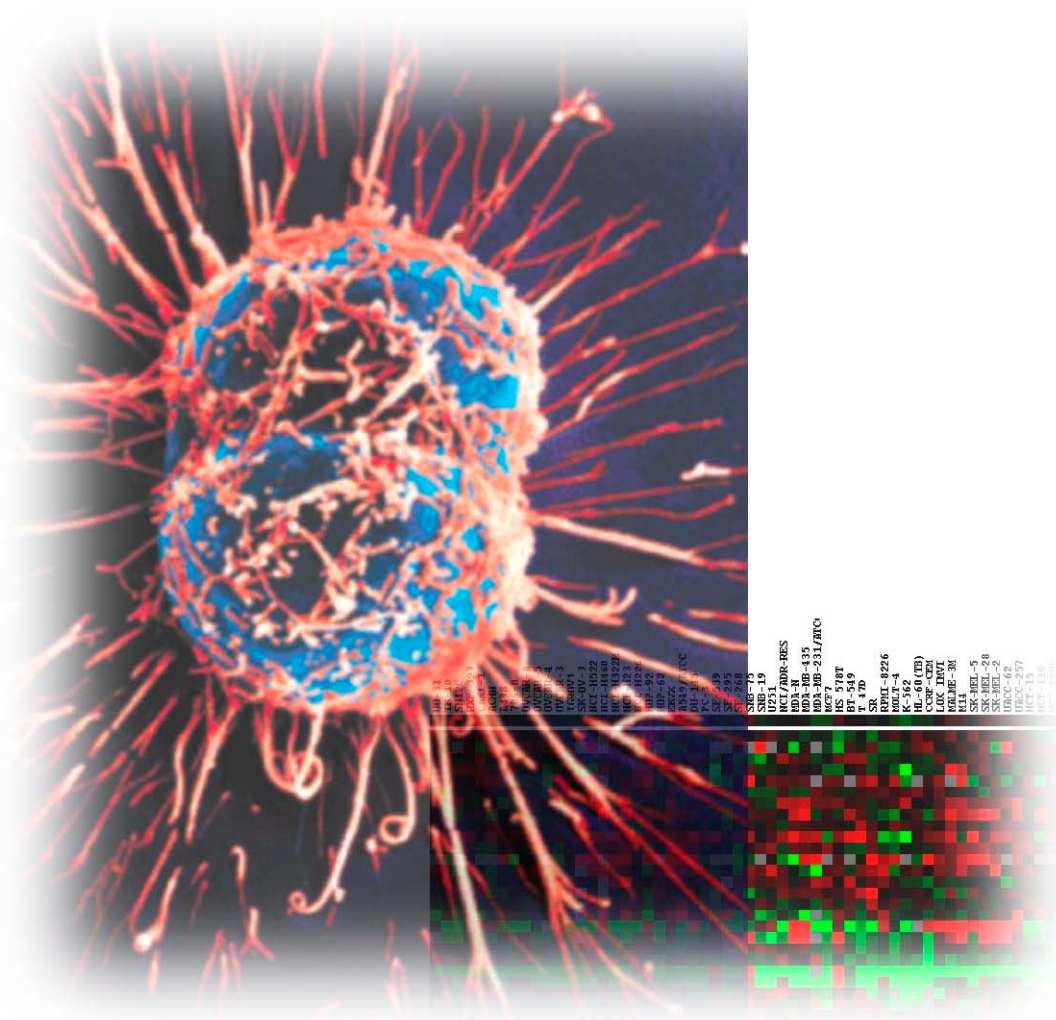


Molekulare Onkologie

Serviceübersicht (09/2006)



Inhalt

- ▶ Einführung in die Molekulare Tumordiagnostik
- ▶ Übersicht unserer Dienstleistungen
- ▶ Isolierung von Tumorzellen aus dem Blut
- ▶ Molekulare Analyse der isolierten Tumorzellen
- ▶ Therapiewirkung und Chemoresistenz
- ▶ Untersuchungen für alternative Therapien
 - Hyperthermie
 - Immuno – Modulation („Molekularer NK-Test“)
- ▶ Früherkennung von Krebs
- ▶ Diagnostische Untersuchungen für Hämatologische Malignome
- ▶ Benötigte Materialien für die Untersuchungen
- ▶ Tabelle: Chemotherapeutische Medikamente und ihre Resistenz-Marker
- ▶ Anhang 1: Beschreibung der Genfunktionen und Referenzen
- ▶ Anhang 2: Hinweise zur Blutabnahme

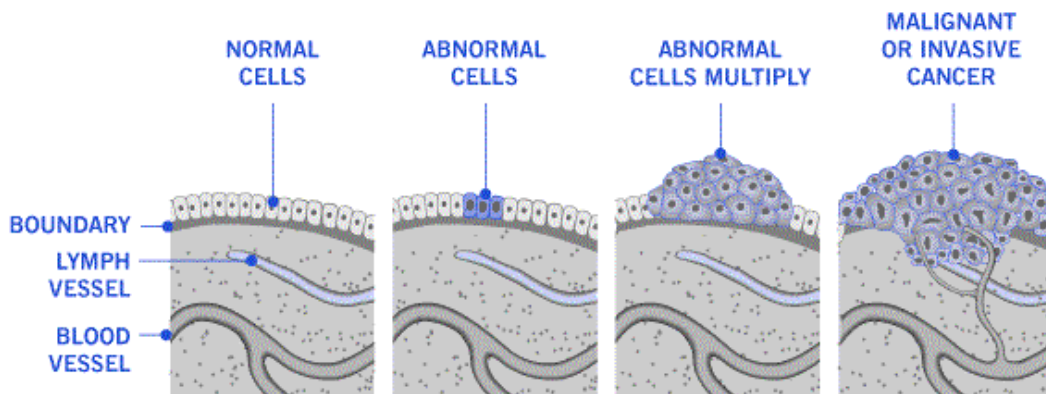
Kontakt:

Gemeinschaftspraxis Recklinghausen, Berghäuser Strasse 295, D-45659 Recklinghausen, Germany.
Tel. +49 2361 3000-0. Fax: +49 2361 72288. E-mail: bachg@labor-re.de. Internet: www.labor-re.de

Einführung in die Molekulare Tumordiagnostik

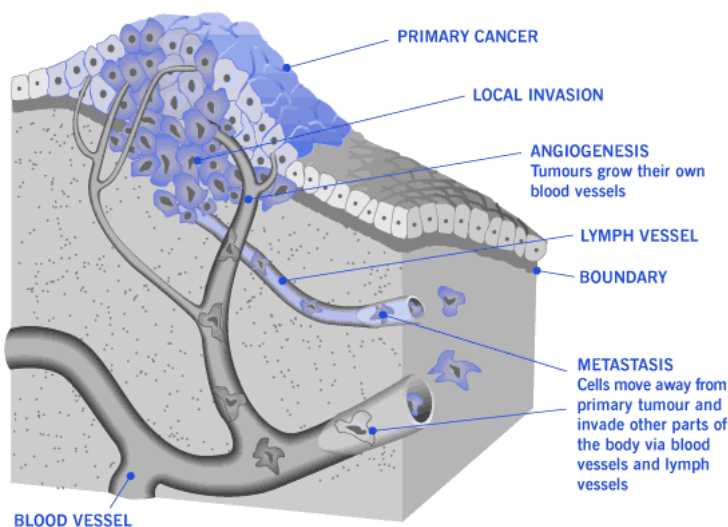
Fast alle menschlichen Zellen enthalten DNS-Moleküle (DNS: Deoxyribonucleinsäure). Die DNS enthält die Erbinformation – die Gene. Die Gene kontrollieren alle biologischen Abläufe des Körpers wie Wachstum, Zellteilung und den programmierten Zelltod (Apoptose). In Tumoren kommt es durch Beschädigungen und Veränderungen (Alterationen) der zellulären DNS zu unkontrolliertem Wachstum und zur Zellvermehrung. Diese genetischen Alterationen sind üblicherweise komplex und vielgestaltig.

Anfangs wächst der Tumor nur lokal begrenzt. Wird der Tumor allerdings größer und erlangt weitere genetische Alterationen, kann er invasiv über die lokale Begrenzung hinauswachsen und schließlich metastasieren.



Bildquelle: The Cancer Council Victoria

Während des Metastasierungsprozesses wandern aus dem Primärtumor Krebszellen in das Lymphdrüsen- und Blutgefäßsystem. Dadurch werden die Krebszellen in entfernte Körperregionen transportiert, in denen dann Metastasen entstehen können.



Mit modernen Methoden der molekularen Genetik konnten die unterschiedlichen genetischen Veränderungen identifiziert werden, die für die Krebsentstehung verantwortlich sind. Für diagnostische Zwecke kann dieses Wissen zum Nachweis von Tumorzellen genutzt werden. Es

sind viele molekulare Marker für den Nachweis von im Blut zirkulierenden Tumorzellen bekannt. Aus unserem umfangreichen Analysenspektrum stellen wir in Abhängigkeit von der Art des Tumors und der Fragestellung eine für den jeweiligen Patienten spezifische Analysen-Kombination zusammen.

Zum molekularen Nachweis zirkulierender Tumorzellen stehen verschiedene Strategien zur Verfügung:

- Da Karzinome epithelialen Ursprungs sind und epitheliale Zellen normalerweise im Blut nicht vorkommen, kann der Nachweis epithelialer Zellen im Blut auf zirkulierende Karzinomzellen hinweisen. Bestimmte Cytokeratin-Gene (z.B. CK19, CK20), werden epithelien-spezifisch exprimiert und sind geeignete Marker für bestimmte Karzinome.
- In Abhängigkeit vom Ursprungsgewebe des Tumors können Gene im Blut nachgewiesen werden, die für spezielle Organfunktionen kodieren. Zum Beispiel kann der Nachweis von Zellen, die das prostataspezifische Antigen (PSA) aufweisen, hinweisend auf zirkulierende Prostata-Karzinomzellen sein.
- Ein weiterer Ansatz zur Identifizierung zirkulierender Tumorzellen ist der Nachweis typischer krebsartiger Aberrationen wie Mutationen in Onkogenen (z.B. K-ras), Allelverluste (LOH) oder die übermäßige Expression einzelner Gene (z.B. erb-b2, EGFR). Auch die tumorspezifische Reaktivierung von Genen, die in normalem Gewebe nicht aktiv sind, (z.B. Telomerase, G250) kann diagnostisch genutzt werden. Des Weiteren sind Enzyme mit antioxidativen Funktionen (z.B. MnSOD oder Thioredoxin-Reduktase) häufig in menschlichen Tumoren überexprimiert*.
- Eine typische molekulare Eigenschaft von Tumoren ist die Inaktivierung von Tumorsuppressoren (Gene, die einer Zellteilung entgegenwirken), die häufig durch den Mechanismus der Promotor-Hypermethylierung erreicht wird und ebenfalls diagnostisch zum Tumorzellnachweis genutzt werden kann.

Informationen über die veränderten Stoffwechseleigenschaften der Tumorzellen und das Vorkommen von Resistenzfaktoren sind für die Auswahl geeigneter Therapien von Bedeutung. Für viele Krebs-Medikamente sind Stoffwechseleenzyme bekannt, deren unterschiedliche Expression in Tumorzellen den Therapieeffekt beeinflussen können. Die Auflistung am Ende dieser Broschüre beschreibt die Beziehungen zwischen Genen und Medikamenten.

Eine neue Generation von Medikamenten ist gegen ein bestimmtes Zielmolekül (sog. „Drug-Target“) gerichtet (z.B. Herceptin, Erbitux oder Gleevec). Diese Medikamente sind zumeist sehr effektiv und rufen mildere Nebenwirkungen hervor als die klassischen Substanzen. Eine Therapie mit diesen spezifischen Therapeutika erscheint aber oft nur sinnvoll, wenn diese molekularen „Drug-Targets“ in den Tumorzellen auch vermehrt vorhanden sind. Wir bestimmen mit genetischen Nachweisverfahren, welche „Drug-Targets“ in den isolierten Tumorzellen exprimiert sind und ob somit eine Therapie mit derartigen Medikamenten sinnvoll ist.

*Hinweise auf weiterführende Fachliteratur:

Lincoln D. The Thioredoxin-Thioredoxin reductase system: over-expression in human cancer. Anticancer research. 2003; 23; 2425-2434.

Comment: Increased levels of thioredoxin (TRX) positively correlate with thioredoxin reductase (TR) expression. Aggressive tumors over-express both TRX and TR.

Übersicht

Die Entdeckung spezifischer genetischer Veränderungen in malignen Tumoren hat der Krebsforschung wichtige Impulse gegeben. Erkenntnisse zur Funktion von Tumorgenen und Tumorproteinen haben entscheidend zum Verständnis der molekularen und zellbiologischen Grundlagen des malignen Wachstums beigetragen. Basierend auf diesen Grundlagen führen wir in unserem Labor molekularbiologische Untersuchungen von Tumorgenen und Tumorproteinen durch, die für die Entstehung und Progression menschlicher Tumoren von Bedeutung sind. Wir beschränken uns dabei auf folgende Aspekte:

- ▶ Tumorfrüherkennung
- ▶ Resttumor-Analysen
- ▶ Therapiesensitivität

Si ist es möglich mit molekularbiologischen Methoden Krebszellen aus dem peripheren Blut eines Patienten zu isolieren und genetisch zu charakterisieren. Dies ermöglicht es, Patienten mit schlechter Prognose frühzeitig zu identifizieren. Ebenso ist es möglich Resistenzfaktoren von Tumoren zu identifizieren, die Entscheidungshilfen zur weiteren Therapie der Tumorerkrankung geben können:

- ▶ Frühzeitiger Behandlungsbeginn
- ▶ Gezielte Therapie
- ▶ Resistenzerkennung

Wir analysieren die relevanten Marker je nach Fragestellung in Tumorgewebe, Blut, in angereicherten Zellen aus dem Blut, Urin, Lavagen, Sputum, Stuhl und Knochenmark. Die entsprechenden speziellen Probengefäße fordern Sie bitte bei uns im Labor an, ebenso weitere Informationen zu Transport, Analysen und Preise.

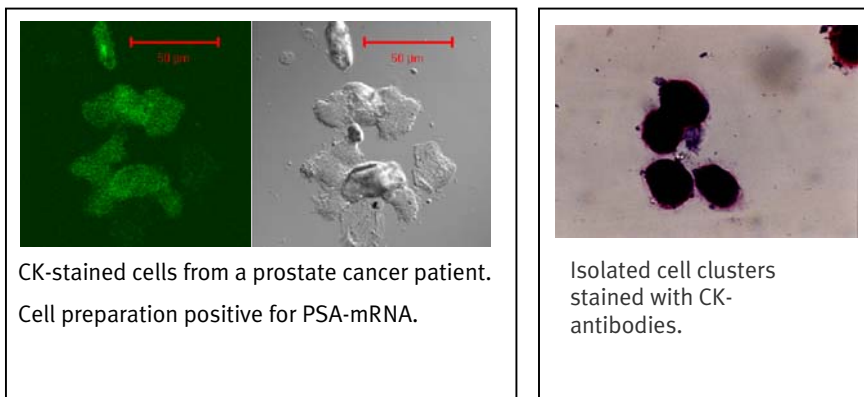
Isolierung von Tumorzellen aus dem Blut

Die Isolierung von Tumorzellen aus dem Blutstrom kann auf zwei Arten durchgeführt werden:

- ▶ mit „Immunobeads“ und „Immuno-chemical staining“ (Anfärben)
- ▶ durch Filtriertechnik

Isolierung von Tumorzellen aus dem Blutstrom durch Filtration

Karzinome sind Tumore epithelialer Herkunft. Epitheliale Zellen sind gewöhnlich größer als Blutzellen. Die kleineren Blutzellen können anhand ihres Größenunterschieds von den größeren Karzinomzellen getrennt werden. Des Weiteren kommen ausgestreute Krebszellen im Blutkreislauf häufig als Aggregate mehrerer Zellen vor – sogenannte Mikrometastasen. Deshalb ist das Prinzip der Isolierung von Mikrometastasen aus Körperflüssigkeiten durch Filtrierung weit verbreitet. Wir nutzen eine optimierte Filtrierungstechnik, welche die klumpigen Mikrometastasen zurückhält und die gewöhnlichen Blutzellen größtenteils auswäscht. Die unteren Bilder zeigen isolierte mutmaßliche Tumorzellen, die eine positive Cytokeratin-Färbung aufweisen. Die Zellen wurden durch Filtrierungstechnik aus dem Blutstrom von Krebspatienten isoliert.



Nach der Isolierung werden die filtrierte Zellen einer molekularen Analyse unterzogen, um die krebsartige Natur dieser Zellen zu bestätigen und eine molekulare Chemoresistenz einzuschätzen.

Hinweise auf weiterführende Fachliteratur:

Hirte HW, et al. A rapid and simple method for the purification of tumor cells from ascitic fluid of ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 1992 Mar;44(3):223-6.

Rostagno P, et al. Detection of rare circulating breast cancer cells by filtration cytometry and identification by DNA content: sensitivity in an experimental model. *Anticancer Res.* 1997 Jul-Aug;17(4A):2481-5.

Molekulare Analyse isolierter Tumorzellen

Sind die mutmaßlichen Mikrometastasen aus dem Blutstrom isoliert, erfolgt der Nachweis ihrer Malignität durch genetische Analysen. Wir nutzen mit der sog. „real-time“ quantitativen PCR ein sehr sensitives Verfahren, um die für zirkulierende Krebszellen typischen Merkmale zu identifizieren. Die mit unseren Methoden aus dem Patientenblut isolierten Mikrometastasen weisen oft die für Krebszellen typischen genetischen Alterationen auf. Aus vielen wissenschaftliche Studien ist bekannt, dass die Anwesenheit von Tumorzellen im Blutstrom ein Risikofaktor für die Entstehung von Metastasen ist und einen ungünstigen Prognosefaktor darstellt. Diese Patienten können von weiteren Therapien zur Vermeidung des Fortschreitens der Krankheit profitieren.

Hinweise auf weiterführende Fachliteratur:

Koch M, et al. Detection of hematogenous tumor cell dissemination predicts tumor relapse in patients undergoing surgical resection of colorectal liver metastases. *Ann Surg.* 2005 Feb;241(2):199-205.

Comment: This is the first study demonstrating that detection of hematogenous tumor cell dissemination during hepatic resection of colorectal cancer metastases predicts tumor relapse.

Cristofanilli M, et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2004 Aug 19;351(8):781-91.

Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and clinical importance of micrometastatic disease. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Jul 7;91(13):1113-24. Review.

Therapiewirkung und Chemoresistenz

Zur Behandlung von Krebs steht eine große Zahl an Therapeutika aus unterschiedlichen Wirkstoffgruppen zur Verfügung. Je nach Tumor kommen unterschiedliche Medikamente oder Medikamentenkombinationen zum Einsatz. Die Effizienz dieser Therapieregime wird gewöhnlich in klinische Studien erprobt und statistisch ausgewertet. Der einzelne Patient kann jedoch individuell unterschiedlich auf jede Therapie reagieren und es ist schwierig die bestgeeignetste von möglichen Behandlungsoptionen auszuwählen. Der Nachweis von Resistenzmerkmalen der Tumorzellen kann bei der Auswahl der Medikamente helfen, die mit höherer Wahrscheinlichkeit bei einem individuellen Patienten effektiv sind.

Wir führen an isolierten Tumorzellen genetische Analysen von Genen des Medikamenten-Metabolismus und von molekularen „Drug-Target“ Genen durch. Die Expression dieser Gene wird durch das sehr sensitive Verfahren der „real-time“ quantitative PCR bestimmt. Aus der wissenschaftlichen Literatur ist bekannt, dass die Expression der Gene des Medikamenten-Metabolismus in Tumorzellen die Wirkung eines Medikamentes beeinflusst.

Bestimmte Medikamente wirken sehr spezifisch auf zelluläre Moleküle, sogenannte „Drug-Targets“, d.h. Medikamenten-Zielmoleküle. Eine effektive Reaktion auf diese Medikamente erfordert, dass diese Zielmoleküle auch in den Zellen vermehrt exprimiert sind. Diesen Nachweis können wir mit unseren genetischen Untersuchung erbringen.

Nachdem der ursprüngliche Tumor entfernt wurde, sollen mit adjuvanten (unterstützenden) Therapien verbleibende Krebszellen (Mikrometastasen) eliminiert werden. Diese Mikrometastasen sind verantwortlich für die Rezidivierung oder Metastasenbildung und sind

daher die Zielzellen der adjuvanten Therapie. Molekulare Analysen von Tumoren haben gezeigt, dass diese sehr heterogen sind. Sie bestehen nicht aus identischen Krebszellen, sondern aus Gruppen von Zellen mit verschiedenen genetischen Alterationen. Die in den Blutstrom ausgestreuten Zellen, welche die Mikrometastasen bilden, sind daher nicht mit dem Großteil der Zellen des Primärtumors genetisch identisch. Das bestätigen auch eine Reihe neuer Forschungsarbeiten. Unsere Strategie ist daher, Chemoresistenzanalysen nicht nur am Primärtumor durchzuführen, sondern an aus dem Blut isolierten Mikrometastasen. Eine gegen die ausgestreuten Krebszellen zielgerichtete Therapie kann ein vielversprechenderer Weg sein die Entstehung von Rückfällen und Metastasen zu vermeiden. Die Behandlungserfolge unserer klinischen Kooperationspartner, welche Therapien gemäß unserer analytischen Ergebnisse auswählen, überzeugen uns, dass unser Vorgehen sinnvoll ist. Darüber hinaus gibt es viele unterstützende Hinweise aus der wissenschaftlichen Literatur, die die Grundsätze unserer Strategie bestätigen*. Momentan ist zwar keine wissenschaftliche Studie verfügbar, welche den Nutzen unserer Analysen beweist, aber Fallbeispiele bestätigen den vielfachen Erfolg dieser Untersuchungen.

Neben den metabolischen Eigenschaften der Tumorzellen bestehen aber noch andere kritische Faktoren, weshalb der Tumor nicht immer so reagiert, wie die Ergebnisse unserer Chemosensitivitätstest vermuten lassen:

- ▶ Nach systemischer Verabreichung der Medikamente ist nicht gewährleistet, dass auch alle Tumorzellen in gleichem Maße erreicht werden.
- ▶ Wie die Medikamente im Körper abgebaut und ausgeschieden werden kann von Patient zu Patient variieren.
- ▶ Es könnten mehrere Varianten von Tumorzellen vorliegen, welche sich bezüglich ihrer Chemosensitivität unterschiedlich verhalten.
- ▶ Einige Zellen könnten über unbekannte, in der Messung nicht erfasste, genetische Mechanismen verfügen, welche sie resistent machen.
- ▶ Während der Therapie können in den Tumorzellen weitere genetische Veränderungen entstehen, welche in der Folge zur Selektion resistenter Klone führen könnten.

Folglich können nur partielle Wirkungen auftreten und nicht notwendigerweise eine komplette Remission – entgegen der Ergebnisse des *in vitro*-Chemosensitivitätstests. Da *in vitro*-Tests wegen der genannten Gründe nicht unfehlbar sind, sollten unsere Untersuchungsergebnisse nicht dazu führen, die Durchführung einer Chemotherapie abzulehnen, insbesondere wenn eine mutmaßlich wirksame Therapie bisher noch nicht versucht wurde. Vielmehr können diese Tests dazu beitragen, aus verfügbaren Therapieoptionen die Medikamente auszuwählen, welche effektiver sind als andere. Falls eine Resistenz gegen ein Medikament vorliegt, kann die Testung helfen, einen anderen, wirksameren Wirkstoff zu finden.

*Hinweise auf weiterführende Fachliteratur:

Adlard JW, et al.: Prediction of the response of colorectal cancer to systemic therapy. *Lancet Oncol.* 2002 Feb;3(2):75-82. Review.

Holland-Frei Cancer Medicine 6th edition (April 2003): by Donald W., Md Kufe, Raphael E., Md Pollock, Ralph R., Md Weichselbaum, Robert C., Jr., Md Bast, Ted S., MD Gansler By BC Decker. Section 12: Chemotherapeutic agents.

Schmidt-Kittler O, et al. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jun 24;100(13):7737-42.

Welche Arten von Tumoren können getestet werden

Die meisten Tumortypen können getestet werden, wie z.B. Karzinome der Lunge, Kolon, Brust, Eierstock, Zervix (Gebärmutter), Prostata, Haut, Intestinaltrakt (Magen und Darm), Ösophagus (Speiseröhre), Leber und Niere. Neben diesen am häufigsten vorkommenden Tumorerkrankungen, können auch seltenere Tumore getestet werden. Bitte fragen Sie in solchen speziellen Fällen an.

Hämatologische Tumore können auf typische chromosomale Strukturänderung untersucht werden, so dass minimale Mengen verbleibender Leukämiezellen im Blutstrom entdeckt werden können und die Effizienz der Behandlung beobachtet werden kann. Ist die Therapie effektiv, sollten die Leukämiezellen aus dem Blutstrom eliminiert werden. Zudem können die aufgrund von chromosomale Strukturänderung abgegrenzten Leukämie-Subtypen unterschiedlich empfindlich für bestimmte Therapien sein (s. u. Kapitel „*Diagnostische Untersuchungen für Hämatologische Malignome*“).

Untersuchungen für alternative Therapien

Hyperthermie

Studienergebnisse zeigen, dass die Hyperthermiebehandlung (Wärmetherapie) die Effizienz einer Chemotherapie oder Bestrahlung erhöhen kann. Hyperthermie wird erfolgreich in Kombination mit einer Chemotherapie oder Bestrahlung bei der Behandlung maligner Tumore eingesetzt. Ein limitierender Faktor für die Effizienz der Hyperthermie-Behandlung ist das Vorliegen einer Thermoresistenz in den Tumorzellen. Verantwortlich für die Thermoresistenz ist die erhöhte Menge von Hitze-Schock-Proteinen (HSP) in den Tumorzellen. Wir können anhand der Expression entsprechender Gene die HSP-Menge bewerten und dadurch die Anwendungsmöglichkeit der Hyperthermie einschätzen.

In diesem Zusammenhang sind Medikamente verfügbar, welche die HSP unterdrücken, wie z.B. das Flavonoid Quercetin.

Immunmodulation

Neben chemotherapeutischen oder hormonellen Therapien, welche direkt gegen maligne Zellen gerichtet sind, haben einige alternative Behandlungen das Ziel, die Immunzellen des Körpers zu stimulieren und das Immunsystem zu stärken, um den Tumor zu bekämpfen. Hierbei werden diverse immun-modulierende Wirkstoffe eingesetzt, wie zum Beispiel:

- ▶ Pflanzen: Mistelextrakte, Extrakte aus Echinacea oder Thuja
- ▶ Thymusextrakte: Thymosin, Thymojekt
- ▶ Peptide: AF-2

All diese Wirkstoffe haben die Fähigkeit zur Stimulation und Aktivierung der Natürlichen Killerzellen (NK). NK-Zellen gehören zu den Lymphozyten und spielen eine wichtige Rolle in der frühen Phase der immunologischen Abwehr von Viren, Bakterien und Tumorzellen. Die

Aktivierung der NK-Zellen wird durch ein feines Gleichgewicht zwischen positiven und negativen Signalen reguliert. Oberflächenrezeptoren auf den NK-Zellen übermitteln entweder aktivierende oder hemmende Signale in die Zelle. In unserem Labor ist ein *in-vitro*-Test (der „Molekulare NK-Test“) entwickelt worden, welcher die Fähigkeiten der NK-Zellen eines Patienten zur Aktivierung misst. Bevor eine Therapie mit immun-modulierenden Wirkstoffen in Betracht gezogen wird, erlauben die Ergebnisse der Untersuchung eine Abschätzung darüber, ob und wie die NK-Zellen des Patienten auf die Therapie reagieren werden.

Der Molekular NK-Test

NK-Zellen können durch den Einsatz von Immunmodulatoren wie z.B. Mistelextrakten aktiviert werden. Auf die Stimulation mit Immunmodulatoren schütten Zellen Zytokine wie Interleukine oder Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) aus, welche wiederum die NK-Zellen aktivieren.

Beim Molekularen NK-Test isolieren wir NK-Zellen aus dem peripheren Blut des Patienten und inkubieren diese mit Interleukin-2. Danach wird die Expression verschiedener Rezeptoren und Aktivierungsfaktoren (TNF, Perforin) von stimulierten und nicht-stimulierten NK-Zellen miteinander verglichen. Unsere Untersuchungen an gesunden Personen haben erhöhte Konzentrationen von TNF, Perforin und anderen Rezeptoren nach Stimulation gezeigt.

Früherkennung von Krebs

Im Allgemeinen ist der Grund für die hohe Mortalität von Krebserkrankungen die zu späte Diagnose. Heilungsraten sind in Fällen, in denen die Krankheit in einem frühen Stadium entdeckt wurde, wesentlich höher. Um die Überlebenschancen zu erhöhen, ist es daher wichtig, die ersten Zeichen einer Neoplasie zu erkennen.

In der Regel wird die Früherkennung und die Vorsorge mit bildgebenden Verfahren durchgeführt. Diese Standardverfahren haben den Nachteil einer geringen Empfindlichkeit oder sind unangenehm für den Patienten (z.B. Koloskopie). Folglich werden Vorsorgeuntersuchungen zu selten beansprucht und die Krankheit dadurch erst in einem fortgeschrittenen Stadium entdeckt. Um die Überlebensraten zu verbessern werden diagnostische Methoden benötigt, welche einerseits empfindlich sind und andererseits toleriert werden. Die Bereitschaft sich einer Vorsorgeuntersuchung zu unterziehen kann möglicherweise erhöht werden, wenn der Test nicht invasiv ist – d.h. mit leicht zugänglichen Körperflüssigkeiten wie Blut, Urin oder Stuhl durchgeführt werden kann.

Molekulare Techniken sind empfindlich genug, um genetische Alterationen, welche üblicherweise in Tumoren und deren Vorstufen beobachtet werden, in leicht zugänglichen Körperflüssigkeiten zu entdecken. Krebs ist eine multifaktorielle genetische Erkrankung, d.h. mehrere genetische Alterationen müssen zusammen vorkommen, so dass sich maligne Krebszellen entwickeln können. Die frühesten genetischen Alterationen während der Entstehung einer Krebszelle können sowohl in prä-kancerösen Läsionen als auch in hieraus hervorgehenden Tumoren erkannt werden. Die Präsenz dieser sehr frühen Zeichen in einem Patienten muss nicht zwangsläufig zu Krebs führen, kann aber als Risikofaktor angesehen werden.

Als Konsequenz aus dem Nachweis von Risikofaktoren mögen Änderungen in dem Ernährungs- und Allgemeinverhalten ebenso angemessen sein, wie die regelmäßige Durchführung anderer Vorsorgeuntersuchungen.

Wir bieten verschiedene Untersuchungen zur Entdeckung von Krebs-Risikofaktoren aus verschiedenen Körperflüssigkeiten an:

Aus dem Blut

Dieser diagnostische Test wird durchgeführt, wenn der klinische Verdacht auf Erkrankung besteht. Da Tumorzellen häufig früh in den Blutstrom ausgestreut werden, kann ein Krebs-Screening-Test mit peripherem Blut durchgeführt werden. Verbesserungen in der Technologie machen es möglich, bereits eine geringe Anzahl von Tumorzellen zu entdecken. Des Weiteren kann der Nachweis ausgestreuter Zellen genutzt werden, um die Wirksamkeit der Behandlung zu beobachten. Falls die Therapie effektiv ist, sollten keine Krebszellen im Blutstrom zurückbleiben. Zum Nachweis zirkulierender Karzinomzellen nutzen wir quantitative „real-time“ PCR von Genen, welche üblicherweise de-reguliert in Krebszellen vorkommen oder von organspezifischen Genen, welche normalerweise nicht in Blutzellen vorkommen. Wie bereits anfangs beschrieben, hängt es von dem vorliegenden Tumortyp ab, welche Arten von Genen bei den Analysen angewendet werden.

Hinweise auf weiterführende Fachliteratur::

Fehm T., et al. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clinical Cancer Research* 2002 Vol. 8. 2073-2004.

Comment: Numerous studies of circulating epithelial cells have been described in cancer patients. The vast majority of these circulating epithelial cells in breast, kidney, prostate, and colon cancer patients are aneusomic and are derived from the primary tumor.

Aus dem Urin

Prä-kanzeröse und maligne Zellen des Prostatakarzinoms werden in den Urin ausgeschüttet. Wir haben Nachweisverfahren entwickelt, um die für diesen Tumor typischen molekularen Veränderungen nachzuweisen. Das Auffinden dieser Alterationen im Urin kann auf ein Tumor-Vorstadium oder ein bestehendes Prostatakarzinom hindeuten.

Hinweise auf weiterführende Fachliteratur::

Hoque MO, et al.: Quantitative methylation-specific polymerase chain reaction gene patterns in urine sediment distinguish prostate cancer patients from control subjects. *J Clin Oncol.* 2005 Sep 20;23(27):6569-75.

Aus dem Stuhl

Stuhltests werden durchgeführt, um Anzeichen eines vorliegenden kolorektalen Karzinoms zu erkennen. Früh vorkommende genetische Alterationen können durch leistungsstarke Diagnosemethoden sogar in Stuhlproben nachgewiesen werden. Wir haben eine sehr empfindliche und spezifische Untersuchung zum Nachweis von Mutationen im „K-ras“ Onkogen entwickelt, welche bereits früh während der Entstehung des kolorektalen Karzinoms vorkommen. Dafür isolieren wir DNS von wenigen im Stuhl ausgestreuten krebsartigen Zellen und vervielfältigen die mutierten DNS-Sequenzen. Die vervielfältigten DNS wird dann auf einem Biochip analysiert.

*supporting evidence from the academic literature:

Prix L, et al.: Diagnostic biochip array for fast and sensitive detection of K-ras mutations in stool. Clin Chem. 2002 Mar;48(3):428-35.

Diagnostische Untersuchungen für Hämatologische Malignome

Typische chromosomale Strukturänderungen, wie sog. „Translokationen“ werden oft in einem bestimmten (Sub-) Typ hämatologischer Tumorerkrankungen gefunden. Das sogenannte Philadelphia-Chromosom, entsteht aus einer Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 und kommt z.B. in 90% der CML-Fälle vor.

Leukämien werden in Subtypen (Untertypen) eingeteilt, welche sich bezüglich Prognose und geeigneten Behandlungsmodalitäten voneinander unterscheiden. Subtypen können dabei charakteristische chromosomalen Strukturänderungen aufweisen.

Die Diagnose dieser chromosomalen Strukturänderungen kann genutzt werden, um minimal verbleibende Tumorzellen nachzuweisen und folglich auch den Erfolg der laufenden Therapie zu beobachten. Wir haben Untersuchungsmethoden für chromosomale Strukturänderungen entwickelt, welche diverse Leukämie-Subtypen charakterisieren. Durch die Identifikation der mit Subtypen assoziierten Translokationen können Prognosen gestellt oder eine geeignete Therapie gewählt werden.

Übersicht der Untersuchungsmethoden für Translokationen von Biofocus

Leukemia	Translocation	Subtype	Prognosis of Translocation
CML	t(9;22)		90 % of CML have t(9;22), which is associated with a better prognosis
AML	t(9;22)	M1	poor prognosis
	t(6;11)	M4, M5	poor prognosis
	t(8;21) (q22;q22)	M2 (50%), seldom M4	good prognosis in adults, sensitive to ara-C, in children poor prognosis
	t(9;11) (p22;q23)	M5a (30%), seldom M2, M4	rather good prognosis
	t(15;17)	M3 (APL)	very good prognosis, responsive to retinoic acid treatment
CLL	t(11;14) (q13;q32)	B-CLL	poor prognosis
ALL	t(1;19)	L1, L2, prä B (25 %)	poor prognosis
	t(9;22)	L1, L2, o	very poor prognosis
NHL	t(11;14) (q13;q32)	centrocytic NHL mantle cell lmyph.	associated with poor prognosis
	t(14;18) (q32,q21)	follicular NHL (80%) diffuse large cell NHL (20%)	good prognosis

CML= chronic myeloid leukemia. AML = acute myeloid leukemia. CLL = chronic lymphocytic leukemia. ALL = acute lymphocytic leukemia. NHL = non-Hodgkin lymphoma.

Darüber hinaus kann der Nachweis minimal verbleibender Rest-Tumorzellen durch die Analyse von Immun-Rezeptor-Rearrangements (B-Zell-Rezeptor-Rearrangement, T-Zell-Rezeptor-Rearrangement) durchgeführt werden. Die Feststellung individueller, prominenter B-Zell-Rezeptor-Rearrangements im Blut ist beweiskräftig für eine klonale Proliferation der Lymphozyten, insbesondere B-Lymphozyten. B-Zell-Rezeptor-Rearrangements werden in 95% der B-Zellen ALLs, aber ebenso in 14% der T-Zellen ALLs gefunden.

Klonale Expansion von T-Zellen kann durch Feststellung von T-Zell-Rezeptor-Rearrangement diagnostiziert werden, welche in 91% der T-Zellen ALLs, aber ebenso in 55% der B-Zellen ALLs gefunden wurden.

B-cell-receptor rearrangement	ALL (B-cell)	95 % of B-cell ALLs, 14 % of T-cell ALLs
T-cell-receptor rearrangement	ALL (T-cell)	91 % of T-cell ALLs, 55 % of B-cell ALLs

Benötigte Materialien für die Untersuchungen

Im Blut ausgestreute Krebszellen & Chemosensivitätstests

20 ml heparinisieretes Blut, frisch abgenommen in Heparin-Vacutainer aus Glas (Bitte fragen sie in unserem Haus nach sog. „Onko-Röhrchen“). Bitte beachten Sie die Hinweise zur Blutabnahme in Anhang 2.

Molekularer NK-Test

20 ml heparinisieretes Blut, frisch abgenommen in Heparin-Vacutainer aus Glas (“Onko-Röhrchen”). Bitte beachten Sie in Anhang 2 wie die Blutproben gehandhabt werden sollten.

Früherkennungsuntersuchungen

Aus dem Blut

20 ml heparinisieretes Blut, frisch abgenommen in Heparin-Vacutainer aus Glas. Bitte beachten Sie in Anhang 2 wie Blutproben gehandhabt werden sollten.

Aus dem Urin

10 – 20 ml Urin in einem herkömmlichen Kunststoffgefäß.

Aus dem Stuhl

Ungefähr 200 mg Stuhl, mit dem Löffelchen des speziellen Stuhlröhrchens aufgenommen. Insgesamt ein gehäuftes Löffelchen Stuhlmaterial (entspricht ca. 200 mg) sollte kumulativ von der Oberfläche des Stuhls an drei verschiedenen Bereichen gesammelt werden.

Fragen zu Einzelheiten über Entnahme und Versand klinischer Proben richten sie bitte an unser Laborpersonal. Gerne stellen wir Ihnen auch die passenden Probengefäße zu.

Chemotherapeutische Medikamente und ihre Resistenz-Marker

Substance	Drug	Application	Resistance marker
Alkylating agents			
Nitrogen-mustrads Base-alkylation at N7-position	Cyclophosphamide (Cytosan)	Advanced breast carcinoma Advanced ovarian carcinoma Rhabdomyosarcoma, Ewing-sarcomas Small cell lung carcinoma Morbus Hodgkin Leukemia (NHL, ALL adults)	GST ↑ GCS ↑ MGMT ↑ [secondary]
	Ifosfamide (Ifex) Trofosphamide (Ixoten)	Lung carcinoma Ovarial carcinoma Testicular tumor Ewing-sarcoma Zervix carcinoma Breast carcinoma Pancreatic carcinoma Malignant lymphoma	
	Melphalan (Alkeran)	Multiple Myeloma (Plasmocytoma) Ovarial carcinoma	
	Chlorambucil (Leukeran)	Leukemia (CML, NHL, MH) Advanced ovarian carcinoma Breast carcinoma	
Nitrosoureas Base-alkylation at O6-position	Carmustine BCNU	Primary brain tumors Multiple myeloma Leukemia (malignant Lymphoma, Morb. Hodgkin) Lymphosarcoma Advanced gastrointestinal carcinoma	MGMT ↑ [primary] GST ↑ GCS ↑
	Lomustine CCNU (CeeBU)	Morbus Hodgkin Tumors o.t. central nervous system Metast. malignant melanoma Lung carcinoma	
	Nimustine ACNU	Malignant glioma Small cell lung carcinoma (brain metas.) Colorectal carcinoma Advanced stomach carcinoma Leukemia (CML, NHL, MH)	
Hydrazines Base-alkylation at O6-position	Dacarbazine (DTIC-Dome)	Metast. malignant melanoma	MGMT ↑
Aziridines	Thiotepa (Thioplex)	localized apl.: Bladder-papilloma and carcinoma systemic apl.: Breast carcinoma Ovarial carcinoma Chron. Leukemia Morbus Hodgkin	GST ↑ GCS ↑ MDR1 ↑ GST ↑ GCS ↑
	Mitomycin C (Mutamycin, Mitozytex)	Bladder tumor Stomach carcinoma Lung carcinoma Pancreatic carcinoma Colorectal carcinoma Breast carcinoma Liver carcinoma Zervix carcinoma Esophagal carcinoma Head-neck carcinoma CML Osteosarcoma	

Alkyl Sulfonates	Busulfan		GST ↑ GCS ↑
	Treosulfan		
Platinum compounds (N7)			
	Cisplatin (Platinol)	Lung carcinoma (NSCLC, SCLC) Bladder carcinoma Endometrial carcinoma Testicular tumor Head-neck carcinoma Melanoma Ovarial carcinoma Prostate carcinoma Sarcoma Cervical carcinoma	ERCC1 ↑ GST ↑ GCS ↑
	Carboplatin (Paraplatin)	Small cell lung carcinoma Head-neck carcinoma Zervical carcinoma Epithelial ovarian carcinoma	
	Oxaliplatin (Eloxatin)	Metast. colorectal carcinoma	ERCC1 ↑ GST ↑ GCS ↑
Antifolates			
	Methotrexate MTX	Chorion epithelioma Breast carcinoma Head-neck carcinoma Leukemia (NHL, ALL) Osteosarcoma Small cell lung carcinoma	DHFR ↑ MRP ↑
Purine-Analoga			
	Cladribine 2CdA (Leustatin)	Leukemia	DCK ↓
Pyrimidin-Analoga			
	5 Fluoruracil (Aduvicol, Ribofluor, Verrumal)	Colorectal carcinoma Stomach carcinoma Pancreatic carcinoma Metast. breast carcinoma	TS ↑ DPD ↑ TP ↑
	Capecitabine (Xeloda)	Colorectal carcinoma Metast. breast carcinoma	TS ↑ DPD ↑
	Gemcitabine (Gemzar)	Bladder carcinoma Non-small cell lung carcinoma Pancreatic adeno carcinoma	DCK ↓
	Cytarabine araC (Cytosar-U)	Leukemia (AML, ALL, CML)	DCK ↓
Topoisomerase II inhibitors			
Anthrazyclines (intercalating)	Doxorubicin (adriamycin, Rubex, Doxil)	Small cell lung carcinoma Endometrial carcinoma Ewing-Sarcom Bladder carcinoma Hodgkin-lymphoma Stomach carcinoma Breast carcinoma Neuroblastoma, Osteosarcoma Ovarial carcinoma	GST ↑ GCS ↑ MDR1 ↑ MRP ↑ Topo IIa
	Epirubicin (Ellence)	Breast carcinoma Ovarial carcinoma Stomach carcinoma Lung carcinoma Soft tissue sarcoma	GST ↑ GCS ↑ MDR1 ↑ MRP ↑
	Daunorubicin (Cerubidine)	ALL AML	Topo IIa

Anthrazyclines (intercalating)	Mitoxantrone (Novantrone)	Breast carcinoma Leukemia (malignant Lymphome) Primary liver carcinoma Ovarial carcinoma	GST ↑ GCS ↑ Topo lia
Podophyllo- toxine derivates (non-intercalating)	Etoposide VP16 (Vepesid)	Small cell Lung carcinoma Non-small cell lung carcinoma Leukemia (NHL, MH, AML) Testicular tumor Chorion carcinoma Ovarial carcinomae	MDR1 ↑ MRP ↑
Topoisomerase I inhibitors			
	Topotecan (Hycamtin)	Ovarial carcinoma	Topo I
	Irinotecan (Camptosar)	Colorectal carcinoma	MDR1 ↑
Microtubuli-inhibitors			
Taxanes	Paclitaxel (Taxol)	Ovarial carcinoma Breast carcinoma Non-small cell lung carcinoma	MDR1 ↑
	Docetaxel (Taxotere)	Breast carcinoma Non-small cell lung carcinoma	MDR1 ↑ BCL2
Vinca alkaloides	Vincristine (Oncovin)	Leukemia (akute Leukemia, ALL, MH) Small cell lung carcinoma Breast carcinoma Wilms-tumor Rhabdomyosarcoma Ewing-sarcoma Neuroblastoma	MDR1 ↑ prim. MRP ↑ prim. GST ↑ sec. GCS ↑ sec.
	Vinblastine (Velban)	Leukemia (NHL, MH) Testicular tumor Kaposi-sarcoma Breast carcinoma	
	Vinorelbine (Navelbine)	Non-small cell lung carcinoma Breast carcinoma	
	Estramustine	Advanced prostate carcinoma	BCL2 ↑
Hormones			
	Tamoxifen (Nolvadex)	Breast carcinoma	ER ERBB2 ↑
Special inhibitors			DrugTarget
Antibodies	Cetuximab (Erbix)	Colorectal carcinoma	EGF-R
	Erlotinib (Tarceva)	Colorectal carcinoma	VEGF
	Bevacizumab (Avastin)	Colorectal carcinoma	VEGF
	Trastuzumab (Herceptin)	Breast carcinoma	ERB-B2
Tyrosinkinase inhibitors	Imatinib (Gleevec)	Leukemia (CML) gastrointest. Tumors (GIST)	bcr-abl c-Kit PDGFR a / b
	Gefitinib (Iressa)	Non-small cell lung carcinoma	EGF-R
Farnesyl- transferase- inhibitors	Arglabin	Colorectal carcinoma Pankreatic carcinoma	FNTB
	Lonafarnib Tipifarnib	Non small cell lung carcinoma (trials)	
Aromatase- inhibitors	Exemestane Formestane Anastrozole Letrozole	Breast carcinoma	Aromatase
FGF-inhibitors	Suramin		bFGF
COX-inhibitors	Celecoxib	Colorectal carcinoma	cox2
Proteasome inhibitors	Bortezomib (Velcade)	Multiple myeloma	p65 NF-kB
Anti-Adrogens	flutamide, nilutamide, bicalutamide, cyproterone acetate	Prostate CA	AR

Appendix 1: Molekulare Tumor Marker und Therapie-bezogene Gen

AFP	<p>Levels of alpha-Feto-Protein (AFP) are increased in Hepatoma and Teratoma (liver, pancreas, prostate). AFP has structural and functional similarities to albumin and is normally decreased in adults.</p> <p><i>Gibbs et al. Structure, polymorphism and novel repeated DNA elements revealed by a complete sequence of the human alpha-fetoprotein gene. Biochemistry 26: 1332 –1343, 1987</i></p>
Albumin	<p>Specific product of hepatocytes. Detection of gene expression is specific for the diagnosis of hepatocellular carcinoma.</p>
APC	<p>The adenomatosis poliposis coli (APC) gene is a tumor suppressor. Germ line mutations in APC cause an inherited form of colorectal cancer (adenomatosis poliposis coli). Defects in the APC gene (mutations, LOH, methylation) are also frequently found in spontaneous colorectal carcinomas and other tumor types.</p> <p><i>Polakis P.: The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. Biochimica Biophysica Acta 1332, F127-48, (1997)</i></p>
Aromatase	<p>Aromatase is catalyzing the formation of C18 estrogens from C19 androgens. Inhibitory anti-cancer drugs of aromatase prevent the production of estrogens and consequently the growth of estrogen dependent tumors. Expression of aromatase in tumors is may be considered as a prerequisite for a rational therapy with aromatase inhibitors.</p> <p><i>Johnston SR, Dowsett M Aromatase inhibitors for breast cancer: lessons from the laboratory. Nat Rev Cancer. 2003 Nov;3(11):821-31.</i></p>
BAX	<p>BAX is a pro-apoptotic mitochondrial membrane protein. It inhibits Bcl2 and accelerates the programmed cell death (apoptosis). Reduced expression of BAX in relation to Bcl2 correlates with non-response to 5-fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide.</p> <p><i>Le Blanc H. et al. Tumor-cell resistance to death-receptor induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl 2 homolog BAX. Nat Med, 2002. 8(3);p. 274-81</i></p> <p><i>Krajewski S. et al. Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. Endocr Relat Cancer, 1999. 6(1);p.29-40</i></p>
Bcl 2	<p>Bcl2 is coding for an anti-apoptotic mitochondrial membrane protein. Bcl 2 is overexpressed in many tumors and consequently causes resistance to apoptosis-inducing drugs (e.g. intercalating agents, alkylating agents, platinum compounds).</p> <p><i>Ikeguchi M.S. et al. Quantitative analysis of expression levels of BAX, Bcl 2 and survivin in cancer cells during cisplatin treatment. Oncol Rep, 2002. 9(5);p. 1121-6</i></p>
CEA	<p>Carcinoembryonic antigen (CEA) is found in gastrointestinal and colorectal tumors. Measurement of expression in blood is used for diagnosis of circulating cancer cells, since expression of CEA is usually absent in blood cells.</p> <p><i>Tremblay F.: Breast cancer masquerading as a primary gastric carcinoma. J Gastrointest Surg 2002 Jul – Aug; 6(4):614-6</i></p>
c-KIT	<p>c-kit (= CD117) is the receptor of the stem cell growth factor. The receptor type is a tyrosine kinase. In some special small-cell lung cancers and gastrointestinal tumors, c-kit is overexpressed. Overexpression is indicative for considering therapy with the tyrosine kinase-inhibitor Gleevec (STI571).</p> <p><i>Potti A et al. CD117 (c-KIT) overexpression in patients with extensive-stage small-cell lung carcinoma. Ann Oncol. 2003 Jun;14(6):894-7.</i></p> <p><i>Allander SV et al.: Gastrointestinal stromal tumors with KIT mutations exhibit a remarkably homogeneous gene expression profile. Cancer Res. 2001 Dec 15;61(24):8624-8.</i></p>
Cytokeratin CK19 CK20 CK7	<p>Cytokeratins (CK) are expressed in epithelial cells and usually not in mononuclear blood cells. Therefore, they are suitable for the detection of circulating tumor cells of epithelial origin.</p> <p>Which cytokeratins are used as detection markers depend on the tumor type:</p> <p>CK19: tumors of breast, lung and prostate CK20: gastrointestinal tumors CK7: tumors of ovaries, uterus, breast and stomach</p> <p><i>Burchill et al.: Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase PCR. British Journal of Cancer 71:278-281, 1995</i></p>
c-myc	<p>The gene for the transcription factor c-myc is amplified (DNA) or overexpressed (RNA) in advanced, aggressive tumors.</p> <p><i>Zajac-Kaye M.: Myc oncogene: a key component in cell cycle regulation and its implication for lung cancer. Lung Cancer 2001 Dec;34 Suppl 2:S43-6</i></p>
Cox 2	<p>Cyclooxygenase 2 (Cox2) is overexpressed in colorectal adenomas and tumors. These tumors can be treated with specific Cox-2 inhibitors, since high expression levels confer susceptibility to these drugs.</p> <p><i>Adlard et al.: Prediction of the response of colorectal cancer to systemic therapy. Lancet Oncology 3, 75-82 (2002)</i></p>
DCC	<p>DCC (Deleted in Colorectal Carcinoma) is a tumor suppressor, which is frequently altered by deletion or LOH in colorectal but also other tumors.</p>

DCK	<p>Desoxycytidine kinase (DCK) is activating drugs belonging to nucleoside analogues like gemcitabine or cytarabine. The activated drugs inhibit cell proliferation by blocking the DNA-polymerase. Tumor cells develop resistance to these drugs by a lowered DCK-expression which results in reduced DCK activity.</p> <p><i>Gregoire V. et al. Role of deoxycytidine kinase (DCK) activity in gemcitabine 's radioenhancement in mice and human cell lines in vitro. Radiother Oncol 2002 Jun; 63(3):329-338.</i></p> <p><i>Holland, Frei: Cancer Medicine 5, Section 1: Cancer Biology / Section 14: Chemotherapeutic agents – Pyrimidine and purine antimetabolites.</i></p>
DPD	<p>Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) has a detoxifying enzymatic function. It catalyzes the degradation of 5-fluorouracil to an inactive metabolite. Overexpression of DPD correlates with resistance to 5-fluorouracil due to an accelerated degradation.</p> <p><i>Ichikawa et al.: Combination of dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase gene expressions in primary tumors as predictive parameters for the efficacy of fluoropyrimidine-based chemotherapy for metastatic colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2003 Feb;9(2):786-91.</i></p> <p><i>Salonga D et al.: Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. Clin Cancer Res. 2000 Apr;6(4):1322-7.</i></p>
DHFR	<p>Dihydrofolate reductase (DHFR) provides reduced methyl-moieties for DNA-synthesis. DHFR is blocked by methotrexate. Tumor cells develop resistance to methotrexate by overexpression of DHFR.</p> <p><i>Banerjee D. et al. : Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase. Biochim Biophys Acta 2002 Jul 18; 1587(2-3):164 – 73</i></p>
ERCC1	<p>Excision repair cross complementation 1 (ERCC1) is capable to remove DNA-damages, e.g. induced by platinum compound drugs. Overexpression of ERCC1 induces resistance to drugs like oxaliplatin, cisplatin, carboplatin.</p> <p><i>Shirota et al. ERCC1 and Thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. Journal of clinical oncology 19, 4298-304 2001</i></p> <p><i>Rosell et al.: Molecular Predictors of Response to Chemotherapy in Lung Cancer. Seminars in Oncology 31, 20-7 (2004)</i></p>
EGFR	<p>EGFR is the receptor for the epidermal growth factor (EGF) and other members of the EGF family. Tumors overexpressing EGFR probably respond to treatment with EGFR-inhibitors like EGFR-antibodies (cetuximab, panitumumab).</p> <p><i>Moroni M et al.: Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. Lancet Oncol. 2005 May;6(5):279-86.</i></p> <p><i>Janmaat ML, Giaccone G. The epidermal growth factor receptor pathway and its inhibition as anticancer therapy. Drugs Today (Barc). 2003;39 Suppl C:61-80.</i></p>
ER	<p>Estrogen receptor (ER) is the molecular target for tamoxifen. Treatment with tamoxifen is only recommended if the ER is expressed in the tumor. Loss of ER expression has been observed in 15% of patients with acquired resistance to tamoxifen.</p> <p><i>Osborne K.: Tamoxifen in the treatment of breast cancer. New England Journal of Medicine 339, 1609 (1998)</i></p>
ERBB2	<p>ErbB2 (also HER2/neu) is a tyrosine kinase involved in cell proliferation and differentiation. Tumors overexpressing ErbB2 can be treated with Herceptin (an ErbB2-antibody). Moreover, ER-positive tumors generally do not respond to tamoxifen if ErbB2 is overexpressed.</p> <p><i>Stebbing J. et al. Herceptin (trastuzumab) in advanced breast cancer. Cancer Treatment Reviews 26, 287-90 (2000)</i></p>
FGF2 (bFGF)	<p>Overexpression of the basic fibroblast growth factor (FGF2) occurs in many tumors. The drug suramin inhibits the binding of growth factors on its receptors and is therefore used in combination treatment of tumors especially overexpressing FGF2.</p> <p><i>Zhang Yet al.: Nontoxic doses of suramin enhance activity of doxorubicin in prostate tumors. J Pharmacol Exp Ther. 2001 Nov;299(2):426-33.</i></p>
FNTB	<p>Farnesyltransferase is catalyzing farnesylation of proteins like Ras. A logic requirement for a therapy with farnesyltransferase-inhibitors like Arglabin is expression of farnesyltransferase in the tumor cells.</p> <p><i>Sebati S et al.: Farnesyltransferase Inhibitors. Seminars in Oncology 31, 28-39 (2004)</i></p> <p><i>Shaikenov TE, et al.: Arglabin-DMA, a plant derived sesquiterpene, inhibits farnesyltransferase. Oncol Rep. 2001 Jan-Feb;8(1):173-9.</i></p>
GCS	<p>Glutamate cystein synthetase (GCS) is involved in the synthesis of glutathion. Anticancer drugs like nitrogen mustards or nitrosoureas are detoxified by conjugation with glutathion. Resistance to these drugs is observed in tumors with high levels of GCS expression.</p> <p><i>Holland, Frei: Cancer Medicine 5, Section 1: Cancer Biology / Section 14: Chemotherapeutic agents – Alkylating Agents</i></p>

G250	<p>G250 is a renal cell carcinoma-associated antigen is suitable for the detection of renal carcinomas. In contrast to normal renal tissues, it is expressed in about 80% of primary and metastatic renal carcinomas.</p> <p><i>Bismar T. et al.: Quantification of G250 mRNA expression in renal epithelial neoplasms by real-time reverse transcription PCR of dissected tissue from paraffin section Pathology, 35(6) :513-7, Dec. 2003</i></p>
GST-pi	<p>For detoxification purposes, glutathion-S-transferase pi (GST-pi) transmits glutathion moieties onto anticancer drugs like alkylating agents or platinum compounds. Resistance of tumors to these compounds is associated with increased expression of GST-pi.</p> <p><i>Holland, Frei: Cancer Medicine 5, Section 1: Cancer Biology / Section 14: Chemotherapeutic agents – Alkylating Agents)</i></p>
HCG-b	<p>beta-human chorionic gonadotropin (HCG-b) is used as a marker for the detection of germ cell tumors, malignant melanomas and chorion carcinomas.</p> <p><i>F.DoI et al. Detection of beta-human chorionic gonadotropin mRNA as a marker for cutaneous malignant melanoma. Int J Cancer 65 (1996) 454-459</i></p>
IFN-R	<p>Interferon receptor is analyzed in the context of immunotherapy of tumors. This receptor binds interferon, which has anti-proliferative properties. Interferon therapy is impaired by reduced expression of the IFN-R or by diminished receptor binding.</p> <p><i>Dinney CP. et al. Inhibition of basic fibroblast growth factor expression, angiogenesis and growth of human bladder carcinoma in mice by systemic interferon-alpha administration. Cancer Res 1998 Feb 15;58(4):808-14</i></p>
K-ras	<p>K-ras is often mutated in numerous tumor types (e.g. 40% of colorectal adenocarcinomas; 75% of pancreas carcinomas). Detection of K-ras mutations in stool samples can be used for early diagnosis of colorectal cancer.</p> <p><i>Frattoni et al.: Tumor location and detection of K-ras mutations in stool from colorectal cancer patients. Journal of the National Cancer Institute 95, 72-73, (2003)</i></p>
MDR1	<p>Multidrug resistance 1 (MDR 1) is a glycoprotein capable to transport anticancer drugs out of the cells. Tumor cells overexpressing MDR1 are resistant to multiple drug types like <i>vinca</i>-alkaloides, anthracyclines, taxanes or mitomycin C.</p> <p><i>Borst et al.: A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. Journal of the National Cancer Institute 92, 1295-1302 (2000)</i></p> <p><i>Litman et al.: From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. CMLS 58, 931 – 59 (2001)</i></p>
MGMT	<p>o-6-methylguanin-DNA methyltransferase (MGMT) is a repair enzyme removing DNA-damages induced by toxic and alkylating agents. If overexpressed in tumors, resistance to nitrosoureas and hydrazines (dacarbazine) is observed.</p> <p><i>Ma S. et al Analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in melanoma tumours in patients treated with dacarbazine-based chemotherapy. Melanoma Res 2002 Aug; 12(4):335-42</i></p> <p><i>Nozoe T. et al. Smoking-related increase of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase expression in squamous cell carcinoma or the esophagus.. Cancer Lett 2002 Oct 8;184(1):49-55</i></p>
MRP2	<p>Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) is a membrane associated glycoprotein which can transport glutathion-conjugated drugs out of the cell. Tumor cells overexpressing MRP2 are resistant to multiple anticancer-drugs like <i>vinca</i>-alkaloides, anthracyclines and methotrexate. In contrast to the related protein MRP1, also platinum compounds (cis- and carboplatin) are transported.</p> <p><i>Borst et al.: A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. Journal of the National Cancer Institute 92, 1295-1302 (2000)</i></p>
MnSOD	<p>Manganese superoxide dismutase (MnSOD) is detoxifying reactive superoxide radicals. Many tumors are overexpressing MnSOD, possibly protecting them against some chemotherapeutics.</p> <p><i>Izutani R, wet al.: Expression of manganese superoxide dismutase in esophageal and gastric cancers. J Gastroenterol 1998 Dec;33(6):816-22</i></p>
PDGFR alpha	<p>Platelet derived growth factor receptor alpha (PDGF-R alpha) binds the PDGF-alpha, a growth and angiogenesis factor. PDGF-R alpha is frequently overexpressed in tumors and is inhibited by the drug Gleevec.</p> <p><i>Buchdunger E et al.: Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. J Pharmacol Exp Ther. 2000 Oct;295(1):139-45.</i></p>
PDGFR beta	<p>Platelet derived growth factor receptor beta is mediating growth signals upon binding of its ligand, PDGF-beta. This receptor is also blocked by the drug Gleevec. Expression of PDGFR-beta is therefore a logic requirement of a therapy with Gleevec.</p> <p><i>Buchdunger E et al.: Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. J Pharmacol Exp Ther. 2000 Oct;295(1):139-45.</i></p>
PSA	<p>PSA is the prostate specific antigen, a protease synthesized in the prostate. Disseminated prostate carcinoma cells can be detected by measuring the gene expression of PSA in blood.</p> <p><i>Ghossein et al.: Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors. Clinical Cancer Research 5, 1950-60 (1999).</i></p>
p53	<p>p53 is a tumor suppressor gene and regulates the cell cycle. Mutations in p53 are the most frequent genetic alterations in human malignancies. Genetic alterations in p53 (mutations, LOH, expression) are therefore used as molecular tumor markers.</p> <p><i>Levine A.J. et al. The P53 tumorsuppressor gene. Nature 351, 453, 1991</i></p>

TS	<p>Thymidylate synthetase (TS) is the molecular target of 5-fluorouracil. Inhibition of TS by agents like 5-fluorouracil causes starvation of deoxynucleotides which results in inhibited DNA-synthesis and growth arrest. Poor response to therapy with 5-fluorouracil correlates with elevated TS expression</p> <p><i>Salonga D et al.: Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. Clin Cancer Res. 2000 Apr;6(4):1322-7.</i></p> <p><i>Ichikawa et al.: Combination of dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase gene expressions in primary tumors as predictive parameters for the efficacy of fluoropyrimidine-based chemotherapy for metastatic colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2003 Feb;9(2):786-91.</i></p>
Telomerase (reverse transcription subunit)	<p>Telomerase compensates the shortening of the chromosomes during each cycle of DNA-replication. In differentiated normal tissues, telomerase is usually not active. However, reactivation of telomerase occurs in tumors and measuring telomerase gene expression can therefore be used as a tumor marker.</p> <p><i>McKenzie et al.: Applications of telomerase research in the fight against cancer.. Mol Med Today 1999 Mar;5(3):114-22</i></p>
Topo IIa	<p>Topoisomerase II alpha is catalyzing controlled cuts and reconnection of DNA-double strands during DNA-replication. Inhibitors of Topoisomerase II (anthracyclines, mitoxantron, etoposid) are provoking faulty action of Topo II, leaving behind DNA-damages.</p> <p>If Topo II is underexpressed in tumor cells, lesser DNA-damages occur and the therapy may fail. On the other hand, overexpression of Topo II sensitizes the cells to Topo II inhibitors.</p> <p><i>Tanner, M., P. Jarvinen, and J. Isola, Amplification of HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in primary and metastatic breast cancer. Cancer Res, 2001. 61(14): p. 5345-8</i></p>
Topo I	<p>Topoisomerase I is catalyzing controlled cuts and reconnection of DNA-single strands during DNA-replication. Chemotherapeutics like irinotecan and topotecan disturb Topo I function, inducing breaks in DNA during DNA replication. Underexpression of Topo I renders the tumor cells more resistant to these drugs.</p> <p><i>Holland, Frei: Cancer Medicine 5, Section 1: Cancer Biology / Section 14: Chemotherapeutic agents – Topoisomerases</i></p>
TP	<p>Thymidine phosphorylase (TP) is involved in the metabolism of 5-fluorouracil. High expression levels correlate with resistance to therapy with 5-fluorouracil.</p> <p><i>Metzger R.: High basal level gene expression of thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor) in colorectal tumors is associated with nonresponse to 5-fluorouracil. Clin Cancer Res. 1998 Oct;4(10):2371-6</i></p> <p><i>Yoshinare K et al.: Gene expression in colorectal cancer and in vitro chemosensitivity to 5-fluorouracil: a study of 88 surgical specimens. Cancer Sci. 2003 Jul;94(7):633-8.</i></p>
TXNRD1	<p>Thioredoxin reductase (TXNRD1) is reducing thioredoxin, which protects proteins from oxidative damage. Thioredoxin reductase is often overexpressed in tumors. Elevated levels of thioredoxin possibly cause increased cell proliferation and resistance to apoptosis.</p> <p><i>Berggren, M., et al., Thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in human tumors and cell lines, and the effects of serum stimulation and hypoxia. Anticancer Res, 1996. 16(6B): p. 3459-66.</i></p>
UP	<p>The Uridine phosphorylase (UP) level is frequently elevated in tumor tissues compared to normal tissues. UP is catalyzing the formation of the active metabolite 5-fluorouracil-monophosphate from the inactive 5-fluorouracil. In tumor cells resistant to 5-fluorouracil down-regulation of UP has been observed.</p> <p><i>Chung, Y.M., et al., Establishment and characterization of 5-fluorouracil-resistant gastric cancer cells. Cancer Lett, 2000. 159(1): p. 95-101.</i></p> <p><i>Kanzaki, A., et al., Expression of uridine and thymidine phosphorylase genes in human breast carcinoma. Int J Cancer, 2002. 97(5): p. 631-5.</i></p>
VEGF	<p>Vascular endothelial growth factor (VEGF) is up-regulated in many tumors and is inducing angiogenesis by paracrine stimulation of endothelial cells. High expression levels of VEGF in tumor cells are associated with poor response to hormone therapy with tamoxifen and combination chemotherapy with FAC or CMF. New anticancer agents like bevacizumab (Avastin) are targeted specifically against VEGF.</p> <p><i>Sledge, G.W., Jr., Vascular endothelial growth factor in breast cancer: biologic and therapeutic aspects. Semin Oncol, 2002. 29(3 Suppl 11): p. 104-10.</i></p> <p><i>Bachelder, R.E., et al., Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. Cancer Res, 2001. 61(15): p. 5736-40</i></p>

Appendix 2 : Hinweise zur Blutabnahme

Verwenden Sie bitte ausschließlich Blutabnahmegefäße aus Glas mit Heparin als Koagulanzen. (z.B. die hier dargestellten Vacutainer der Firma BD Bioscience).

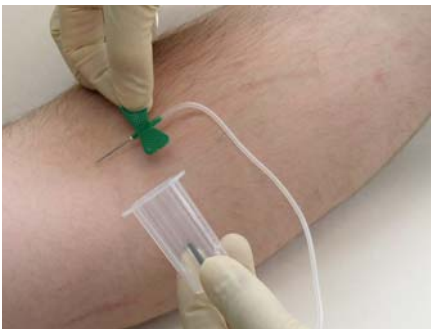


- ❶ BD Vacutainer Collection Set ("Butterfly")
- ❷ BD Vacutainer Holder
- ❸ BD Vacutainer Collection Tube, 10 ml (Glas, grüne Kappe)



Schritt 1:

Vacutainer Collection Set auspacken und mit dem Vacutainer Holder verbinden. Das Collection Set niemals ohne Holder verwenden.



Schritt 2:

Die Vene mit der üblichen Technik anstechen. Falls die Vene richtig angestochen wurde, beginnt das Blut in den Schlauch zu fließen.



Schritt 3:

Das Collection Tube mit der grünen Gummikappe auf den Vacutainer Holder stecken, dabei die Nadel in der Vene lassen.

Nachdem das Collection Tube mit Blut gefüllt ist wird es aus dem Holder entfernt und gegebenenfalls durch ein neues ersetzt, falls mehr als ein Tube abgenommen werden soll.

Nach Beendigung der Blutabnahme unter leichtem Druck auf die Entnahmestelle das Collection Set entfernen.

Wichtig: Die Collection Tubes mehrmals schwenken um das Blut vor Agglutination zu bewahren.