Multiparametrische durchflußzytometrische Bestimmung des EGF-Rezeptors sowie der DNA-Zellzyklus-verteilung beim Zervixkarzinom

R.		Kimmig
M.		Untch
D.		Pfeiffer
D.		Egner
T.		Strowitzki
H.		Hepp

Frauenklinik im Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Univers., München (Direktor: Prof. Dr. H. Hepp)

Dr. R. Kimmig, Frauenklinik im Klinikum Großhadern der LMU, Marchionistraße 15, D-8000 München 70

Die Prognose des Zervixkarzinoms korreliert mit der Expression des EGF-Rezeptors wie wir in früheren Untersuchungen zeigen konnten [1,2]; diese Ergebnisse stützen sich auf Daten aus "M-EGF Bindungsassays. Ein Problem dieser Methode ist jedoch die Zumi-schung von Nichttumorzelementen, wodurch deren Aussagekraft in nicht evaluierbarer Weise eingeschränkt wird. Immunhistochemi-sche Analysen andererseits lassen lediglich eine qualitative Bestimmung des Rezeptors zu. Aus diesem Grund haben wir zur quanti-tativen Analyse des EGF-Rezeptors in der Tumorzelle selbst eine durchflußzytometrische Methode mit simultaner Erfassung des EGF-Rezeptors und der DNA-Zellzyklusverteilung etabliert.

Methode

Frisches Tumorgewebe von 25 Zervixkarzinomen wurde mit Hilfe einer mechanisch/enzymatischen Methode (mod. n. Kedar [3]) zu Einzelzellsuspensionen dissoziiert und mit einem monoklonalen EGF-Rezeptorantikörper (Dianova AB-1, mAb-Maus; 1:20, RT. 30 min) und einem FITC-konjugierten Ziege-Antimausantikörper (BD; 1:20. RT. 30 min) fluoreszenzmarkiert; die DNA-Gegen-färbung erfolgte mit Propidiumjodid (50 µg/ml) in PBS mit RNase (1 mg/ml) bei 37° C für 10 min. Die Zellen wurden in einem FAC-Scan Durchflußzytometer (BD) analysiert. Zervixkarzinomzellen vom Typ CASKI. ME und SIHA wurden in gleicher Weise gemessen und das Ergebnis mit dem parallel durchgeführten EGF-Radio-ligandenassay (Methode [1, 2]) korreliert.

Ergebnisse

In der Abbildung ist die simultane Messung der DNA (Ordinate) und der EGF-Rezeptorexpression (Abszisse) exemplarisch dargestellt; die aneuploiden Tumorzellen zeigen im Vergleich zu den diploiden kontaminierenden Zellen eine deutliche Zunahme der Grünfluoreszenz (FL1-H) entsprechend ihrem EGF-Rezeptorgehalt. Durch die gleichzeitige DNA-Markierung ließ sich analog in alien aneuploiden Tumoren (22 von 25) die Tumorzellpopulation zwei-felsfrei identifizieren und damit die EGF-Rezeptorexpression der Tumorzellen selbst analysieren. Es fanden sich Tumoren mit hoher (>

30 Relative Fluoreszenzeinheiten (RFE); n = 8), mittlerer (10–30 RFE; n = 10) und niedriger (> 10 RFE; n = 6) EGF-Rezeptorexpression; ein einziger (DNA-diploider) Tumor zeigte keine EGF-Rezeptorexpression. Wir fanden eine gute Korrelation zwischen dem durchflußzytometrisch bestimmten EGF-Rezeptorgehalt (CASKI: ME : SIHA = 100:70:38) und dem über Radioliganden-assay bestimmten Rezeptorgehalt (100:80:36) bei den 3 untersuchten Zelllinien (CASKI-Zellen als Referenz: 178620 EGF-Rezeptoren/Zelle).

Diskussion und Schlußfolgerung

Wir konnten zeigen, daß sich der EGF-Rezeptor beim Zervixkarzinom durchflußzytometrisch quantitativ in den durch simultane DNA-Färbung identifizierten Tumorzellsubpopulationen erfassen läßt; dies ist die Grundlage für eine prospektiv angelegte Untersuchung, bei der wir die an Gewebshomogenaten mittels Rezeptor-Ligandenassay gewonnenen Daten zur Korrelation der EGF-Rezeptorexpression mit anderen Prognosefaktoren überprüfen; durch Längsschnittbeobachtung soll die prognostische Bedeutung bezüglich krankheitsfreiem Intervall und Gesamtüberleben beim Zervixkarzinom evaluiert werden.

Literatur

Pfeiffer D, Stellwag B, Pfeiffer A, Borlinghaus P, Meier W, Scheidel P: Clinical implications of the epidermal growth factor receptor in the squamous cell carcinoma of the uterine cervix.

Gynecologic Oncology 1989; 33: 146–150.

Stellwag B, Scheidel P, Pfeiffer D, Hepp H: Der EGF-Rezeptor und die EGF-ähnliche Aktivität als Prognosefaktoren bei Zervixkarzinomen. Geburtshilfe und Frauenheilkunde 1993; 53: 177–181.

Kedar E, Ikejiri BL, Bonnard GD, Herbermann RB: A rapid technique for isolation of viable tumor cells for solid tumors: use of the tumor cells for induction and measurement of cell-mediated cytotoxic responses. Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 1982; 18 (10): 991–1000.

, t>·ar

B . . . I⁵%BP, ■ I³%BP, . I⁵%ap, . I⁵%BB, . I1BBB

DNA

Kontrolle

IBBB*

B . . . I³%BP. . I⁵%BP. , I⁵%BP, . I⁵%BP. . ItBBB

DNA

tBB'

BOB

|tBβ'

8BB'

ffBOB I M

ΛΛU·

IBB'

»v < 1/8''·v.

“ ,. ' 3/8y·

■●^

∴*V

j ' /5/8 » > i 1/8/8 5/8 i 1/8 3/8 3/8 » « y « 1/8 y > ..

IB1

EGF

I I IIIII I I I M I I

-ii i u mi-i i innii-i i im[]i-”Γ1

IB8 ‘iB1 ‘iB* ‘iB3

PUI-H

EGF

u i i nil ii-i i i null I I I Mini i i i mi

IB1

IB’

IB” Π.1-H

IB’

3/8. . . ■ P»5/8 ..HW..W,, PM . . P»M

tBB

284

Kimmig/Untch/Pfeiffer/Egner/Strowitzki/ Hepp sche Bestimmung d. EGF-Rezeptors sowie d. DNA-Zellzyklusverteilung b. Zervixkarz.