

Journal für
Urologie und Urogynäkologie

Zeitschrift für Urologie und Urogynäkologie in Klinik und Praxis

**Nachweis der differentiellen Mucin
7 (MUC 7) Genexpression beim
invasiven Blasenkarzinom**

Retz M, Kalthoff H, Lehman J

Röder C, Stöckle M

Journal für Urologie und

Urogynäkologie 1999; 6 (2) (Ausgabe

für Österreich), 46-54

Homepage:

www.kup.at/urologie

Online-Datenbank mit
Autoren- und Stichwortsuche

Indexed in Scopus

Member of the



www.kup.at/urologie

Krause & Pachernegg GmbH · VERLAG für MEDIZIN und WIRTSCHAFT · A-3003 Gablitz

P. b. b. 022031116M, Verlagspostamt: 3002 Purkersdorf, Erscheinungsort: 3003 Gablitz

NACHWEIS DER DIFFERENTIELLEN MUZIN 7 (MUC7) GENEXPRESSION BEIM INVASIVEN BLASENKARZINOM

Summary

Mucins are high molecular weight membrane glycoproteins. The gene expression of mucins (MUC1-MUC8) may change characteristically during malignant transformation of epithelial tissues. Total RNA was isolated from four bladder cancer cell lines RT4, 647V, HT1376 and 486P (pathological gradings between G1 through G4) and 20 samples of transitional cell carcinomas as well as 16 samples of normal human urothelium of the bladder from surgically removed specimens. The RNA samples were studied with MUC1-, MUC2- and MUC7-specific nested reverse-transcription-polymerase-chain

reactions. Gene expression of MUC1 and MUC2 was found positive in all normal as well as in malignant tissue samples and in the tumor cell lines. In contrast, gene expression of MUC7 was only detected in bladder cancer cell lines and samples of invasive transitional cell carcinomas, but neither in superficial, non-invasive bladder tumors nor normal bladder urothelium. Only one of the samples of normal urothelium obtained from 16 different tumor bearing bladders was positive for MUC7 gene expression. These results suggest a differential MUC7 gene expression with the onset of malignant transformation of the bladder urothelium.

wurde. Die vorliegenden Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die MUC7 Genexpression möglicherweise ein Malignitätskriterium für das Urothelkarzinom der Harnblase darstellt.

EINLEITUNG

Muzine sind hochmolekulare Glykoproteine, die an der Oberfläche epithelialer Zellen exprimiert werden. Bisher wurden neun verschiedene Muzine identifiziert und in der internationalen Nomenklatur als MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7 und MUC8 klassifiziert [1]. Im Bereich des Harntraktes bilden Muzine eine physikalische Barriere zwischen Urin und Urothel und gewährleisten damit einen Schutz gegenüber starken Schwankungen des pH-Wertes und der Osmolarität. Zusätzlich kann die bakterielle Adhäsion und Anheftung von Urin-Kristallen an das Urothel durch die Muzinschicht verhindert werden [2, 3]. In den letzten Jahren konnten an unterschiedlichen Organsystemen eine sowohl qualitativ als auch quantitativ veränderte Muzin-Expression bei maligne transformierten epithelialen Geweben gezeigt werden [4, 5, 6]. Die alterierte Muzinexpression und die veränderten Kohlenhydratstrukturen der Muzine können dabei mit Tumordinvasion und Metastasierung assoziiert sein [7]. Die klinische Wertigkeit bestimmter Muzine als diagnostischer und prognostischer Marker wurden in bezug auf das Mamma- sowie Pankreas- und Kolonkarzinom bereits beschrieben [8, 9, 10, 11].

ZUSAMMENFASSUNG

Muzine (MUC1-MUC8) sind hochmolekulare Membranglykoproteine, deren Expression bei der malignen Transformation von Epithelzellen in charakteristischer Form verändert sein kann. Zur Untersuchung des Transitionalzellkarzinoms der Harnblase erfolgte die RNA-Isolierung aus 4 Blasenkarzinom-Zelllinien RT4, 467V, HT1376 und 468P mit den jeweiligen Differenzierungsgraden G1 bis G4. Zusätzlich wurde die RNA aus 20 Blasenkarzinomproben sowie 16 normalen Blasengewebsproben isoliert. Als Positivkontrolle diente die Kolonkarzinom-Zelllinie WIDR. Mit einer „nested“ Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (nested RT-PCR) wurde

die Genexpression von MUC1, MUC2 und MUC7 untersucht.

Die Ergebnisse zeigten eine uniforme MUC1 und MUC2 Genexpression sowohl im normalen Urothelgewebe, in allen Blasenkarzinomproben als auch in den 4 Blasenkarzinom-Zelllinien. Hingegen war eine MUC7 Genexpression nur in den invasiv wachsenden Blasenkarzinomproben sowie in den 4 Blasenkarzinom-Zelllinien nachweisbar. Demgegenüber war weder beim oberflächlichen, nicht invasiven Harnblasenkarzinom noch im normalen Urothelgewebe eine MUC7 Genexpression zu detektieren. Die Ausnahme bildete jedoch eine normale Blasengewebeprobe mit positiver MUC7 Genexpression, die aus einer tumortragenden Harnblase entnommen

Über die Muzinexpression der Harnblase liegen bisher nur wenige Arbeiten vor. Immun-histochemische Untersuchungen zeigten eine MUC1 Protein-expression sowohl im normalen Urothelgewebe als auch im Transitionalzellkarzinom der Harnblase. Demgegenüber war normales Blasengewebe in der MUC2 Immunfärbung negativ und bei 40 % der untersuchten Blasenkarzinome MUC2 positiv [12]. Über die Genexpression von MUC1 und MUC2 im Urothel und deren maligne Transformation liegen keine publizierten Daten vor. Sowohl die mRNA- als auch die Proteinexpression der Muzine MUC3 bis MUC8 wurden am normalen Urothelgewebe und Blasenkarzinomgewebe bisher nicht untersucht. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Molekulare Onkologie, Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie der CAU zu Kiel konnte in einer umfangreichen Screening-Untersuchung eine MUC7 mRNA-Detektion in verschiedenen Kolonkarzinom-Zelllinien, teilweise auch in Magenkarzinom-Zelllinien, insbesondere aber in Blasenkarzinom-Zelllinien nachgewiesen werden.

MUC7 wurde physiologischerweise zuerst in normalem Speicheldrüsengewebe nachgewiesen [13]. Bezüglich einer differentiellen Expression bei normalen und maligne transformierten epithelialen Geweben liegen für MUC7 allerdings keine publizierten Daten vor. Insbesondere gab es bislang keine Arbeiten in bezug auf die MUC7-Expression im Urogenitaltrakt. Unsere Forschungsarbeit konzentriert sich auf die MUC1, MUC2 und MUC7-Genexpression im

normalen Urothelgewebe und im Transitionalzellkarzinom der Harnblase mit Hilfe der nested Reverse-Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (nested RT-PCR). Eine alterierte Muzin Genexpression beim Harnblasenkarzinom ist eine wichtige Voraussetzung für die potentielle klinische Anwendbarkeit von Muzinen in der Diagnostik und Prognostik des Harnblasenkarzinoms.

MATERIAL UND METHODEN

Zelllinien

Für die Untersuchung wurden 4 Blasenkarzinom-Zelllinien (RT4 mit dem Tumordifferenzierungsgrad G1, 647V mit G2, HT1376 mit G3 und 486P mit G4) verwendet. Die Kolonkarzinom-Zelllinie WIDR wurde als Positivkontrolle für die MUC1, MUC2 und MUC7 Genexpression eingesetzt. Alle Zelllinien wurden von der Firma American Type Culture Collection (Rockville, USA) bezogen. Die Zellkultivierung erfolgte in RPMI 1640 Medium (Biochrom, Berlin) mit Zusatz von 20%igem hitzeaktiviertem Fötalkälberserum, 2 mmol/L Glutamin sowie 1 mmol/L Pyruvat. Die Zelllinie HT1376 benötigte als spezielles Nährmedium Eagle's Medium (Eagle's MEM, Biochrom). Die Zellkultivierung erforderte eine konstante Temperatur von 37 °C bei einer 5 %igen CO₂ Atmosphäre. Die Zelllinien wurden regelmäßig auf Mykoplasmen-Kontaminationen überprüft (PCR Mykoplasmen Detektions-Kit von TaKaRa, Biomedical Europe S.A., Genevilliers, Frankreich).

Gewebeproben

Die Frischgewebeproben von 16 normalen Blasengeweben, 14 invasiv wachsenden Blasenkarzinomen sowie 2 Proben mit einem Carcinoma in situ wurden von Zystektomiepräparaten entnommen. Außerdem wurden 4 oberflächlich wachsende, papilläre Blasentumore und eine Probe mit urothelialer Dysplasie nach transurethraler Blasentumoresektion gewonnen. Es wurde dabei jeweils eine Probe noch im Operationssaal in flüssigem Stickstoff gefroren und ein benachbartes Stück an zwei Pathologen zur histopathologischen Begutachtung eingeschickt. Die Tumordifferenzierung erfolgte gemäß der Empfehlung der World Health Organization, die Tumorstadien wurden nach der aktuellen TNM-Klassifikation von 1997 eingeteilt. Das histopathologische Tumorstadium der oberflächlich wachsenden, papillären Blasentumore lag zwischen pTaG1 und pTaG2. Alle invasiv wachsenden Blasentumore wurden als Transitionalzellkarzinom mit den Tumorstadien von pT1G3 bis pT4G3 klassifiziert (Tabelle 1).

RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA wurde dabei jeweils nach der Guanidium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Methode extrahiert [14]. Die Gesamt-RNA der Zelllinien wurde mit RNA-Clean® (AGS-Chemie, Heidelberg), die der Gewebeproben mit RNazol® (WAK-CHEMIE Medical GmbH, Bad Homburg) extrahiert. Die Ausbeute und Reinheit an Gesamt-RNA wurde durch Messungen der Probenextinktion bei 260 nm und 280 nm im Photometer bestimmt

Tabelle 1: Übersicht der MUC7 Genexpression beim Blasenkarzinom nach der TNM-Klassifikation

Histologie Harnblase	TNM Klassifikation	(n) Anzahl der Proben mit MUC7 Expression / (n) Anzahl der Gesamtproben
Urothel	-	1/16
Urotheliale Dysplasie	-	0/1
Nicht-invasives Karzinom	pTa N0 M0	0/4
Prä-invasives Karzinom	pTis N0 M0	2/2
Invasives Karzinom	pT1 N0 M0	3/3
	pT2 N0 M0	3/3
	pT3 N0 M0	6/6
	pT4 N0 M0	2/2

(Gene Quant II RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech, Freiburg). Desweiteren wurden 2 µg der extrahierten Gesamt-RNA Proben mit gefärbtem Probenpuffer (Signum R 4268, Sigma, Deisenhofen) versetzt und in einem 1 %igen Agarose-Gel (Small DNA agarose; Biozym, Hessisch Oldendorf) aufgetrennt. Proben, die auf diese Weise degradierte ribosomale RNA anzeigten, wurden verworfen.

Reverse Transkription

Von der intakten Gesamt-RNA wurden 2 µg einer jeden Probe in 10 µl RNase freiem Wasser aufgenommen und bei 70°C für 10 min denaturiert. Die im folgenden beschriebenen Schritte wurden nach Abkühlung der Probe auf Eis durchgeführt. Die cDNA wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl synthetisiert, welches 4 µl 5-fach „First-Strand Puffer“, 2 mM Dithiothreitol (DTT), 200 U SuperScript II (alles Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein) sowie 20 U RNase Inhibitor, 5 µM Random Hexamers und 1 mM Deoxynukleotid-Triphosphat (dNTP) Mix (alle P.E. Applied

Biosystems GmbH, Weiterstadt) enthielt. Der Reaktionsansatz wurde für 10 min bei 24 °C und für 60 min bei 42 °C inkubiert. Die Reverse Transkriptase wurde anschließend für 3 min bei 94 °C inaktiviert.

MUC1, MUC2 und MUC7 nested PCR

Die MUC1, MUC2 und MUC7 PCR wurde im „nested“-Verfahren durchgeführt, d. h. das Produkt der ersten PCR wurde in einer zweiten PCR eingesetzt. Durch diese „nested“ Methode kann eine sehr hohe Sensitivität erreicht werden. Alle Primer für die MUC1, MUC2 und MUC7 PCR wurden von der Firma MWG-Biotech (Eberberg) synthetisiert.

Folgende Primersequenzen wurden eingesetzt: MUC1-A sense, 5'-TCAATTCCCA GCCACCACTCT; MUC1-B antisense, 5'-AGTTCTT TCGGCG GCACTGAC; MUC1-C sense, 5'-GCCAGCCATAGCACCAAGA CT; MUC1-D antisense, 5'-TGACAGA CAGCCAAGGCAATG. Die externe MUC1 RT-PCR ergab ein 595-bp Produkt, die interne PCR

zeigte ein 539-bp Produkt. MUC2-A sense, 5'-CCTACGTGCT GGTGGAGGAGA; MUC2-B antisense, 5'-CAGCCT GACGGA GAAGGACAG; MUC2-C sense, 5'-GAGATCAGCCCCCTCCGTGGA C; MUC2-D antisense, 5'-CACCG CCTGCCTGTTCACCTG. Die externe MUC2 RT-PCR bildete ein 317-bp Fragment, die interne PCR synthetisierte ein 180-bp Produkt. MUC7-A sense, 5'-TTGGCTAAAA GCAAGCAACTGG; MUC7-B antisense, 5'-TTGGTG GAAGCT GATGGGAAAG; MUC7-C sense, 5'-CACACTGCACCAGAGACATC AGAA; MUC7-D antisense, 5'-AG CCACTAAG GTAGGGTTGACCA C. Die externe MUC7 RT-PCR ergab ein 439-bp Produkt, die interne PCR bildete ein 348-bp Fragment.

Für die MUC1, MUC2 und MUC7 spezifische nested RT-PCR wurden aus der synthetisierten cDNA 20 µl eingesetzt. Bei einem Endvolumen von 50 µl waren im Reaktions-Mix 3 µl eines 10-fach Trizin Puffers III, 200 µM Deoxynukleotid Triphosphat Mix, 1,5 µM MUC-A sense Primer, 1,5 µM MUC-B antisense Primer und 1 U Taq-DNA-Polymerase (Life Technologies, Eggenstein) enthalten. Die einzelnen Denaturierungs-, Annealing- und Extensionszeiten der spezifischen MUC1, MUC2 und MUC7 nested PCR sind in Tabelle 2 aufgelistet. Aus dem ersten PCR Reaktionsmix wurden 1 µl mit jeweils 1,5 µl MUC-C sense Primer und 1,5 µl MUC-D antisense Primer in ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgenommen. Das Zyklusprotokoll der internen PCR wurde entsprechend der externen PCR durchgeführt.

Um eine interne Kontrolle der cDNA-Synthese sicherzustellen,

wurde eine spezifische PCR des zuverlässig exprimierten Gens Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durchgeführt. Der Reaktionsansatz für diese PCR enthielt 1 µl des externen PCR Reaktionsmixes, jeweils 1 µM der spezifischen GAPDH sense Primer (5'-CCAGCCGAGC CACATCGCTC) und GAPDH antisense Primer (5'-ATGAGCCC C AGCCTTCTCCAT) sowie 3 µl 10-fach Trizin Puffer III, 200 µM dNTP Mix und 1 U Taq DNA Polymerase.

Das Zyklusprotokoll der GAPDH-PCR entsprach dabei dem MUC7-PCR-Protokoll. Das GAPDH-PCR Produkt ergab ein 359 bp Fragment. Die RT-PCR Untersuchung

wurde regelmäßig auf Kontaminationen kontrolliert, indem zum einen RNA-Proben durch steriles Wasser ersetzt und zum anderen SuperScript II als das Reverse-Transkriptase-Enzym ausgelassen wurden. Alle RT-PCR Produkte wurden in einem 2 %igen Agarose-Gel (Small DNA agarose; Biozym, Hessisch Oldendorf) elektrophoretisch in Tris-Azetat-EDTA (TAE)-Puffer aufgetrennt. Die Visualisierung der Banden erfolgte durch Färbung mit Ethidiumbromid. Das molekulare Gewicht der Banden wurde durch einen molekularen DNA-Gewichtsmarker überprüft (100 bp DNA Abschnitte, Gibco BRL, Eggenstein).

Sequenzierung der RT-PCR Produkte

Repräsentative Produkte der spezifischen MUC1, MUC2 und MUC7 nested RT-PCR wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QIAEX II Gel Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) extrahiert. Die isolierten cDNA Produkte wurden mit dem automatischen Sequenziergerät ALFlexpress (Pharmacia, Freiburg) sequenziert.

ERGEBNISSE

Die Untersuchung der Genexpression von MUC1, MUC2 und MUC7 am normalen und maligne transformierten Blasen-gewebe wurde erstmals durch eine nested RT-PCR Untersuchung durchgeführt.

RT-PCR und Negativkontrollen

Der Nachweis der GAPDH Genexpression mit einem Produkt von 359-bp gelang in allen Proben und diente als Nachweis für die erfolgreiche cDNA Synthese (siehe unteres Bild der Abb. 1A-C). In den entsprechenden Negativkontrollen – Substitution der RNA durch steriles Wasser bzw. Auslassen des Reverse-Transkriptase-Enzyms – konnten bei keiner Probe Kontaminationen nachgewiesen werden.

RT-PCR von MUC1

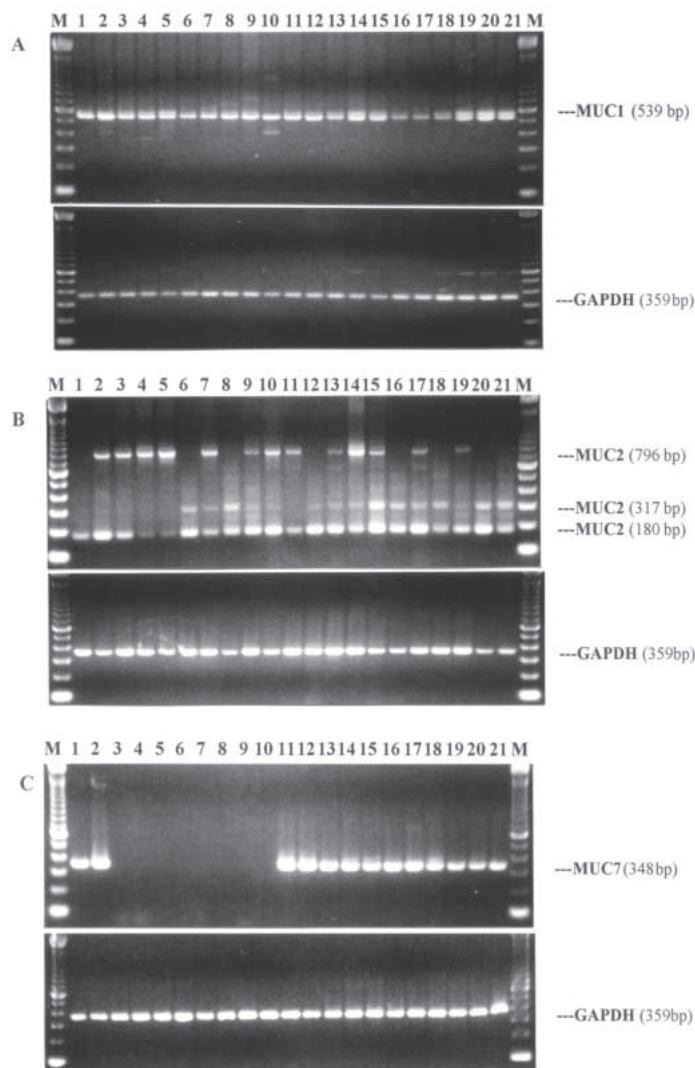
Die Kolonkarzinom-Zelllinie WIDR als Positivkontrolle zeigte ein MUC1 Amplifikationsprodukt von 539-bp (Abb. 1A, Spur 1). Die positive MUC1-spezifische

Tabelle 2: Protokoll für die MUC1, MUC2 und MUC7 nested RT-PCR

Stufe	Denaturierungszeit [min]/ Temperatur [°C]	Annealingzeit [min]/ Temp. [°C]	Extensionszeit [min]/ Temp. [°C]	Anzahl der Zyklen
MUC1				
1	2 min/ 95°C	1 min/ 61°C	2 min/ 72°C	1
2	1 min/ 95°C	1 min/ 60°C	2 min/ 72°C	1
3	1 min/ 95°C	1 min/ 59°C	2 min/ 72°C	1
4	1 min/ 95°C	1 min/ 58°C	2 min/ 72°C	1
5	1 min/ 95°C	1 min/57°C	2 min/ 72°C	30
6	-	-	10 min/72°C	1
MUC2				
1	2 min/ 95°C	1 min/ 61°C	2 min/ 72°C	1
2	1 min/ 95°C	1 min/ 60°C	2 min/ 72°C	1
3	1 min/ 95°C	1 min/ 59°C	2 min/ 72°C	1
4	1 min/ 95°C	1 min/ 58°C	2 min/ 72°C	30
5	-	-	10 min/ 72°C	1
MUC7				
1	2 min/ 94°C	1 min/ 61°C	2 min/ 72°C	1
2	1 min/ 94°C	1 min/ 60°C	2 min/ 72°C	1
3	1 min/ 94°C	1 min/ 59°C	2 min/ 72°C	1
4	1 min/ 94°C	1 min/ 58°C	2 min/ 72°C	1
5	1 min/ 94°C	1 min/ 57°C	2 min/ 72°C	1
6	1 min/ 94°C	1 min/ 56°C	2 min/ 72°C	29
7	-	-	10 min/ 72°C	1

Abbildung 1A, 1B und 1C: MUC1-, MUC2- und MUC7- spezifische nested RT-PCR von normalen Urothelgewebe-, Blasenmorgewebe- und Blasenkarzinom-Zelllinien. A: MUC1-spezifische nested RT-PCR (internes PCR Produkt: 539-bp). B: MUC2-spezifische nested RT-PCR (MUC2 Intron Produkt: 796-bp; externes PCR Produkt: 317-bp; internes PCR Produkt: 180-bp). C: MUC7-spezifische nested RT-PCR (internes PCR Produkt: 348-bp).

Die PCR-Proben wurden in einem 2 %igen Agarose Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Kolonkarzinom-Zelllinie WIDR diente als Positivkontrolle für die MUC1-, MUC2- und MUC7 Genexpression (Spur 1). Normales Urothelgewebe der Harnblase (Spur 2-7); urotheliale Dysplasie der Blase (Spur 8); oberflächlicher Blasenmorgewebe pTaG1-G2 (Spur 9-10); Carcinom in situ (Spur 11-12); invasives Blasenkarzinom: T1G3 (Spur 13), T2G3 (Spur 14), T3G2 (Spur 15), T3G3 (Spur 16), T4G3 (Spur 17); Blasenkarzinom-Zelllinien: RT4 (Spur 18), 647V (Spur 19), HT1376 (Spur 20), 468P (Spur 21); Molekularmarker=M. Die entsprechenden internen Kontrollen der cDNA-Synthese wurden mittels der GAPDH RT-PCR (Produkt: 359-bp) durchgeführt und in den jeweiligen unteren Bildabschnitten dargestellt. Die entsprechenden Negativkontrollen (Substitution der RNA durch steriles Wasser bzw. Auslassen des Reverse-Transkriptase-Enzyms SuperScript II) wurden nicht abgebildet.



nested RT-PCR war in allen 4 Blasenkarzinom-Zelllinien RT4, 647V, HT1376 und 486P mit den jeweiligen Differenzierungsgraden von G1 bis G4 nachweisbar (Abb. 1A, Spur 18-21). Weiterhin konnte die MUC1 Genexpression in allen Blasenkarzinomproben mit den Tumorstadien von pTaG1 bis pT4G3 und insbesondere in 2 Proben mit einem Carcinoma in situ detektiert werden (Abb. 1A, Spur 9-17). Alle normalen Blasenmorgewebeproben waren ebenfalls positiv in der MUC1 Genexpression (Abb. 1A, Spur 2-7). Das MUC1-spezifische nested RT-PCR Produkt mit 539-bp wurde aus dem Gel isoliert und mit dem automatischen Sequenziergerät ALFexpress sequenziert. Die analysierte MUC1 Gensequenz zeigte eine vollständige Übereinstimmung mit der publizierten MUC1 mRNA Sequenz (GenBank Nummer J05581).

RT-PCR von MUC2

Die MUC2 Genexpression mit einem Produkt von 180-bp war in der Kontrollzelllinie WIDR und in den 4 Blasenkarzinom-Zelllinien positiv (Abb. 1B, Spur 1 und 18-21). Die MUC2-spezifische nested RT-PCR konnte sowohl in allen Blasenkarzinomproben, inklusive der Proben mit einem Carcinoma in situ, als auch in den normalen Blasenmorgewebeproben nachgewiesen werden (Abb. 1B, Spur 2-17). Die Sequenzierung des 180-bp Amplifikationsproduktes zeigte auch in dieser Untersuchung eine 100 %ige Übereinstimmung mit der bekannten Gensequenz aus der Gen-Datenbank (GenBank Nummern L21998, M94132 und M86523).

Zusätzlich war im überwiegenden Teil der Proben ein Amplifikationsprodukt von 317-bp erkennbar, welches dem externen Produkt in der MUC2-spezifischen nested RT-PCR entspricht (Abb. 1B, Spur 6-10 und 12-21). Die Gensequenz des 317-bp Fragmentes wurde in der automatischen Sequenzanalyse als externes MUC2 Produkt bestätigt. Desweiteren konnte ein Amplifikationsprodukt von 796-bp in 13 Proben nachgewiesen werden (Abb. 1B, Spur 2-5, 7, 9-11, 13-15, 17 und 19). Dieses Fragment wurde in weiteren Untersuchungen als Kontamination durch genomische DNA identifiziert. In den entsprechenden Negativkontrollen ohne Einsatz des Reverse-Transkriptase-Enzyms war das genomische DNA Produkt mit 796-bp ebenfalls erkennbar. Eine PCR mit kommerziell erhältlicher humaner DNA (Promega, Madison, USA) und den MUC2-C sense sowie MUC2-D antisense Primern synthetisierte ebenfalls das 796-bp Produkt. Dieses Fragment wurde anschließend sequenziert und beinhaltet ein bisher nicht publiziertes MUC2 Intron von 616-bp (EMBL Nummer AJ007575). Das Intron befindet sich dabei zwischen der Position 1098 und 1099 der GenBank Nummer M94132, bzw. zwischen der Position 13710 und 13711 der GenBank Nummer L21998 sowie zwischen der Position 209 und 210 der GenBank Nummer M86523.

RT-PCR von MUC7

Das spezifische MUC7 Amplifikationsprodukt mit 348-bp war sowohl in der Kontrollzelllinie WIDR als auch in allen Blasenkarzinom-Zelllinien nachweisbar

(Abb. 1C, Spur 1 und 18-21). Alle invasiv wachsenden Blasenkarzinome mit der Klassifikation von pT1G3 bis pT4G3 und 2 Proben mit einem Carcinoma in situ waren MUC7 positiv. Demgegenüber war bei den oberflächlich wachsenden Blasentumoren pTaG1 und pTaG2 sowie in einer Probe mit ausgeprägter urothelialer Dysplasie keine MUC7 Genexpression erkennbar (Abb. 1C, Spur 8-10). Mit Ausnahme einer normalen Blasengewebeprobe aus einer tumortragenden Blase (Abb. 1C, Spur 2) zeigten alle anderen 15 normalen Urothelgewebeproben keine MUC7 Genexpression (Abb. 1C, Spur 3-7). Die analysierte Gensequenz des MUC7 Produktes von 348-bp entsprach der bekannten cDNA Sequenz aus der GenBank Nummer L13283. Die Tabelle 1 zeigt eine Übersicht der MUC7 Genexpression beim Blasenkarzinom unter Berücksichtigung der TNM-Klassifikation.

DISKUSSION

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Untersuchungen über Molekularstruktur und Organspezifität verschiedener Muzine veröffentlicht. Nach dem aktuellen Stand der Forschung können 9 verschiedene Muzine klassifiziert werden [1]. MUC1 wird an der apikalen Membran polarisierter Epithelialzellen exprimiert und ist bislang das am besten charakterisierte Muzin [2]. Die MUC2 Synthese und Sekretion wurde erstmalig bei endodermal abstammenden Epithelzellen beschrieben und befindet sich hauptsächlich im Gastrointestinal- und

Respirationstrakt [15]. Die Klonierung und Sequenzierung des Muzins MUC7 gelang aus der cDNA der serösen Speicheldrüse [13]. In unserer Untersuchung haben wir uns auf die drei Muzine MUC1, MUC2 und MUC7 konzentriert, da hier bereits vollständige Sequenzen der cDNA vorlagen [1]. Muzine wie MUC5B und MUC6 besitzen repetitive Sequenzabfolgen (variable number of tandem repeats = VNTR), die für eine spezifische PCR ungeeignet sind [16].

Beim Urothelgewebe der Harnblase und deren maligner Transformation ist die Muzinverteilung sowie die exakte Molekülstruktur nur unzureichend bekannt. Nach den bisherigen Publikationen konnten hauptsächlich mit Hilfe von immunhistologischen Untersuchungen die Muzine MUC1, MUC2 und MAUB (mucin antigen of the urinary bladder) in der normalen Blaseschleimhaut identifiziert werden [17]. Die MUC1 Expression im normalen und maligne transformierten Urothelgewebe der Blase wurde dabei bereits mehrfach beschrieben [18], wobei die Ergebnisse mit unseren übereinstimmen. Unsere Untersuchungen zeigten darüberhinaus eine uniforme MUC2 Genexpression sowohl im normalen Blasengewebe als auch in allen Blasenkarzinomproben. Als Zufallsbefund konnten wir in der spezifischen-MUC2 nested RT-PCR ein zusätzliches Amplifikationsprodukt von 796-bp identifizieren. Die weitere Sequenzanalyse ergab eine genomische cDNA Kontamination mit Nachweis eines bisher nicht bekannten MUC2 Introns, das in der EMBL Gendatenbank

dokumentiert wurde (EMBL Nummer AJ007575). Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen wurde von Walsh [12] in immunhistochemischen Studien eine differentielle MUC2 Proteinexpression im Blasengewebe und deren neoplastische Transformation beschrieben.

In einer Serie von 89 Blasenkarzinomproben konnte mit dem monoklonalen Antikörper 4F1 in 40 % der Fälle eine MUC2 Proteinexpression nachgewiesen werden, wohingegen keine MUC2 Expression im normalen Blasengewebe zu erkennen war. Der Antikörper 4F1 bindet nur an die VNTR Region der nicht glykosylierten Proteingrundstruktur, welches in den intrazellulären Kompartimenten lokalisiert ist. Da der Antikörper 4F1 nicht an die vollständig glykosylierte MUC2 Glykoproteinstruktur binden kann, ist anzunehmen, daß ein Hauptteil der normalen Blasengewebe- und Blasenkarzinomproben keine spezifische Antigen-Antikörper Bindung eingehen kann. Das Problem der Antikörper-Bindungsspezifität an Muzinen kann durch die Untersuchung der Genexpression von Muzinen mittels der spezifischen RT-PCR umgangen werden, da dieses Verfahren von der Zelllokalisierung, der posttranslationalen Prozessierung und somit auch von der Glykosylierungsstruktur unabhängig ist.

Nach unserem Wissen liegen bisher keine Daten über die MUC7 Genexpression beim normalen und maligne transformierten Urothelgewebe vor. In unserer Arbeit konnten wir erstmalig die differenzierte MUC7

Genexpression mit der spezifischen-MUC7 nested RT-PCR an vier verschiedenen Blasenkarzinom-Zelllinien und beim invasiv wachsenden Urothelkarzinom der Harnblase beschreiben. Insbesondere wurde die MUC7 Genexpression in zwei Proben mit einem Carcinoma in situ nachgewiesen, dessen pathohistologisches Wachstumsmuster als ein präinvasives Stadium des Urothelkarzinoms einzuordnen ist. Zusammenfassend ist eine hohe Korrelation der MUC7 Genexpression bei den hier untersuchten präinvasiv- und invasiv wachsenden Blasenkarzinomen erkennbar. Demgegenüber war keine MUC7 Genexpression beim oberflächlich papillären Blasen-tumor nachweisbar. Mit Ausnahme einer Probe waren alle 15 normalen Blasengewebeproben ebenfalls negativ in bezug auf die MUC7 Genexpression. Eine Blasenprobe mit nachgewiesener MUC7 Genexpression war aus einer tumortragenden Harnblase entnommen worden. Obwohl diese Probe histologisch als normales Urothelgewebe beurteilt wurde, könnte die Heraufregulierung der MUC7 Genexpression bereits einer prämaligen genetischen Veränderung entsprechen. Nach den vorliegenden Ergebnissen können wir schlußfolgern, daß die maligne Transformation von Urothelgewebe mit einer MUC7 Genexpression verbunden ist. Die Untersuchung der MUC7 Genexpression mit der spezifischen-MUC7 nested RT-PCR könnte in Zukunft ein wertvolles Verfahren in der Frühdiagnose des Blasenkarzinoms darstellen. Diese Daten ermutigen uns, neue Studien mit dem Nachweis von MUC7 positiven Zellen im

Spontanurin durch die RT-PCR Technik und durch die Immunzytochemie zu planen.

Die tumorassoziierte, alterierte Muzinexpression und die veränderte Kohlenhydratstruktur der Muzine wurden bereits mehrfach beschrieben. Die Funktion der Muzinexpression neoplastischer Zellen könnte in einer Protektion der Zellen vor einem Zugriff des Immunsystems durch Blockierung der Zellmembran bestehen bzw. in einer sterischen Beeinträchtigung der Immunerkennung disseminierter Karzinomzellen in der Blutbahn. Allerdings konnte eine immunhistochemische Detektion des MUC7 Glykoproteins bisher noch nicht gezeigt werden, so daß die biologische Bedeutung des Muzins 7 noch ungeklärt ist. Demzufolge könnten Tumore mit einer alterierten Muzinexpression gegenüber dem Immunsystem effektiver geschützt sein und eine stärkere Progressions- und Metastasierungs-tendenz aufweisen. Diese These konnte in einer Reihe von Untersuchungen bestätigt werden. Exemplarisch sei eine Publikation von Walsh et al. genannt, die eine Heraufregulierung der MUC2 Expression beim Mammakarzinom mit einer verstärkten Tumorinvasion und folglich mit einer schlechteren Prognose festgestellt haben [8]. Damit scheint eine Abhängigkeit zwischen dem biologischen Verhalten der Tumorzellen und der jeweiligen Muzin-Quantität sowie Muzinstruktur zu bestehen.

Ein weiterer interessanter klinischer Aspekt betrifft das Immuntherapeutikum Bacillus Calmette-Guerin (BCG), das zur Rezidivprophylaxe oberflächlicher

Blasenkarzinome eingesetzt wird. Badalament et al. [19] untersuchten das Bindungsverhalten von BCG an muzinexprimierenden Urothelzellen. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, daß die Anheftung von BCG-Zellen an die Blasenschleimhaut insbesondere von dem Glykosylierungszustand der muzinösen Urothelschicht abhängt. Nach chemischer Entfernung der Muzinschicht von der Blasenschleimhaut konnte eine deutlich höhere Bindungsfähigkeit der BCG-Zellen an die Urothelschicht beobachtet werden. Die Autoren folgerten, daß durch eine bessere Bindungsfähigkeit der BCG-Zellen an die Blasenschleimhaut eine erhöhte antitumorale Wirkung erzielt werden kann. Möglicherweise könnte eine alterierte Muzinexpression, wie die Heraufregulierung der MUC7 Expression beim Blasenkarzinom, einen entscheidenden Einfluß auf die Effektivität der BCG-Immuntherapie haben.

Zusammenfassend konnten wir in unserer Untersuchung eine differenzielle MUC7 Genexpression sowohl beim präinvasiven als auch invasiven Blasenkarzinom nachweisen. Entsprechend war keine MUC7 Genexpression beim oberflächlich, nicht-invasiven Blasentumor und im normalen Urothelgewebe erkennbar. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist die MUC7 Genexpression möglicherweise ein Malignitätskriterium für das Urothelkarzinom der Harnblase. Der klinische Stellenwert der differentiellen MUC7 Genexpression beim Blasenkarzinom und deren möglicher Einsatz als Tumormarker bedarf jedoch weiterer Untersu-



Dr. med. Margitta Retz

Geboren 1965 in Meppen (D). Von 1984 bis 1993 Studium der Biologie und der Humanmedizin an der Philipps-Universität in Marburg. 1989 Visiting Doctor am Dept. for Hematology and Oncology, Mayo Medical School, Rochester, Minnesota. Von 1989 bis 1991 Dissertation am

Institut für Zytobiologie und Zytopathologie an der Philipps-Universität Marburg (Prof. Dr. H. F. Kern). Von 1993 bis 1994 Assistenzärztin der Klinik für Urologie, Kantonsspital St. Gallen, Schweiz. Von 1995 bis 1996 Assistenzärztin der Klinik für Allgemeine Chirurgie der Städtischen Kliniken Oldenburg. Seit 1996 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Klinik für Urologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Seit 1997 Laborleiterin der Forschungsgruppe Experimentelle Urologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Mitglied der Deutschen Gesellschaft für Urologie sowie der Deutschen Krebsgesellschaft e.V., AG Urologische Onkologie.

Korrespondenzadresse:

*Dr. med. Margitta Retz
Klinik für Urologie, Universität Kiel
D-24105 Kiel, Arnold-Heller-Straße 7
e-mail: mretz@urology.uni-kiel.de*

chungen an einem größeren Patientenkollektiv.

Literatur:

1. Kim YS, Gum J, Brockhausen I. Mucin glycoproteins in neoplasia. *Glycoconj J* 1996; 13: 693–707.
2. Lesuffleur T, Zweibaum A, Real FX. Mucins in normal and neoplastic human gastrointestinal tissues. *Crit Rev Oncol Hematol* 1994; 17: 153–80.
3. Shrom SH, Parsons CL, Mulholland SG. Vesical defense: further evidence for a charge related mucosal antiadherence. *Surg Forum* 1978; 29: 632–3.
4. Ho SB, Niehans GA, Lyftogt C, Yan PS, Cherwitz DL, Gum ET, Dahiya R, Kim YS. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res* 1993; 53: 641–51.
5. Balague C, Gambus G, Carrato C, Porchet N, Aubert JP, Kim YS, Real FX. Altered expression of MUC2, MUC4, and MUC5 mucin genes in pancreas tissues and cancer cell lines. *Gastroenterology* 1994; 106: 1054–61.
6. Hanski C, Hofmeier M, Schmitt-Graff A, Riede E, Hanski ML, Borchard F, Sieber E, Niedobitek F, Foss HD, Stein H, Riecken EO. Overexpression or ectopic expression of MUC2 is the common property of mucinous carcinomas of the colon, pancreas, breast and ovary. *J Pathol* 1997; 182: 385–91.
7. Singhal A, Hakomori S. Molecular changes in carbohydrate antigens associated with cancer. *Bioessays* 1990; 12: 223–30.
8. Walsh MD, McGuckin MA, Devine PL, Hohn BG, Wright RG. Expression of MUC2 epithelial mucin in breast carcinoma. *J Clin Pathol* 1993; 46: 922–5.

9. Nakamori S, Ota DM, Cleary KR, Shirohani K, Irimura T. MUC1 mucin expression as a marker of progression and metastasis of human colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 1994; 106: 353–61.
10. Segal-Eiras A, Croce MV. Breast cancer associated mucin: a review. *Allergol Immunopathol* 1997; 25: 176–81.
11. Yonezawa S, Sueyoshi K, Nomoto M, Kitamura H, Nagata K, Arimura Y, Tanaka S, Hollingsworth MA, Siddiki B, Kim YS, Sato E. MUC2 gene expression is found in noninvasive tumors but not in invasive tumors of the pancreas and liver: its close relationship with prognosis of the patients. *Hum Pathol* 1997; 28: 344–52.
12. Walsh MD, Hohn BG, Thong W, Devine PL, Gardiner RA, Samaritunga MLTH, McGuckin MA. Mucin expression by transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol* 1994; 73: 256–62.
13. Bobek LA, Tsai H, Biesbrock AR, Levine MJ. Molecular cloning, sequence, and specificity of expression of the gene encoding the low molecular weight human salivary mucin (MUC7). *J Biol Chem* 1993; 268: 20563–9.
14. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid-guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 156–9.
15. Gum JR, Byrd JC, Hicks JW, Toribara NW, Lamport DTA, Kim YS. Molecular cloning of human intestinal mucus cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism. *J Biol Chem* 1989; 264: 6480–7.
16. Vinall LE, Hill AS, Pigny P, Pratt WS, Toribara N, Gum JR, Kim YS, Porchet N, Aubert JP, Swallow DM. Variable number tandem repeat polymorphism of the mucin genes located in the complex on 11p15.5. *Hum Genet* 1998; 102: 357–66.
17. Bergeron A, Champetier S, LaRue H, Fradet Y. MAUB is a new mucin antigen associated with bladder cancer. *J Biol Chem* 1996; 271: 6933–40.
18. Syrigos KN, Pignatelli M, Gravas S, Harrington K, Leventis A, Kehayas P, Epenetos AA. MUC1 mucin expression in bladder cancer. Correlation with histopathological data. *Br J Urol* 1997; 20: 71.
19. Badalament RA, Franklin GL, Page CM, Dasani BM, Wientjes MG, Drago JR. Enhancement of Bacillus Calmette-Guerin attachment to the urothelium by removal of the rabbit bladder mucin layer. *J Urol* 1992; 147: 482–5.

*Eingelangt am: 17. 02. 99,
angenommen nach Review am:
22. 03. 99*

Mitteilungen aus der Redaktion

Besuchen Sie unsere zeitschriftenübergreifende Datenbank

[Bilddatenbank](#)

[Artikeldatenbank](#)

[Fallberichte](#)

e-Journal-Abo

Beziehen Sie die elektronischen Ausgaben dieser Zeitschrift hier.

Die Lieferung umfasst 4–5 Ausgaben pro Jahr zzgl. allfälliger Sonderhefte.

Unsere e-Journale stehen als PDF-Datei zur Verfügung und sind auf den meisten der marktüblichen e-Book-Readern, Tablets sowie auf iPad funktionsfähig.

[Bestellung e-Journal-Abo](#)

Haftungsausschluss

Die in unseren Webseiten publizierten Informationen richten sich **ausschließlich an geprüfte und autorisierte medizinische Berufsgruppen** und entbinden nicht von der ärztlichen Sorgfaltspflicht sowie von einer ausführlichen Patientenaufklärung über therapeutische Optionen und deren Wirkungen bzw. Nebenwirkungen. Die entsprechenden Angaben werden von den Autoren mit der größten Sorgfalt recherchiert und zusammengestellt. Die angegebenen Dosierungen sind im Einzelfall anhand der Fachinformationen zu überprüfen. Weder die Autoren, noch die tragenden Gesellschaften noch der Verlag übernehmen irgendwelche Haftungsansprüche.

Bitte beachten Sie auch diese Seiten:

[Impressum](#)

[Disclaimers & Copyright](#)

[Datenschutzerklärung](#)