genomics. Došli k číslu 65, což řadí IF mezi 100 největších genových rodin v genomu člověka. 49 genů z tohoto množství tvoří geny pro keratiny. Ty se dělí do dvou podskupin, na trichocytární („hair“) keratiny tvořící hlavní část vlasů a jiných kožních derivátů, a na tzv. cytokeratiny, které jsou hlavními strukturními proteiny epitelálních buněk. Protože pro další výklad je relevantní pouze poslední jmenovaná skupina, bude v dalším textu uvažována již jen tato. Některé z uvedených principů jsou však platné i pro rodinu „hair“ keratinů. Cytokeratiny (CK) lze rozdělit na základě jejich molekulové hmotnosti a izoelektrického bodu, které se pohybují v rozsahu 40-68 kDa, resp. pH 5-8, do dvou skupin: na menší kyselé polypeptidy typu I (CK9 – CK23) a větší bazické nebo neutrální proteiny typu II (CK1 – CK8) (47, 48). Do dnešního dne bylo zatím identifikováno 16 genů pro keratiny typu I a 18 genů typu II (46). Zajímavým rysem této skupiny proteinů IF je také fakt, že všechny geny typu I (s výjimkou CK18 nacházejícího se na chromozomu 12 (49)) jsou lokalizovány na chromozomu 17q21 a geny typu II na chromozomu 12q13 (50). Příčinou tohoto stavu je pravděpodobně vznik nových genů genovou duplikací. V lidském genomu bylo také nalezeno 106 pseudogenů a 47 genových fragmentů pro cytokeratiny (46), což může značně komplikovat nalezení vhodných primerů pro PCR. Biologická aktivita cytokeratinů může být regulována buď interakcí se sebou samými (48) nebo různými postranlačními modifikacemi – fosforylací, glykosylací, transglutaminací, ubikvitina-

cí, proteolytickým štěpením, asociací s jinými cytoplazmatickými nebo cytoskeletárními proteiny (51, 52). Jedním z nejdůležitějších principů při tvorbě cytokeratinových filament je však heteropolymerizace (44, 48). Na rozdíl od zbylých tříd proteinů IF vyžadují cytokeratiny partnera z odpovídající skupiny. Tento obligatorní heteropolymerizační proces se odehrává na úrovni dimerů a vždy vyžaduje účast cytokeratinů z obou skupin I a II (např. CK8 a CK18). Cytokeratiny však nepolymerizují s ostatními skupinami IF (44). Místa zprostředkovávající heterodimerizaci cytokeratinů tvorbou svnutých helixů se nachází v centrální („rod“) doméně (48). Dvojice cytokeratinů, které společně tvoří filamenta, jsou poměrně rigidní, nicméně v organismu existuje určitá funkční redundance – např. CK19 je schopen zastoupit CK18 (53). Zajímavou a pro oblast detekce MMTS v onkologii velice důležitou vlastností cytokeratinů je jejich výskyt v epitelálních tkáních. Cytokeratiny se vyskytují většinou ve víceméně omezené skupině epitelálních tkání. Velmi významný je fakt, že při vzniku nádoru z těchto tkání nedochází ke změně spektra exprimovaných cytokeratinů, i když může dojít ke změně množství exprimované mRNA (54). Byl dokonce sestaven určitý „katalog lidských cytokeratinů“ (47).

4.3.1. Cytokeratin 19 je cytoskeletární protein o velikosti 40 kDa. Jeho gen je lokalizován na chromozomu 17q21.2 (obr.2). Expres byla prokázána v širokém spektru normálních i nádorových tkání včetně tkáně prsu, tlustého střeva a odpovídajících nádorů (47). Přítomnost CK19 byla prokázána v primárních nádorech prsu u 10/10 případů (100%), 44/46 (96%) a 44/45 (98%) u stádií I, resp. II a III (55) a u 40/40 (100%) pacientů s invazivní rakovinou prsu (56). Možné využití CK19

Tab. 2: Přehled studií detekujících VNB a MMTS u nádorů prsu za pomoci CK19. Pacienti, kontrolní vzorky: počet pozitivních vzorků/celkový počet; původ vzorku: BM, kostní dřev; PB, periferní krev; LN, lymfatické uzliny; LP, leukoferéza; prognostický význam: a, ano; n, ne; n.u. neurčeno.

Pacienti	Kontrolní vzorky	Reference	Původ vzorku	Prognostický význam
Imunohistochemie				
199/552 (36%)	2/191 (1%)	Braun (60)	BM	a
3/117 (2,6%)		Ikeda (61)	BM	a
10/23 (43%)		Slade (62)	BM	a
10/59 (17%)			PB	a
222/751 (29,6%)	2/191 (1%)			
RT-PCR				
4/27 (14,8%)	1/39 (2,56%)	Datta (63)	PB	a
6/8 (75%)			BM	a
67/145 (46%)	14/51 (27,5%)	Grunewald (56)	PB	n
7/72 (9,72%)	3/30 (10%)	Hu (64)	PB	a
40/117 (34,2%)	0/12 (0%)	Ikeda (61)	BM	a
23/33 (70%)		López-Guerrero (65)	LP	a
29/141 (20,6%)		Shammas (66)	BM	n.u.
22/45 (49%)	5/25 (20%)	Silva (67)	plazma	a
23/60 (38%)	0/45 (0%)	Slade (62)	PB	a
14/23 (61%)	0/30 (0%)		BM	a
19/51 (27,5%)	0/26 (0%)	Stathopoulou (68)	PB	a
44/148 (29,7%)	6/82 (7,3%)	Stathopoulou (69)	PB	a
51/73 (70%)			BM	a
16/33 (48%)		Vanucchi (70)	BM	a
14/33 (42,4%)	5/26 (19%)	Wong (71)	PB	a
24/33 (72%)	5/26 (19%)	Wong (72)	PB	a
70/115 (40,87%)	0/8 (0%)	Zhong (73)	BM	a
	0/96 (0%)		PB	a
7/29 (24,13%)			LP	a
18/26 (69,2%)	0/8 (0%)	Zhong (74)	BM	a
	0/117 (0%)		PB	a
498/1212 (41,1%)	39/621 (6,3%)			

Tab. 3: Přehled studií detekujících VNB a MMTS u kolorektálních nádorů za pomoci CK20. Pacienti, kontrolní vzorky: počet pozitivních vzorků/celkový počet; původ vzorku: BM, kostní dřeň; PB, periferní krev; LN, lymfatické uzliny; prognostický význam: a, ano; n, ne; n.u. neurčeno.

Pacienti	Kontrolní vzorky	Reference	Původ vzorku	Prognostický význam
<i>Imunohistochemie</i>				
25/100 (25%)		Clarke (83)	LN	a
14/33 (42,4%)		Greenson (84)	LN	a
4/11 (45%)		Litle (85)	BM	a
35/64 (54,7%)		Noura (86)	LN	n
47/147 (32%)		Oberg (87)	LN	n
4/41 (10%)		Werther (88)	BM	n
0/38 (0%)			PB	n
32/42 (76,2%)		Yasuda (89)	LN	a
46/53 (86,8%)		Yokoyama (90)	játra	a
207/529 (39,1%)				
<i>RT-PCR</i>				
27/27 (100%)	21/21 (100%)	Bustin (91)	PB	n
1/30 (3,3%)	19/64 (29,6%)	Dimmler (92)	BM	n.u.
6/8 (75%)		Funaki (17)	PB	a
18/28 (64%)	0/11 (0%)	Funaki (93)	PB	a
13/18 (72%)	21/29 (72%)	Champelovier (94)	PB	n
	8/8 (100%)		BM	n
15/35 (42,8%)	0/22 (0%)	Chausovsky (95)	PB	a
	16/53 (30,2%)	Jung (81)	PB	n.u.
	5/14 (35%)		BM	n.u.
31/51 (60,8%)		Rosenberg (96)	LN	a
44/85 (52%)		Rosenberg (97)	LN	a
20/57 (35%)	1/16 (6,3%)	Soeth (98)	BM	a
9/52 (17%)		Soeth (99)	PB	a
20/65 (31%)			BM	a
9/30 (30%)	10/47 (21,3%)	Vlems (79)	PB	a
9/19 (47,3%)	4/15 (26,6%)		BM	a
26/41 (63,4%)		Weitz (100)	PB	a
8/30 (26,7%)			BM	a
63/100 (63%)	1/70 (1,4%)	Wharton (101)	PB	a
12/25 (48%)	1/12 (8,3%)	Wyld (102)	PB	n
331/701 (47,2%)	107/382 (28%)			

jako markeru pro detekci VNB a MMTS však komplikuje jak nelegitimní transkripce v krevních buňkách (57), tak také existence několika pseudogenů a genových fragmentů v lidském genomu (46, 58, 59; Hesse, osobní komunikace). Přesto je cytokeratin 19 velice často využíván k detekci cirkulujících nádorových buněk u nádorů prsu (tab. 2) v lymfatických uzlinách, kostní dřeni a krvi. Poměrně často však také dochází k nálezu mRNA i u kontrolních skupin.

4.3.2. Cytokeratin 20 byl identifikován v roce 1990 jako protein IT, hlavní cytoskeletární polypeptid epitelu lidského střeva (29). Jedná se o protein o velikosti přibližně 46 kDa, jehož gen se nachází na chromozomu 17q21.2 (obr. 2). Imunocytochemicky byl detekován jako významná složka střevního a žaludečního foveolárního epitelu, uroteliálních superficiálních buněk a Merkelových buněk epidermis. Vzácně byly CK20 pozitivní buňky nalezeny v brzlíku, průduškách, žluč-

níku a prostatě. Expres je obecně udržována v primárních i metastatických kolorektálních karcinomech i odvozených buněčných kulturách (29). Expres CK20 v kolorektálním karcinomu byla potřena i v dalších studiích. Moll a kol. detekovali expresi v 89/93 (75) a 50/52 případů (76), Chu a kol. u 20/20 pacientů (77). Chu a kol. uvádí v přehledu literatury pozitivitu CK20 pro různé karcinomy – pro kolorektální adenokarcinom je to 401 pozitivních případů z celkového počtu 426, tj. 94% (77). Tot v podobném přehledu uvádí pozitivitu 177/194 (91%) pro primární a 217/233 (93%) pro metastatické adenokarcinomy tlustého střeva (78). Pravděpodobně však dochází ke snížení exprese cytokeratinů v neoplastické tkáni (54, 79). Z důvodu exprese omezené na gastrointestinální, v menší míře i urogenitální soustavu, a hlavně nepřítomnosti v krevních buňkách, kostní dřeni, lymfatických uzlinách a neexistenci pseudogenů se CK20 jeví jako naprosto ideální marker pro detekci VNB a MMTS v těchto tkáních. Později však byla detekována exprese CK20 v granulocytech (80, 81). Tato ektopická transkripce by mohla vysvětlovat poměrně velké množství falešně pozitivních výsledků. Bylo provedeno množství studií, které se pokoušely detekovat VNB a MMTS v různých tkáních. Výsledky některých z nich jsou uvedeny v tab. 3. V poslední době byl však nalezen CK20 i v jiných než kolorektálních primárních nádorech a příslušných lymfatických uzlinách. Exprimované množství bylo však vždy několikanásobně nižší než u kolorektálního karcinomu (82).

5. Závěr

Přestože CK19 i CK20 mají z hlediska jejich využití jako markerů pro detekci volných nádorových buněk a mikrometastáz řadu nevýhod, v současné době, kdy nejsou známy žádné dostatečně nádorově specifické markery, se stále jeví jako jedny z nejslibnějších. Vzhledem k poměrně vysokému procentu pozitivitě i v kontrolních skupinách však bude nutné používat při stanovení cytokeratinů kvantitativní metody, nejlépe kvantitativní RT-PCR. S tím souvisí také výběr „housekeeping“ genů používaných k normalizaci výsledků. Pravděpodobně bude nutné zavedení nových standardů, protože geny využívané v současné době (především GAPDH) vykazují značnou variabilitu (103). Další otázkou je vlastní prognostický význam detekce nádorových buněk v krvi, resp. kostní dřeni a lymfatických uzlinách. Metastázování je velice neúčinný proces (104) a přítomnost cirkulujících nádorových buněk v krvi nemusí nutně indikovat budoucí vývoj vzdálených metastáz. Proto je nutné význam detekce volných nádorových buněk a mikrometastáz nepřeceňovat, ale zároveň mít na paměti možné dalekosáhlé využití pro individualizaci léčby onkologicky nemocných pacientů a tím zlepšení klinických výsledků.

Práce byla podpořena Výzkumným záměrem MZČR. č. 00020980501

Literatura

1. Ashworth T.R. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. Australian Med J 1869; 14:146.
2. Engell H.C. Cancer cells in the circulating blood. Acta Chir Scand 1955; (Suppl.):201.
3. Christopherson W. Cancer cells in the peripheral blood: a second look. Acta Cytol 1965; 9:169-74.
4. Brown M., Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. Clin Chem 2000; 46(8 Pt 2):1221-9.

5. Friedlander M.L., Hedley D.W., Taylor I.W. Clinical and biological significance of aneuploidy in human tumours. J Clin Pathol 1984; 37(9):961-74.
6. Joensuu H., Kleim P.J. DNA aneuploidy in adenomas of endocrine organs. Am J Pathol 1988; 132(1):145-51.
7. Martinez-Arribas F., Nunez M.J., Piqueras V., Lucas A.R., Sanchez J., Tejerina A., et al. Flow cytometry vs. Ki67 labelling index in breast cancer: a prospective evaluation of 181 cases. Anticancer Res 2002; 22(1A):295-8.

8. Baeten C.I., Wagstaff J., Verhoeven I.C., Hillen H.F., Griffioen A.W. Flow cytometric quantification of tumour endothelial cells; an objective alternative for microvessel density assessment. *Br J Cancer* 2002; 87(3):344-7.
9. Leers M.P., Schoffelen R.H., Hoop J.G., Theunissen P.H., Oosterhuis J.W., vd Bijl H., et al. Multiparameter flow cytometry as a tool for the detection of micrometastatic tumour cells in the sentinel lymph node procedure of patients with breast cancer. *J Clin Pathol* 2002; 55(5):359-66.
10. Rupa J.D., De Bruine A.P., Gerbers A.J., Leers M.P., Nap M., Kessels A.G., et al. Simultaneous detection of apoptosis and proliferation in colorectal carcinoma by multiparameter flow cytometry allows separation of high and low-turnover tumors with distinct clinical outcome. *Cancer* 2003; 97(10):2404-11.
11. Reed D.N., Jr., Johnson J., Richard P., McCormick S., Shannon N., Mikhail R.A., et al. DNA flow cytometry does not predict 5- or 10-year recurrence rates for T1-2 node-negative breast cancer. *Arch Surg* 2000; 135(12):1422-6.
12. Tsavellas G., Huang A., McCullough T., Patel H., Araia R., Allen-Mersh T.G. Flow cytometry correlates with RT-PCR for detection of spiked but not circulating colorectal cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19(6):495-502.
13. Post C., Christensen I.J., Flyger H., Christiansen J., Larsen J.K. Flow cytometric bivariate analysis of DNA and cytokeratin in colorectal cancer. *Anal Cell Pathol* 2002; 24(4-5):113-24.
14. Wimberger P., Hillemanns P., Kapsner T., Hepp H., Kimmig R. Evaluation of prognostic factors following flow-cytometric DNA analysis after cytokeratin labelling: II. Cervical and endometrial cancer. *Anal Cell Pathol* 2002; 24(4-5):147-58.
15. Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230(4732):1350-4.
16. Veres G., Gibbs R.A., Scherer S.E., Caskey C.T. The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science* 1987; 237(4813):415-7.
17. Funaki N.O., Tanaka J., Itami A., Kasamatsu T., Ohshio G., Onodera H., et al. Detection of colorectal carcinoma cells in circulating peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reaction targeting cytokeratin-20 mRNA. *Life Sci* 1997; 60(9):643-52.
18. Holland P.M., Abramson R.D., Watson R., Gelfand D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(16):7276-80.
19. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 1992; 10(4):413-7.
20. Gibson U.E., Heid C.A., Williams P.M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res* 1996; 6(10):995-1001.
21. Heid C.A., Stevens J., Livak K.J., Williams P.M. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6(10):986-94.
22. Livak K.J., Flood S.J., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995; 4(6):357-62.
23. Bustin S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25(2):169-93.
24. Bustin S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 2002; 29(1):23-39.
25. Harris C.C. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88(20):1442-55.
26. McLeod H.L., Murray A.G. Tumour markers of prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1999; 79(2):191-203.
27. Offner S., Schmaus W., Witter K., Baretton G.B., Schlimok G., Passlick B., et al. p53 gene mutations are not required for early dissemination of cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(12):6942-6.
28. van Houten V.M., Tabor M.P., van den Brekel M.W., Denkers F., Wishaupt R.G., Kummer J.A., et al. Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and-neck cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions. *Clin Cancer Res* 2000; 6(10):3803-16.
29. Moll R., Schiller D.L., Franke W.W. Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. *J Cell Biol* 1990; 111(2):567-80.
30. Mori M., Mimori K., Ueo H., Karimine N., Barnard G.F., Sugimachi K., et al. Molecular detection of circulating solid carcinoma cells in the peripheral blood: the concept of early systemic disease. *Int J Cancer* 1996; 68(6):739-43.
31. Weitz J., Kienle P., Lacroix J., Willeke F., Benner A., Lehnert T., et al. Dissemination of tumor cells in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1998; 4(2):343-8.
32. Chelly J., Kaplan J.C., Maire P., Gautron S., Kahn A. Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue. *Nature* 1988; 333(6176):858-60.
33. Chelly J., Concorde J.P., Kaplan J.C., Kahn A. Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(8):2617-21.
34. Kaplan J.C., Kahn A., Chelly J. Illegitimate transcription: its use in the study of inherited disease. *Hum Mutat* 1992; 1(5):357-60.
35. Kimoto Y. A single human cell expresses all messenger ribonucleic acids: the arrow of time in a cell. *Mol Gen Genet* 1998; 258(3):233-9.
36. Mighell A.J., Smith N.R., Robinson P.A., Markham A.F. Vertebrate pseudogenes. *FEBS Lett* 2000; 468(2-3):109-14.
37. Chadderton T., Wilson C., Bewick M., Gluck S. Evaluation of three rapid RNA extraction reagents: relevance for use in RT-PCR's and measurement of low level gene expression in clinical samples. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1997; 43(8):1227-34.
38. Beutler E., Gelbart T., Kuhl W. Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 1990; 9(2):166.
39. Bai X., Fischer S., Keshavjee S., Liu M. Heparin interference with reverse transcriptase polymerase chain reaction of RNA extracted from lungs after ischemia-reperfusion. *Transpl Int* 2000; 13(2):146-50.
40. Holodniy M., Kim S., Katzenstein D., Konrad M., Groves E., Merigan T.C. Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin. *J Clin Microbiol* 1991; 29(4):676-9.
41. Effect of template quality on PCR performance. 1999, 29-31. Available from: URL: <http://www.qiagen.com/literature/brochures/pcr/pdf/pcrcha08.pdf>.
42. Peist R., Honsel D., Twieling G., Löffert D. PCR inhibitors in plant DNA Preparations. *QIAGEN News* 2001; 3:7-9. Available from: URL: http://www.qiagen.com/literature/qiagennews/0301/1017317_QN301_I_TJPDIS-7-9.pdf
43. Hu X.C., Chow L.W. Detection of circulating breast cancer cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Eur J Surg Oncol* 2000; 26(6):530-5.
44. Herrmann H., Aebi U. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cyto-dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12(1):79-90.
45. Lazarides E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 1980; 283(5744):249-56.
46. Hesse M., Magin T.M., Weber K. Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 14):2569-75.
47. Moll R., Franke W.W., Schiller D.L., Geiger B., Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31(1):11-24.
48. Coulombe P.A., Omary M.B. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14(1):110-22.
49. Waseem A., Gough A.C., Spurr N.K., Lane E.B. Localization of the gene for human simple epithelial keratin 18 to chromosome 12 using polymerase chain reaction. *Genomics* 1990; 7(2):188-94.
50. Lander E.S., Linton L.M., Birren B., Nusbaum C., Zody M.C., Baldwin J., et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409(6822):860-921.
51. Coulombe P.A., Bousquet O., Ma L., Yamada S., Wirtz D. The 'ins' and 'outs' of intermediate filament organization. *Trends Cell Biol* 2000; 10(10):420-8.
52. Omary M.B., Ku N.O., Liao J., Price D. Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. *Subcell Biochem* 1998; 31:105-40.
53. Hesse M., Franz T., Tamai Y., Taketo M.M., Magin T.M. Targeted deletion of keratins 18 and 19 leads to trophoblast fragility and early embryonic lethality. *Embo J* 2000; 19(19):5060-70.
54. Wildt S., Kleeff J., Maruyama H., Maurer C.A., Friess H., Buchler M.W., et al. Characterization of cytokeratin 20 expression in pancreatic and colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1999; 5(10):2840-7.
55. Malzahn K., Mitze M., Thoenes M., Moll R. Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas. *Virchows Arch* 1998; 433(2):119-29.
56. Grunewald K., Haun M., Urbanek M., Fiegl M., Muller-Holzner E., Gunsilius E., et al. Mammaglobin gene expression: a superior marker of breast cancer cells in peripheral blood in comparison to epidermal-growth-factor receptor and cytokeratin-19. *Lab Invest* 2000; 80(7):1071-7.
57. Lopez-Guerrero J.A., Bolufer-Gilbert P., Sanz-Alonso M., Barragan-Gonzalez E., Palau-Perez J., De la Rubia-Comos J., et al. Minimal illegitimate levels of cytokeratin K19 expression in mononucleated blood cells detected by a reverse transcription PCR method (RT-PCR). *Clin Chim Acta* 1997; 263(1):105-16.
58. Ruud P., Fodstad O., Hovig E. Identification of a novel cytokeratin 19 pseudogene that may interfere with reverse transcriptase-polymerase chain reaction assays used to detect micrometastatic tumor cells. *Int J Cancer* 1999; 80(1):119-25.
59. Savtchenko E.S., Schiff T.A., Jiang C.K., Freedberg I.M., Blumenberg M. Embryonic expression of the human 40-kD keratin: evidence from a processed pseudogene sequence. *Am J Hum Genet* 1988; 43(5):630-7.
60. Braun S., Pantel K., Muller P., Janni W., Hepp F., Kantenich C.R., et al. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. *N Engl J Med* 2000; 342(8):525-33.
61. Ikeda N., Miyoshi Y., Motomura K., Inaji H., Koyama H., Noguchi S. Prognostic significance of occult bone marrow micrometastases of breast cancer detected by quantitative polymerase chain reaction for cytokeratin 19 mRNA. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91(9):918-24.
62. Slade M.J., Smith B.M., Sinnott H.D., Cross N.C., Coombes R.C. Quantitative polymerase chain reaction for the detection of micrometastases in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17(3):870-9.
63. Datta Y.H., Adams P.T., Drobyski W.R., Ethier S.P., Terry V.H., Roth M.S. Sensitive detection of occult breast cancer by the reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994; 12(3):475-82.
64. Hu X.C., Chow L.W. Detection of circulating breast cancer cells with multiple-marker RT-PCR assay. *Anticancer Res* 2001; 21(1A):421-4.

65. Lopez-Guerrero J.A., Gilabert P.B., Gonzalez E.B., Sanz Alonso M.A., Perez J.P., Talens A.S., et al. Use of reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for carcinoembryonic antigen, cytokeratin 19, and maspin in the detection of tumor cells in leukapheresis products from patients with breast cancer: comparison with immunocytochemistry. *J Hematother* 1999; 8(1):53-61.
66. Shammal F.V., Deak E., Nysted A., van Eekelen J.A., Osland A., Heikkilä R. Serial quantitative PCR analysis of bone marrow samples from breast cancer patients to monitor systemic micrometastases. *Anticancer Res* 2001; 21(3C):2099-106.
67. Silva J.M., Dominguez G., Silva J., Garcia J.M., Sanchez A., Rodriguez O., et al. Detection of epithelial messenger RNA in the plasma of breast cancer patients is associated with poor prognosis tumor characteristics. *Clin Cancer Res* 2001; 7(9):2821-5.
68. Stathopoulou A., Angelopoulou K., Perraki M., Georgoulis V., Malamos N., Lianidou E. Quantitative RT-PCR luminometric hybridization assay with an RNA internal standard for cytokeratin-19 mRNA in peripheral blood of patients with breast cancer. *Clin Biochem* 2001; 34(8):651-9.
69. Stathopoulou A., Vlachonikolis I., Mavroudis D., Perraki M., Kouroussis C., Apostolaki S., et al. Molecular detection of cytokeratin-19-positive cells in the peripheral blood of patients with operable breast cancer: evaluation of their prognostic significance. *J Clin Oncol* 2002; 20(16):3404-12.
70. Vannucchi A.M., Bosi A., Glinz S., Pacini P., Linari S., Saccardi R., et al. Evaluation of breast tumour cell contamination in the bone marrow and leukapheresis collections by RT-PCR for cytokeratin-19 mRNA. *Br J Haematol* 1998; 103(3):610-7.
71. Wong I.H., Yeo W., Chan A.T., Johnson P.J. Quantitative relationship of the circulating tumor burden assessed by reverse transcription-polymerase chain reaction for cytokeratin 19 mRNA in peripheral blood of colorectal cancer patients with Dukes' stage, serum carcinoembryonic antigen level and tumor progression. *Cancer Lett* 2001; 162(1):65-73.
72. Wong I.H., Yeo W., Chan A.T., Johnson P.J. Quantitative correlation of cytokeratin 19 mRNA level in peripheral blood with disease stage and metastasis in breast cancer patients: potential prognostic implications. *Int J Oncol* 2001; 18(3):633-8.
73. Zhong X.Y., Kaul S., Diel I., Eichler A., Bastert G. Analysis of sensitivity and specificity of cytokeratin 19 reverse transcriptase/polymerase chain reaction for detection of occult breast cancer in bone marrow and leukapheresis products. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125(5):286-91.
74. Zhong X.Y., Kaul S., Lin Y.S., Eichler A., Bastert G. Sensitive detection of micrometastases in bone marrow from patients with breast cancer using immunomagnetic isolation of tumor cells in combination with reverse transcriptase/polymerase chain reaction for cytokeratin-19. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126(4):212-8.
75. Moll R., Lowe A., Laufer J., Franke W.W. Cytokeratin 20 in human carcinomas. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. *Am J Pathol* 1992; 140(2):427-47.
76. Moll R., Zimbelmann R., Goldschmidt M.D., Keith M., Laufer J., Kasper M., et al. The human gene encoding cytokeratin 20 and its expression during fetal development and in gastrointestinal carcinomas. *Differentiation* 1993; 53(2):75-93.
77. Chu P., Wu E., Weiss L.M. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. *Mod Pathol* 2000; 13(9):962-72.
78. Tot T. Cytokeratins 20 and 7 as biomarkers: usefulness in discriminating primary from metastatic adenocarcinoma. *Eur J Cancer* 2002; 38(6):758-63.
79. Vlems F.A., Diepstra J.H., Cornelissen I.M., Ruers T.J., Ligtenberg M.J., Punt C.J., et al. Limitations of cytokeratin 20 RT-PCR to detect disseminated tumour cells in blood and bone marrow of patients with colorectal cancer: expression in controls and downregulation in tumour tissue. *Mol Pathol* 2002; 55(3):156-63.
80. Vlems F., Soong R., Diepstra H., Punt C., Wobbes T., Tabiti K., et al. Effect of blood sample handling and reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay sensitivity on detection of CK20 expression in healthy donor blood. *Diagn Mol Pathol* 2002; 11(2):90-7.
81. Jung R., Petersen K., Kruger W., Wolf M., Wagener C., Zander A., et al. Detection of micrometastasis by cytokeratin 20 RT-PCR is limited due to stable background transcription in granulocytes. *Br J Cancer* 1999; 81(5):870-3.
82. Soong R., Beyser K., Basten O., Kalbe A., Rueschoff J., Tabiti K. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction detection of cytokeratin 20 in noncolorectal lymph nodes. *Clin Cancer Res* 2001; 7(11):3423-9.
83. Clarke G., Ryan E., O'Keane J.C., Crowe J., MacMathuna P. The detection of cytokeratins in lymph nodes of Duke's B colorectal cancer subjects predicts a poor outcome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2000; 12(5):549-52.
84. Greenson J.K., Isenhardt C.E., Rice R., Mojzsis C., Houchens D., Martin E.W., Jr. Identification of occult micrometastases in pericolic lymph nodes of Duke's B colorectal cancer patients using monoclonal antibodies against cytokeratin and CC49. Correlation with long-term survival. *Cancer* 1994; 73(3):563-9.
85. Little V.R., Warren R.S., Moore D., 2nd, Pallavicini M.G. Molecular cytogenetic analysis of cytokeratin 20-labeled cells in primary tumors and bone marrow aspirates from colorectal carcinoma patients. *Cancer* 1997; 79(9):1664-70.
86. Noura S., Yamamoto H., Ohnishi T., Masuda N., Matsumoto T., Takayama O., et al. Comparative detection of lymph node micrometastases of stage II colorectal cancer by reverse transcriptase polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Clin Oncol* 2002; 20(20):4232-41.
87. Oberg A., Stenling R., Tavelin B., Lindmark G. Are lymph node micrometastases of any clinical significance in Dukes Stages A and B colorectal cancer? *Dis Colon Rectum* 1998; 41(10):1244-9.
88. Werther K., Normark M., Brunner N., Nielsen H.J. Cytokeratin-positive cells in preoperative peripheral blood and bone marrow aspirates of patients with colorectal cancer. *Scand J Clin Lab Invest* 2002; 62(1):49-57.
89. Yasuda K., Adachi Y., Shiraishi N., Yamaguchi K., Hirabayashi Y., Kitano S. Pattern of lymph node micrometastasis and prognosis of patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2001; 8(4):300-4.
90. Yokoyama N., Shirai Y., Ajioka Y., Nagakura S., Suda T., Hatakeyama K. Immunohistochemically detected hepatic micrometastases predict a high risk of intrahepatic recurrence after resection of colorectal carcinoma liver metastases. *Cancer* 2002; 94(6):1642-7.
91. Bustin S.A., Gyselman V.G., Williams N.S., Dorudi S. Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 1999; 79(11-12):1813-20.
92. Dimmler A., Gerhards R., Betz C., Gunther K., Reingruber B., Horbach T., et al. Transcription of cytokeratins 8, 18, and 19 in bone marrow and limited expression of cytokeratins 7 and 20 by carcinoma cells: inherent limitations for RT-PCR in the detection of isolated tumor cells. *Lab Invest* 2001; 81(10):1351-61.
93. Funaki N.O., Tanaka J., Ohshio G., Onodera H., Maetani S., Imamura M. Cytokeratin 20 mRNA in peripheral venous blood of colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer* 1998; 77(8):1327-32.
94. Champelovier P., Mongelard F., Seigneurin D. CK20 gene expression: technical limits for the detection of circulating tumor cells. *Anticancer Res* 1999; 19(3A):2073-8.
95. Chausovsky G., Luchansky M., Figer A., Shapira J., Gottfried M., Novis B., et al. Expression of cytokeratin 20 in the blood of patients with disseminated carcinoma of the pancreas, colon, stomach, and lung. *Cancer* 1999; 86(11):2398-405.
96. Rosenberg R., Hoos A., Mueller J., Nekarda H. Impact of cytokeratin-20 and carcinoembryonic antigen mRNA detection by RT-PCR in regional lymph nodes of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer* 2000; 83(10):1323-9.
97. Rosenberg R., Hoos A., Mueller J., Baier P., Stricker D., Werner M., et al. Prognostic significance of cytokeratin-20 reverse transcriptase polymerase chain reaction in lymph nodes of node-negative colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 2002; 20(4):1049-55.
98. Soeth E., Roder C., Juhl H., Kruger U., Kremer B., Kalthoff H. The detection of disseminated tumor cells in bone marrow from colorectal cancer patients by a cytokeratin-20-specific nested reverse-transcriptase-polymerase-chain reaction is related to the stage of disease. *Int J Cancer* 1996; 69(4):278-82.
99. Soeth E., Vogel I., Roder C., Juhl H., Marxsen J., Kruger U., et al. Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. *Cancer Res* 1997; 57(15):3106-10.
100. Weitz J., Koch M., Kienle P., Schrodel A., Willeke F., Benner A., et al. Detection of hematogenic tumor cell dissemination in patients undergoing resection of liver metastases of colorectal cancer. *Ann Surg* 2000; 232(1):66-72.
101. Wharton R.Q., Jonas S.K., Glover C., Khan Z.A., Klokouzas A., Quinn H., et al. Increased detection of circulating tumor cells in the blood of colorectal carcinoma patients using two reverse transcription-PCR assays and multiple blood samples. *Clin Cancer Res* 1999; 5(12):4158-63.
102. Wyld D.K., Selby P., Perren T.J., Jonas S.K., Allen-Mersh T.G., Wheeldon J., et al. Detection of colorectal cancer cells in peripheral blood by reverse-transcriptase polymerase chain reaction for cytokeratin 20. *Int J Cancer* 1998; 79(3):288-93.
103. Steele B.K., Meyers C., Ozbun M.A. Variable expression of some "housekeeping" genes during human keratinocyte differentiation. *Anal Biochem* 2002; 307(2):341-7.
104. Chambers A.F., Groom A.C., MacDonald I.C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(8):563-72.