

Overzicht

Cytokeratine en zijn afbraakproducten als potentiële aangrijpingspunten om apoptose te monitoren in patiëntenserum

M.P.G. LEERS

De cytokeratines, behorend tot de familie van intermediaire filamenten, vormen een belangrijk onderdeel van het cytoskelet van epitheliale cellen. De grootste groep maligne tumoren zijn tumoren die ontstaan vanuit epitheliale weefsels. Daar meestal sprake is van een verhoogde celturnover in deze tumoren ziet men vaak necrose en verhoogde apoptose-activiteit rondom en in de tumorhaard. Hierbij komen niet zelden cytokeratinefragmenten terecht in bloed- en lymfevaten. Al geruime tijd maakt men van dit feit gebruik bij serumassays die CK's als aangrijpingspunt hebben. Deze serumassays worden veelal gebruikt voor het bepalen van de grootte van de tumormassa maar ook voor het monitoren van tumorrespons op therapie. Deze serumassays maken veelal gebruik van antilichamen gericht tegen epitopen gelegen op CK8, CK18 en/of CK19. De reden hiervoor is dat deze subtypen CK's de eerste epitheliale intermediaire filamenten zijn die tot expressie komen tijdens de ontwikkeling van de mens. Daarnaast komen ze voor in alle eenlagige epithelia, en blijven ze veelal tot expressie komen in carcinomen. Voorbeelden van deze serumassays zijn TPA, TPS, SSC-Ag en CYFRA 21-1. Mede door de enorme belangstelling die het apoptoseproces het laatste decennia heeft gekregen zijn er de afgelopen jaren enkele antilichamen ontwikkeld gericht tegen caspase-klievingsproducten. In normale situaties wordt een apoptotische cel onmiddellijk gefagocyteerd door macrofagen of door naburig gelegen cellen. Uit recent onderzoek is gebleken dat wanneer de apoptoseactiviteit verhoogd is, de opruiming van apoptotische fragmenten niet volledig gebeurt. Er kunnen dan apoptotische cellen en/of fragmenten in het bloed terecht komen en hierin aangetoond worden. Recentelijk is er een serumassay ontwikkeld gebaseerd op een neo-epitop die gegenereerd wordt na caspase-klieving van CK18, vroeg in het apoptose-proces. Deze assay kan gebruikt worden om apoptose op te sporen in het serum van patiënten

en het apoptoseproces te monitoren tijdens therapie van het tumorproces.

Trefwoorden: cytokeratine, apoptose, tumoren

De normale ontwikkeling van multicellulaire eukaryotische organismen vereist een geordend proces van enerzijds celaanmaak middels proliferatie en anderzijds celdood. Van celdood kunnen twee vormen onderscheiden worden: "toevallige" celdood (necrose) en geprogrammeerde celdood (apoptose). Apoptose werd in 1971 als eerste beschreven door John Kerr (1). Pas jaren later werd de betekenis hiervan in de ontwikkeling van ziektes erkend en is het sindsdien een belangrijk onderwerp van intensief onderzoek. Het speelt onder andere een belangrijke rol bij de embryogenese, bij het verwijderen van autoreactieve T-lymfocyten in de volwassen thymus en bij de opruiming van doelwitcellen door natural-killer-cellen. In tegenstelling tot necrose vindt er bij apoptose geen ontstekingsreactie plaats en worden apoptotische fragmenten al vroeg in het proces opgeruimd door fagocyten of door naburig gelegen cellen. Apoptose wordt morfologisch gekenmerkt door celschrompeling, blaasjesvorming, pyknose en condensatie van plasma- en kernmembranen. In een later stadium vinden chromatinecondensatie en DNA-fragmentatie plaats. Het gehele apoptoseproces kan in drie fasen onderscheiden worden:

1. Inductiefase: in deze fase wordt het apoptose-proces in gang gezet door externe of intracellulaire signalen, namelijk door genen die leiden tot DNA-beschadiging (intracellulair); middels "death signals" doorgegeven via receptoren op de celmembraan (Fas-ligand; extracellulair) en door proteolytische enzymen die de cel binnendringen (granzymes; intracellulair)
2. Executiefase: in deze fase vindt activatie plaats van specifieke proteases, te weten caspases
3. Degradatiefase: in de laatste fase worden onder andere celskeleteiwitten, stress-respons-eiwitten, apoptose-inhibitors en caspases zelf, in stukken geknipt en opgeruimd.

Gedurende het apoptoseproces wordt de cel in feite "ontmanteld" en opgeruimd. Dit geschiedt op een dusdanige wijze dat er zo weinig mogelijk de cel uitlokt en voorkomen wordt dat er mogelijk schadelijke

RWTH-Universitätsklinikum Aachen, Institut für Klinische Chemie & Pathobiochemie

Correspondentie: Dr. ing. M.P.G. Leers, RWTH-Universitätsklinikum Aachen, Institut für Klinische Chemie & Pathobiochemie, Pauwelsstrasse 30, 52074 Aachen, Duitsland
e-mail: matleers@wxs.nl

cytotoxische effecten optreden.

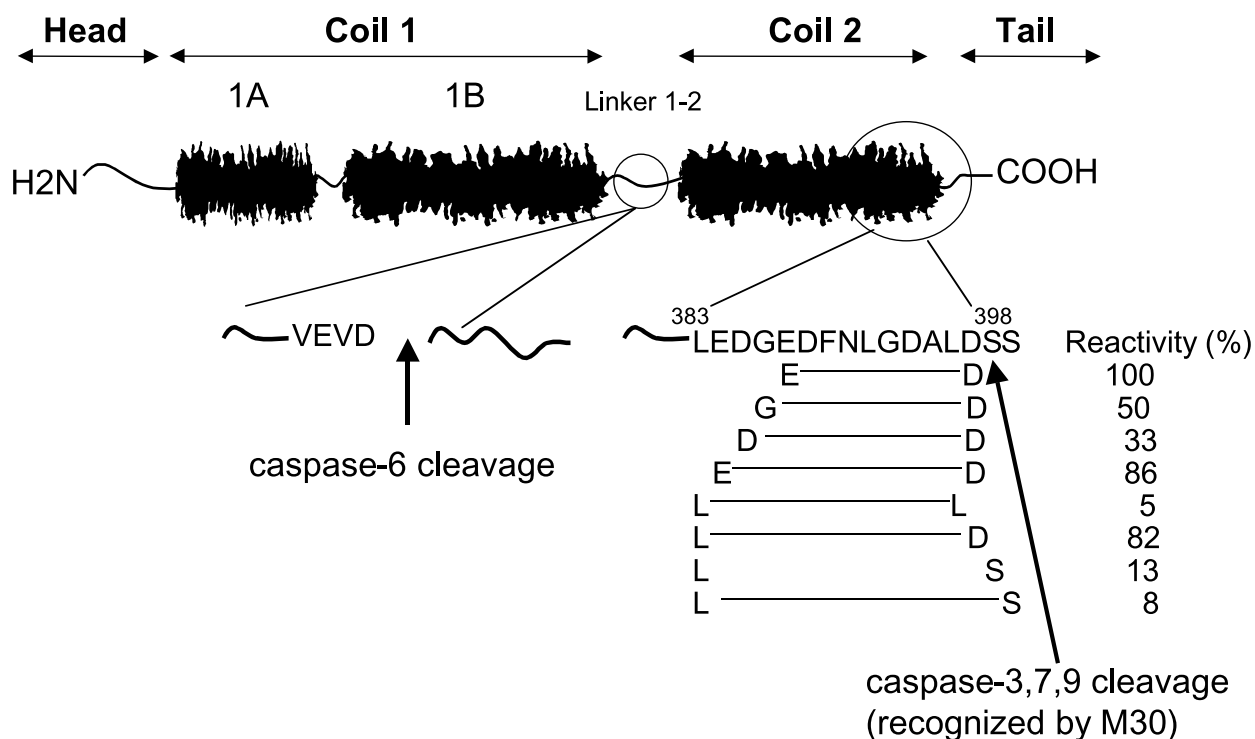
In de oncologie speelt het apoptoseproces een grote rol, waarbij het belang van de bepaling van de mate van dit proces ligt in het feit dat het een fenomeen betreft dat enerzijds uitermate gestructureerd en geregeld volgens strikte pathways loopt en anderzijds uitermate gevoelig en onderhevig is aan stimulerende maar ook inhiberende factoren (denk bijvoorbeeld aan bestraling, chemotherapie maar ook bijvoorbeeld in-vivo-effecten zoals anoxie etc). Naast oncologische processen ziet men ook bij chronisch inflammatoire ziekten (zoals bijvoorbeeld *morbus Crohn*) dat apoptose een belangrijke rol speelt. Ook hier kan de mate van apoptotische activiteit een beeld geven van de fase waarin een inflammatoir proces zich bevindt (actief of rustend). Als het effect van dit proces zijn substraat heeft in het serum, dan kan deze parameter, met behulp van een minder invasieve ingreep dan een biopsie, uitermate geschikt zijn als marker voor het monitoren van de therapie.

Het cytoskelet als substraat voor caspases

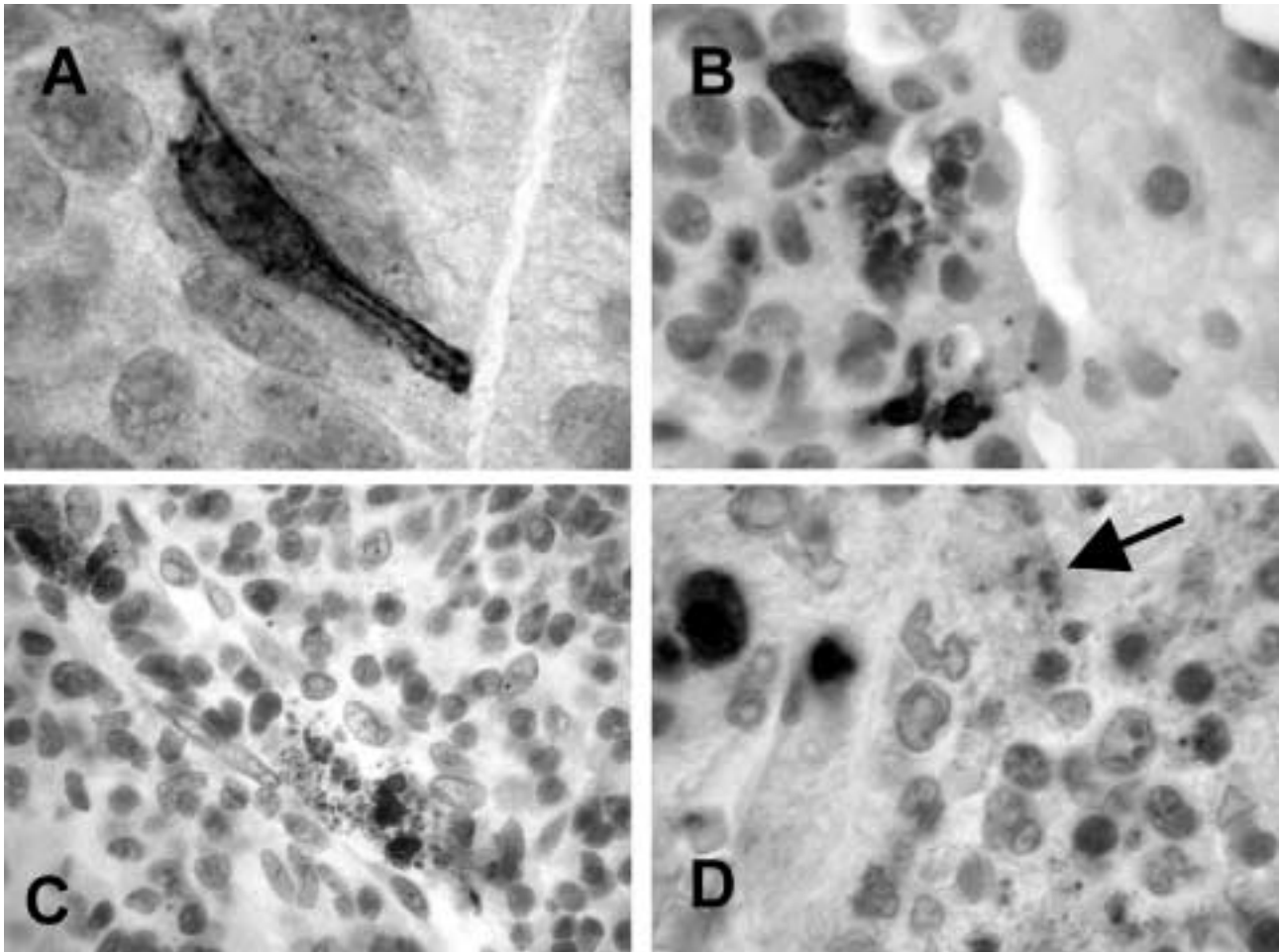
De meest voorkomende vormen van kanker zijn tumoren ontstaan uit epitheliale weefsels. Een wezenlijk bestanddeel van het cytoskelet van epitheliale weefsels (en de daaruit afgeleide tumoren) zijn de cytokeratines (CK's). Deze familie van epitheel-specifieke intermediaire filamenten omvat bij de mens 20 verschillende cytoplasma-eiwitten (wanneer men de trychocytische keratines niet meerekent) (2). De cy-

tokeratines kunnen onderverdeeld worden in type I (zure keratines, CK9 t/m CK20) en type II (neutraal tot basische keratines, CK1 t/m CK8) (3). Deze twee typen CK's vormen celtype-specifieke heteropolymeren in een verhouding van 1:1. In klierweefsel bijvoorbeeld komen CK8 en CK18 tot co-expressie, en vormen daar heterodimeren. De intermediaire filamenteiwitten worden gekenmerkt door een centraal α -helix-domein naast een non- α -helix NH₂-eind (kop) en een COOH-eind (staart)-domein (figuur 1). De morfologische veranderingen die tijdens het apoptose-proces optreden, worden onder andere veroorzaakt door de schade die door de caspases toegebracht wordt aan componenten van het cytoskelet (4-6). Er treedt een complete reorganisatie op van het celskelet: naast caspase-klieving van de celskeleteiwitten vinden er ook allerlei posttranscriptionele modificaties plaats in deze eiwitten (fosforylatie, cross-linking etc.) (7). Bijna alle typen intermediaire filamenten bevatten een algemeen voorkomende caspase-klievingsplaats in het L1-2-verbindingstuk van de centrale α -helix-domein (figuur 1). Naast deze algemene klievingsplaats, is door Caulin en medewerkers in CK18 in het COOH-staartuiteinde een tweede caspase-klievingsplaats aangetoond (8). Recentelijk is er een monoclonaal antilichaam gekarakteriseerd, M30-cytodeath genaamd, dat specifiek gericht blijkt te zijn tegen het neo-epitop dat ontstaat na caspase-klieving van deze tweede klievingsplaats (9). Testen met synthetisch geprepareerde peptides hebben aan-

Cytokeratin 18:



Figuur 1. Schematische voorstelling van CK18 met hierin weergegeven de twee verschillende caspase-klievingsplaatsen. De intermediaire filamenten hebben allen een gelijksoortige structuur met respectievelijk een NH₂-kop en een COOH-staartuiteinde met daartussen een α -helix-spiraaldomein. Dit α -helix-spiraaldomein kan onderverdeeld worden in subdomeinen die met elkaar verbonden zijn met een kort verbindingstuk (Linker 1-2).



Figuur 2. Microscopische opnames van M30-immunoreactiviteit in een patiënt met een colontumor. In (A) ziet men een epitheliale tumorcel vroeg in het apoptoseproces. De M30-immunoreactiviteit is zichtbaar als een filamenteus aangekleurd cytoskelet. Verder in het apoptoseproces worden de cyokeratines verder gekliefd en is de immunoreactiviteit zichtbaar als in het cytoplasma gelegen geaggregeerde cyokeratinefragmenten (B). Als de apoptoseactiviteit verhoogd is waardoor het "clearance"-systeem te kort schiet vindt men vaak M30-positieve fragmenten in de naburig gelegen bloed- en lymfevaten (C). Uiteindelijk komen deze fragmenten in de rode pulpa van de milt terecht waar ze met M30-cytodeath aantoonbaar zijn (D).

getoond dat positie 387-397 van CK18 met aan het vrij COOH-uiteinde de sequentie DALD↓S gedefinieerd kan worden als zijnde het 10-residu-epitoom dat herkend wordt door M30-cytodeath (figuur 1) (9).

M30-cytodeath als apoptosemarker

M30-reactiviteit blijkt al vroeg in het apoptoseproces op te treden. De vorming van het neo-epitoom vindt plaats voorafgaand aan het verlies van membraanasymmetrie (aan te tonen met de annexine-V-test), DNA-fragmentatie (aan te tonen met de TUNEL- en de *in situ* nick-end-labelingassay) en voorafgaand aan de caspase-klieving van het L1-2-verbindingstuk van de centraal α -helix-domein (6, 9). Microscopische studies aan epitheliale cellijnen (MR65: afkomstig van een humane niet-kleincellige longtumor) hebben aangetoond dat het cytoskelet in dit stadium nog vrijwel intact is. De M30-reactiviteit is zichtbaar als een filamenteus aankleuringspatroon (figuur 2A). In een later stadium van het apoptose-proces vindt klieving van het L1-2-verbindingstuk plaats. De reactiviteit van M30 blijft dan nog aanwezig. Zodra klieving van dit verbindingstuk plaatsvindt klappt het cytoskelet in elkaar en vindt er aggregatie plaats van

de cyokeratinefilamenten (figuur 2B). De cel valt hierna snel uit elkaar in apoptotische "bodies".

Het opruimen van apoptotische fragmenten

Vlak na generatie van het M30-neo-epitoom, treedt er verlies op van membraanasymmetrie. Hierbij komen fosfatidylserineresiduen aan het buitenoppervlak van de celmembraan terecht. Deze residuen fungeren als trigger voor het aantrekken van fagocyten om deze apoptotische celfragmenten effectief op te ruimen. Met behulp van breedspectrum CK-antilichamen kunnen in deze macrofagen cyokeratine-epitopen nog aangetoond worden (4, 5, 8, 9). Met het M30-cytodeath-antilichaam zijn bij de volwassen mens in normale situaties geen vrij voorkomende individuele apoptotische celfragmenten aantoonbaar.

In een recente studie hebben we echter aangetoond dat in situaties waar apoptoseactiviteit verhoogd is (chronische inflammatoire processen, epitheliale maligniteiten etc.) wel vaak M30-positieve apoptotische fragmenten en macrofagen gevonden konden worden in het omliggende weefsel maar ook in bloed- en lymfevaten (figuur 2C) (10). Deze fragmenten bleken niet te reageren met breedspectrum CK-antilichamen.

Een verklaring hiervoor is dat het epitoom van M30 een andere locatie (COOH-uiteinde) heeft op CK18 dan de meest voorkomende breedspectrum CK-antilichamen. In bovengenoemde studie werd naast het primair pathologisch proces ook de milt grondig bestudeerd (10). Hierbij viel het op dat er in normale situaties zelden een apoptotisch fragment gevonden werd in de rode pulpa van de milt. Echter, in patiënten met een verhoogde apoptotische activiteit, bijvoorbeeld een chronische inflammatoir proces (bijvoorbeeld morbus Crohn) was er een enorme ophoping van M30-positieve apoptotische fragmenten in de rode pulpa van de milt te zien (figuur 2D). Een verdere opmerkelijke bevinding in deze studie was dat bij meer dan 80% van de patiënten met een gemetastaseerd tumorproces een enorme ophoping van grotere M30-positieve fragmenten met kleine pyknotische kernfragmenten (DNA bevattend) in de milt gevonden werden. Deze DNA-bevattende fragmenten werden zelden gevonden in patiënten met niet-maligne pathologische processen. Holmgren en medewerkers hebben recentelijk aangetoond dat DNA vanuit apoptotische fragmenten waarin oncogenen voorkwamen horizontaal overgedragen kunnen worden naar andere eukaryotische cellen. In deze cellen werden deze oncogenen geïntegreerd in het gastheer-DNA. Dit resulteerde in aneuploidie en genetische veranderingen noodzakelijk voor tumorvorming (11, 12). Het is denkbaar dat de DNA-bevattende apoptotische fragmenten in de milt van patiënten met gemetastaseerde tumorprocessen op dezelfde manier kunnen leiden tot overdracht en integratie van tumor-DNA-fragmenten naar normale cellen en kunnen leiden tot latere metastasen.

Cytokeratines als serummarker

De meeste assays die ontwikkeld zijn voor het aantonen van cytotkeratines of fragmenten hiervan in het serum maken veelal gebruik van antilichamen gericht tegen epitopen gelegen op CK8, CK18 en/of CK19. De reden hiervoor is dat deze subtypen CK's enkele eigenschappen hebben waardoor ze zich onderscheiden van de andere familieleden van de type-I- en type-II-cytokeratines. Ze zijn o.a. de eerste epitheliale intermediaire filamenten die tot expressie komen tijdens de ontwikkeling van de mens. Daarnaast komen ze voor in alle eenlagige epithelia en blijven ze veelal tot expressie komen in carcinomen. De voornaamste serummarkerassays gebaseerd op de detectie van cytotkeratines zijn TPA, TPS, SCC-Ag en Cyfra 21-1. Traditioneel werden deze assays beschouwd als proliferatiemarkers, ofschoon wetenschappelijke bewijzen voor deze link beperkt zijn.

TPA oftewel "tissue polypeptide antigen" is een van de eerste serummarkers die in 1957 door Björklund en medewerkers ontwikkeld werd (13). Biochemisch gezien bestaat gezuiverd TPA uit verschillende polypeptiden met een 43-kDa-eiwit als belangrijkste component. Immunochemisch onderzoek heeft aangetoond dat antilichamen gericht tegen TPA, fragmenten van CK8, -18 en -19 binden (14). Geruime tijd is TPA geassocieerd met proliferatie. Gedurende verhoogde epitheliale cell-turnover (bijvoorbeeld bij

wondgenezing, ontsteking of tumorgroei) hopen zich namelijk cytotkeratinefragmenten op rondom de tumor en komen ze in lymfe- en bloedvaten terecht. Dientengevolge kunnen ze hierin aangetoond worden. TPA kan als marker gebruikt worden om patiënten met cervixcarcinomen te monitoren (15). TPS wordt beschouwd als een verbetering van de TPA-assay. Net als TPA blijkt TPS prognostisch van betekenis te zijn. Er zijn studies beschreven waarbij TPS correleert met klinische follow-up in de univariate analyse (16-21) en in 4 van deze studies blijven de resultaten zelfs significant wanneer andere prognostische factoren meegerekend werden (16, 17, 19, 21). SCC-Ag is een 48-kDa-eiwit met een sterke homologie aan de serpine-familie van proteaseremmers. Serumbepalingen van SCC-Ag worden onder andere gedaan bij patiënten met plaveiselcelcarcinomen van de cervix, oesofagus, longen en bij hoofd-hals-tumoren. Daarnaast heeft het een belangrijke toepassing als een diagnostisch hulpmiddel bij longtumoren (22, 23).

Cyfra 21-1 is een relatief nieuwe tumormarkerassay gebruik makend van twee specifieke monoclonale antilichamen gericht tegen CK19-fragmenten (KS19-1 en BM19-21). CK 19, een zure type-I-keratine, komt wijdverbreid tot expressie in alle eenlagige epithelia en in de carcinomen die hieruit ontstaan. Het is de meest gevoelige tumormarker bij niet-kleincellige longtumoren, inclusief de plaveiselceltumoren (20, 24-29). Daarnaast blijkt Cyfra 21-1 bij longtumoren bruikbaar te zijn om het verloop van het ziekteproces te monitoren en om een eventuele terugval tijdig te detecteren (19, 28, 30)

Gaarenstroom en collega's, die onderzoek deden naar het gebruik van bovengenoemde drie markers (TPA, SCC-ag en Cyfra 21-1) bij het cervixcarcinoom, stelden vast dat hun concentraties in het serum positief gecorreleerd zijn met het tumorstadium, tumorgrootte en infiltratiediepte van de tumor. Echter met behulp van de preoperatieve serumwaarden waren ze niet in staat om betrouwbaar het bestaan van lymfkliermetastasen, uitbreiding van de tumor in het parametrium of de prognose van deze patiënten, te kunnen voorspellen (31-35).

CK-afbraakproducten als serummarker

Steeds meer onderzoek wordt verricht naar de betekenis van apoptotische cellen, fragmenten en/of vrije CK-afbraakproducten in het bloed. Mehes en medewerkers toonden recentelijk aan dat in het bloed van patiënten met een mammacarcinoom een groot gedeelte van de in het bloed circulerende tumorcellen apoptotisch waren (36). Daarnaast toonden wij recentelijk met behulp van immunohistochemie aan dat naast apoptotische circulerende tumorcellen ook grote hoeveelheden apoptotische celfragmenten in bloed- en lymfevaten voorkomen zodra de apoptotische activiteit verhoogd is (10). Zolang de gekielde CK-fragmenten omgeven worden door een intacte celmembraan zijn ze behoorlijk stabiel (37) en kunnen ze hierin aangetoond worden. Recentelijk is een nieuwe ELISA-assay ontwikkeld, gebaseerd op het M30-cytodeath monoclonaal antilichaam, genaamd

ApoptoSense (Peviva, Bromma, Zweden). In deze assay wordt het monoclonale antilichaam 5E (gericht tegen een epitoom op het 284-396 fragment van CK18) gebruikt als catcher en peroxidase-gelabeld M30-cytodeath als detector. Eerste evaluatiestudies van deze assay hebben aangetoond dat de assay onder andere geschikt is voor een snelle screening van het effect van geneesmiddelen met pro-apoptotische eigenschappen (38). Daar de meeste kankertherapieën resulteren in een snelle initiatie van apoptose in tumorcellen kan de assay ook gebruikt worden om therapierespons bij deze patiënten te monitoren. In een beperkte serie van patiënten met een mammapcarcinoom werden hogere waarden van apoptoseactiviteit in het serum waargenomen ten opzichte van gezonde controlepatiënten. Tijdens de behandeling van de tumor namen bij patiënten die hierop positief reageerden de M30-waarden in het serum toe (39). Cytokeratines en zijn afgeleiden hiervan blijken waardevolle markers te zijn voor het stageren en monitoren van carcinoomprocessen. Hoewel op het moment nog niet geheel duidelijk is of verhoogde waarden van TPS en Cyfra 21-1 afkomstig zijn van apoptotische, of van prolifererende cellen (of van beiden), is het wel vrijwel zeker dat de M30-apoptosense-assay specifiek apoptotische cytokeratine-celfragmenten detecteert. Het nut van de M30-serumassay in het stageren en monitoren van tumorprocessen zal in vervolgstudies echter nog bewezen moeten worden.

Literatuur

- Kerr J. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol* 1971; 105: 13-20.
- Fuchs E, Weber K. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 345-382.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31: 11-24.
- Tinnemans MM, Lenders MH, Velde GP ten, Ramaekers FC, Schutte B. Alterations in cytoskeletal and nuclear matrix-associated proteins during apoptosis. *Eur J Cell Biol* 1995; 68: 35-46.
- Engeland M van, Kuijpers HJ, Ramaekers FC, Reutelingsperger CP, Schutte B. Plasma membrane alterations and cytoskeletal changes in apoptosis. *Exp Cell Res* 1997; 235: 421-430.
- Schutte B, Henfling M, Kölgen W, et al. Cytokeratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. Manuscript in preparation.
- Utz PJ, Anderson P. Posttranslational protein modifications, apoptosis, and the bypass of tolerance to autoantigens. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1152-1160.
- Caulin C, Salvesen GS, Oshima RG. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol* 1997; 138: 1379-1394.
- Leers M, Kölgen W, Björklund V, et al. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol* 1999; 187: 567-572.
- Leers MPG, Björklund V, Björklund B, Jörnvall H, Nap M. An immunohistochemical study of the clearance of apoptotic cellular fragments. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 1358-1365.
- Holmgren L, Szeles A, Rajnavolgyi E, et al. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* 1999; 93: 3956-3963.
- Bergsmedh A, Szeles A, Henriksson M, et al. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 6407-6411.
- Björklund B, Björklund V. Antigenicity of pooled human malignant and normal tissues by cytoimmunological techniques: presence of an insoluble, heat-labile tumor antigen. *Int Arch Allergy* 1957; 10: 153-184.
- Moll R. Epithelial tumor markers: cytokeratins and tissue polypeptide antigen (TPA). *Curr Top Pathol* 1987; 77: 71-101.
- Björklund B. On the nature and clinical use of Tissue Polypeptide Antigen (TPA). *Tumor Diagnostik* 1980; 1: 9-20.
- Nisman B, Lafair J, Heching N, et al. Evaluation of tissue polypeptide specific antigen, CYFRA 21-1, and carcinoembryonic antigen in nonsmall cell lung carcinoma: does the combined use of cytokeratin markers give any additional information? *Cancer* 1998; 82: 1850-1859.
- Nisman B, Amir G, Lafair J, et al. Prognostic value of CYFRA 21-1, TPS and CEA in different histologic types of non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 1999; 19: 3549-3452.
- Ray P, Quantin X, Grenier J, Pujol JL. Predictive factors of tumor response and prognostic factors of survival during lung cancer chemotherapy. *Cancer Detect Prev* 1998; 22: 293-304.
- Gaast A van der, Schoenmakers CH, Kok TC, Blijenberg BG, Hop WC, Splinter TA. Prognostic significance of tissue polypeptide-specific antigen (TPS) in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 1994; 12: 1783-1786.
- Pujol JL, Grenier J, Parrat E, et al. Cytokeratins as serum markers in lung cancer: a comparison of CYFRA 21-1 and TPS. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 725-733.
- Pujol JL, Cooper EH, Grenier J, et al. Clinical evaluation of serum tissue polypeptide-specific antigen (TPS) in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 1994; 12: 1768-1774.
- Molina R, Torres MD, Moragas M, et al. Prognostic significance of SCC antigen in the serum of patients with head and neck cancer. *Tumour Biol* 1996; 17: 81-89.
- Molina R, Fuentes R, Bover I, et al. Tumour markers (CEA, CA125, CYFRA 21-1, SCC and NSE) in NSCLC patients as aid in histological diagnosis and prognosis: comparison with the main clinical, pathological and anthropomorphic prognostic factors. *Br J Cancer* 2002: submitted.
- Molina R, Agusti C, Mane JM, et al. CYFRA 21-1 in lung cancer: comparison with CEA, CA 125, SCC and NSE serum levels. *Int J Biol Markers* 1994; 9: 96-101.
- Stieber P, Dienemann H, Hasholzner U, et al. Comparison of cytokeratin fragment 19 (CYFRA 21-1), tissue polypeptide antigen (TPA) and tissue polypeptide specific antigen (TPS) as tumour markers in lung cancer. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1993; 31: 689-694.
- Stieber P, Bodenmuller H, Banauch D, et al. Cytokeratin 19 fragments: a new marker for non-small-cell lung cancer. *Clin Biochem* 1993; 26: 301-304.
- Stieber P, Hasholzner U, Bodenmuller H, et al. CYFRA 21-1. A new marker in lung cancer. *Cancer* 1993; 72: 707-713.
- Niklinski J, Furman M, Chyczewska E, Chyczewski L, Rogowski F, Laudanski J. Diagnostic and prognostic value of the new tumour marker CYFRA 21-1 in patients with squamous cell lung cancer. *Eur Respir J* 1995; 8: 291-294.
- Gaast A van der, Schoenmakers CH, Kok TC, Blijenberg BG, Cornillie F, Splinter TA. Evaluation of a new tumour marker in patients with non-small-cell lung cancer: Cyfra 21.1. *Br J Cancer* 1994; 69: 525-528.
- Stieber P, Zimmermann A, Reinmiel J, Muller C, Hofmann H, Dienemann H. CYFRA 21-1 in the early diagnosis of recurrent disease in non small cell lung carcinomas (NSCLC). *Anticancer Res* 1999; 19: 2665-2668.

31. Gaarenstroom KN, Bonfrer JM, Kenter GG, et al. Clinical value of pretreatment serum Cyfra 21-1, tissue polypeptide antigen, and squamous cell carcinoma antigen levels in patients with cervical cancer. *Cancer* 1995; 76: 807-813.
32. Gaarenstroom KN, Bonfrer JM, Korse CM, Kenter GG, Kenemans P. Value of Cyfra 21-1, TPA, and SCC-Ag in predicting extracervical disease and prognosis in cervical cancer. *Anticancer Res* 1997; 17: 2955-2998.
33. Gaarenstroom KN, Kenter GG, Bonfrer JM, et al. Can initial serum cyfra 21-1, SCC antigen, and TPA levels in squamous cell cervical cancer predict lymph node metastases or prognosis? *Gynecol Oncol* 2000; 77: 164-170.
34. Bonfrer JM, Gaarenstroom KN, Kenter GG, et al. Prognostic significance of serum fragments of cytokeratin 19 measured by Cyfra 21-1 in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1994; 55: 371-375.
35. Bonfrer JM, Gaarenstroom KN, Korse CM, Bunningen BN van, Kenemans P. Cyfra 21-1 in monitoring cervical cancer: a comparison with tissue polypeptide antigen and squamous cell carcinoma antigen. *Anticancer Res* 1997; 17: 2329-2334.
36. Mehes G, Witt A, Kubista E, Ambros PF. Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic. *Am J Pathol* 2001; 159: 17-20.
37. Ku NO, Liao J, Omary MB. Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins. *J Biol Chem* 1997; 272: 33197-33203.
38. Hägg M, Bivén K, Ueno T, et al. A novel high-throughput assay for screening of pro-apoptotic drugs. *Invest New Drugs* 2002; 20: 253-259.
39. Linder S, Bivén K, Björklund P. The M30 antibody can be used to quantitate apoptosis in breast cancer cell extracts and culture supernatants. *Tumor Biol* 2000; 21(suppl): 30.

Summary

Cytokeratin and its degradation products as serum marker to monitor apoptosis. Leers MPG. Ned Tijdschr Klin Chem 2002; 27: 19-24.

Cytokeratins belong to the family of intermediate filaments and constitute the cytoskeleton of epithelial cells. Malignant tumors derived from epithelial cells (carcinomas) are the most common form of cancer. In most carcinomas an increased cell turnover can be detected which in turn leads to necrosis and an increase in apoptotic activity within and in the neighbourhood of the tumor. This is often accompanied by leakage of cytokeratin fragments into blood and lymph vessels. The presence of cytokeratin fragments in blood can be detected by serum assays which make use of antibodies directed against epitopes situated on the cytokeratins or their fragments. Most often these assays are used for the determination of the size of the tumor burden or for monitoring tumor response on therapy. Most serum assays for the determination of cytokeratins make use of antibodies directed against epitopes on CK8, CK18 and/or CK19. The reason is that several characteristics of CK8 and CK18 distinguish them from other members of the type I and II cytokeratins. First, they are the first intermediate filaments to be expressed during mammalian development. Secondly, they are expressed in simple, or predominantly single layered internal epithelia. And finally, they are common and persistently expressed in carcinomas. Examples of these serum assays are TPA, SSC-Ag and CYFRA 21-1. Due to the increased interest in the last decennium for the impact of apoptosis on the pathological process, several new antibodies are developed directed against caspase-cleavage products. The recently characterised monoclonal antibody M30-cytodeath recognizes a neo-epitope on CK18 that is generated during the first steps of caspase cleavage in apoptosis. Using this antibody, it was shown that during increased apoptotic activity, fragments of apoptotic epithelial cells still harbouring cytokeratin fragments can be detected in blood and lymph vessels. Recently, a new serum assay has been developed based on the M30-cytodeath antibody, named M30-Apoptosense. This assay can be used to trace apoptosis in serum and plasma, and to monitor the apoptotic response after tumor therapy.

Key-words: apoptose, tumors, cytokeratin.