

8. Marcovina SM, Albers JJ. Standardization of the immunological determination of apolipoproteins A-1 and B: A report on the International Federation of Clinical Chemistry Meeting on standardization of apolipoprotein A-1 and B measurements (basis for future consensus), Vienna, Austria, April 18-19, 1989.
9. Swinkels DW, Hak-Lemmers HLM, Demacker. Single spin density gradient ultracentrifugation method for the detection and isolation of light and heavy low density lipoprotein subfractions. *J Lipid Res* 1987; 28: 1233-1239.
10. De Graaf J, Swinkels DW, de Haan AFJ, Demacker PNM, Stalenhoef AFH. Both inherited susceptibility and environmental exposure determine the low density lipoprotein subfraction pattern distribution in healthy Dutch families. *Am J Human Genet* 1992; 51: 1295-1310.
11. Contois JH, McNamara JR, Lammi-Keefe CJ, Wilson PWF, Massov T, Schaeffer EJ. Reference intervals for plasma apolipoprotein B determined with a standardized commercial immunoturbidimetric assay: results from the Framingham Offspring Study. *Clin Chem* 1996; 42: 515-523.
12. Sniderman AD and Cianflone K. Measurement of apoproteins: Time to improve the diagnosis and treatment of the atherogenic dyslipoproteinemia. Editorial. *Clin Chem* 1996; 42: 489-491.
13. Sniderman A, Shapiro S, Marpole D, Skinner B, Teng B, Kwitovitch PO. Association of coronary atherosclerosis with hyperapobetalipoproteinemia (increased protein but normal cholesterol levels in human plasma low density lipoproteins). *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 604-608.
14. Bachorik PS, Ross JW. National Cholesterol Education, recommendations for measurement of low-density lipoprotein cholesterol; executive summary. *Clin Chem* 1995; 41: 1414-1420.
15. Demacker PNM, Schade RB, Jansen RTP, van 't Laar A. Intra-individual variation of serum cholesterol, triglycerides, and high density lipoprotein cholesterol in normal humans. *Atherosclerosis* 1982; 45: 259-266.
16. Kissebah AH, Alfarski S, Adams PW. Integrated regulation of very low density lipoprotein triglyceride and apolipoprotein-B kinetics in man. Normolipidemic subjects, familial hypertriglyceridemia and familial combined hyperlipidemia. *Metabolism* 1981; 30: 856-868.
17. Swinkels DW, Demacker PNM, Hendriks JCM, Breninkmeijer BJ, Stuyt PMJ. The relevance of a protein-enriched low density lipoprotein as a risk for coronary heart disease in relation to other known risk factors. *Atherosclerosis* 1989; 77: 59-67.

Summary

Very dense LDL and an elevated plasma apolipoprotein B concentration as alternatives for the lipid status of patients with an increased risk for atherosclerosis. Demacker PNM, Veerkamp M, Graaf J de, Bredie SJH, Swinkels DW and Stalenhoef AFH. Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 44-49.

A deviating lipoprotein pattern can be a risk factor for atherosclerosis and coronary heart disease. Usually, plasma cholesterol and triglyceride concentrations are determined to get an insight into a possible lipoprotein abnormality. If there are deviations, lipoprotein analysis will allow a further differentiation. Sniderman and Cianflone (12) recently proposed that this multiple parameter approach can be replaced by a single apolipoprotein B analysis with the advantage that the examined person does not need to be examined in fasting state.

We compared both approaches in a family study in which 506 persons participated. Despite the fact that we missed the golden standard coronary arteriography, it was informative to compare the groups that were included with either parameter in the normal or high risk group. By this means we identified persons with the classical pattern called normolipidemic hyperapobetalipoproteinemia. It was found that all these patients had a plasma triglyceride concentration between 1.5 and 2.0 mmol/l which suggests that from a plasma triglyceride value of 1.5 mmol/l or higher the LDL subfraction pattern becomes very dense. By comparing the cumulative percentages of the distribution of triglycerides, it could be shown that a plasma triglyceride value of 1.5 mmol/l perfectly distinguished between the groups with light and dense LDL versus extra dense LDL.

These results are a plea to decrease the upper limit for the plasma triglycerides to 1.5 mmol/l. In addition, the results confirm the high diagnostic potential of the plasma apolipoprotein B concentration.

Keywords: hyperlipidemia; apolipoprotein B; coronary heart disease; risk estimation

Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 49-52

Moleculaire liquordiagnostiek van leptomeningeale metastasen

D.W. SWINKELS¹, J.B. de KOK¹, O.J.M. VOGELS², A. HANSELAAR³, K. J.B. LAMERS⁴, J. GIJTENBEEK²
en R.H. BOERMAN^{2,5}

Moleculaire detectie van de tumor afkomstig DNA in de liquor cerebrospinalis biedt mogelijkheden voor vroege en gevoelige detectie van leptomeningeale metastasen (LMM). We beschrijven de detectie van

Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium¹, Neurologie², Pathologie³ en Laboratorium Kindergeneeskunde en Neurologie⁴, Academisch Ziekenhuis Nijmegen St. Radboud; Neurologie, Ziekenhuis Rijnstate Arnhem⁵.

Correspondentie: Dr. D.W. Swinkels, CKCL 564, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.
E-mail: D.Swinkels@CKCL.azn.nl

vrij gemuteerd K-ras-DNA in de liquor van twee patiënten met LMM. Beide patiënten hadden een adenocarcinoom van de long, waarin een K-ras-mutatie (codon 12: GGT→TGT) kon worden aangetoond. Identieke mutaties werden in het supernatant van de liquor gevonden met behulp van mutant-allel-specifieke amplificatie (MASA) nog voordat bij cytologisch onderzoek maligne cellen werden gezien. We concluderen dat detectie van K-ras-mutaties in de liquor van patiënten met klinische verdenking op LMM een veelbelovende methode is voor (vroeg)diagnostiek van LMM van adenocarcinomen van de long. Omdat K-ras-mutaties bij ongeveer 30% van de longadenocarci-

nomen voorkomen en zelden bij andere solide tumoren die naar de leptomeningen uitzaaien, zijn andere moleculaire merkstoffen nodig om het klinische toepassingsgebied van de op PCR-gebaseerde methodieken voor de (vroeg)diagnostiek en follow-up van LMM te verruimen.

Trefwoorden: leptomeningeale metastasen; liquor; mutant-allel-specifieke amplificatie

Solide tumoren kunnen uitzaaien naar de liquorruimte. Hierbij worden de hersenvliezen en de subarachnoidale ruimte rond hersenvliezen en ruggemerg geïnfiltrerd met tumorcellen. Deze zogenoemde leptomeningeale metastasen (LMM) vormen een ernstige complicatie bij kanker. Hoewel exacte gegevens over de incidentie ontbreken, worden bij 4-8 % van de geobserveerde patiënten met systemische solide tumoren LMM gevonden (1,2). Van deze tumoren zijn het vooral de melanomen en de borst- en longtumoren die naar de leptomeningen metastaseren (1-3). De kliniek van LMM is vooral multifocaal met neurologische symptomen die terug zijn te voeren naar compressie op cerebrale, spinale of perifere zenuwstructuren waaronder een organisch psychosyndroom, hoofdpijn, loopstoornissen, blaas- en darmstoornissen, focale paresen, radiculair syndroom, gehoor- en visusverlies (1-4). Aangezien een tijdige behandeling, bestaande uit radiotherapie en (of) intrathecale chemotherapie, verlichting van neurologische verschijnselen kan geven met verlenging van de overlevingstijd, is het belangrijk om de diagnose LMM zo vroeg mogelijk te stellen (1-3). De definitieve diagnose berust op het vinden van maligne cellen in de liquor cerebrospinalis (liquor) met behulp van cytologisch onderzoek (1,2). De sensitiviteit van deze methode is ech-

ter matig en vaak zijn meerdere lumbaalpuncties nodig om de diagnose te kunnen stellen waardoor de behandeling vertraging oploopt (1-4,6). Vanwege deze lage sensitiviteit van dit cytologisch onderzoek hebben aanvullende liquoranalyses ondersteunende waarde voor de diagnose. Zo verhogen een verhoogd eiwitgehalte en afwijkende neuroradiologische bevindingen in de aanwezigheid van multifocale symptomen de sensitiviteit voor LMM (4,7). Ook aan specifieke en niet specifieke tumormerkstoffen als bijvoorbeeld CEA, β -glucuronidase en LDH-isoenzymen wordt aanvullende diagnostische waarde toegeschreven (1,2,8,9). Daarnaast is in situ hybridisatie waardevol gebleken in aanvulling op routine cytologisch onderzoek (4). Tenslotte kan ook detectie van vrij tumor-DNA in de liquor de sensitiviteit van de detectie van LMM verhogen (10-13). Hiervoor zijn geen intacte cellen nodig.

Dit artikel beschrijft de detectie van mutaties in het *K-ras*-oncogen in de liquor van twee patiënten met klinische verdenking op LMM zonder cytologische afwijkingen in de liquor (14).

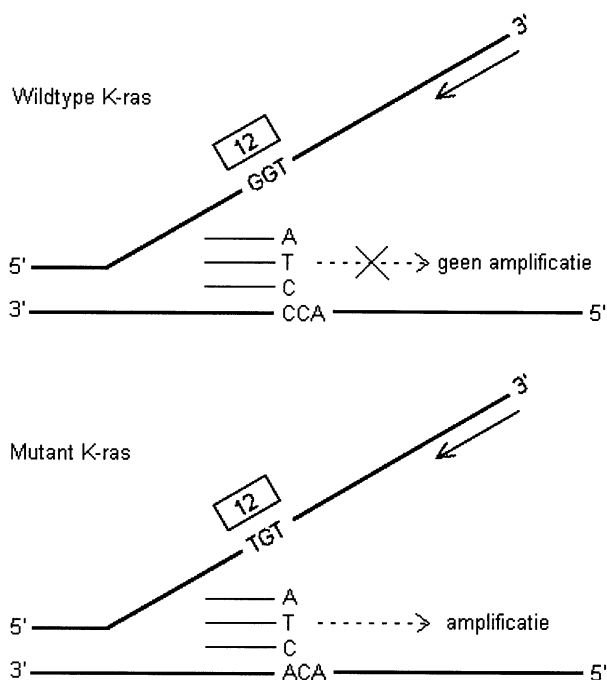
METHODEN

Casus

Patiënten (A en B) leden beiden aan een adenocarcinoom van de long, met metastasen in het cerebellum. De behandeling bestond uit resectie van de metastase gevolgd door radiotherapie. Een voor LMM verdacht klinisch beeld ontstond 24 (patiënt A) en 2 weken (patiënt B) na de resectie. Patiënt A klaagde over radicaire pijnen in beide armen. Hoewel de kernspinresonantietomografie (MRI) paste bij LMM, was de cytologie van het eerste liquormonster negatief. Pas 4 weken hierna, bij de tweede lumbaalpunctie, konden tumorcellen in de liquor worden aangetoond. Patiënt B klaagde over dubbelzien en uitstralende pijn in beide benen. De klinische verdenking op LMM kon aanvankelijk niet worden bevestigd met cytologisch onderzoek van de liquor. Na 11 weken had hij een organisch psychosyndroom ontwikkeld met multifocale radiculopathie. Het cytologische liquoronderzoek was nu wel diagnostisch voor LMM.

Mutatie-analyse met behulp van mutant-allel-specifieke amplificatie (MASA)

PCR-amplificatie vindt alleen plaats bij volledige complementariteit van primers. Bij MASA worden de PCR-primers daarom dusdanig ontwikkeld dat de 3'primeruiteinden complementair zijn aan alle mogelijke puntmutaties maar niet aan wildtype DNA (figuur 1) (15,16). In het *K-ras*-gen kunnen op codon 12 twee lokaties muteren die leiden tot een verandering in het eiwit (nucleotiden op lokaties 1 en 2). Per locatie kunnen 3 nucleotide-veranderingen optreden, waardoor in totaal 2 setjes van 3 verschillende mutant-specifieke primers nodig zijn om voor beide locaties alle mogelijke puntmutaties te detecteren. Indien amplificatie is opgetreden met een set, kan vervolgens de exacte aard van de mutatie worden aangetoond door de 3 primers uit deze set individueel te testen.

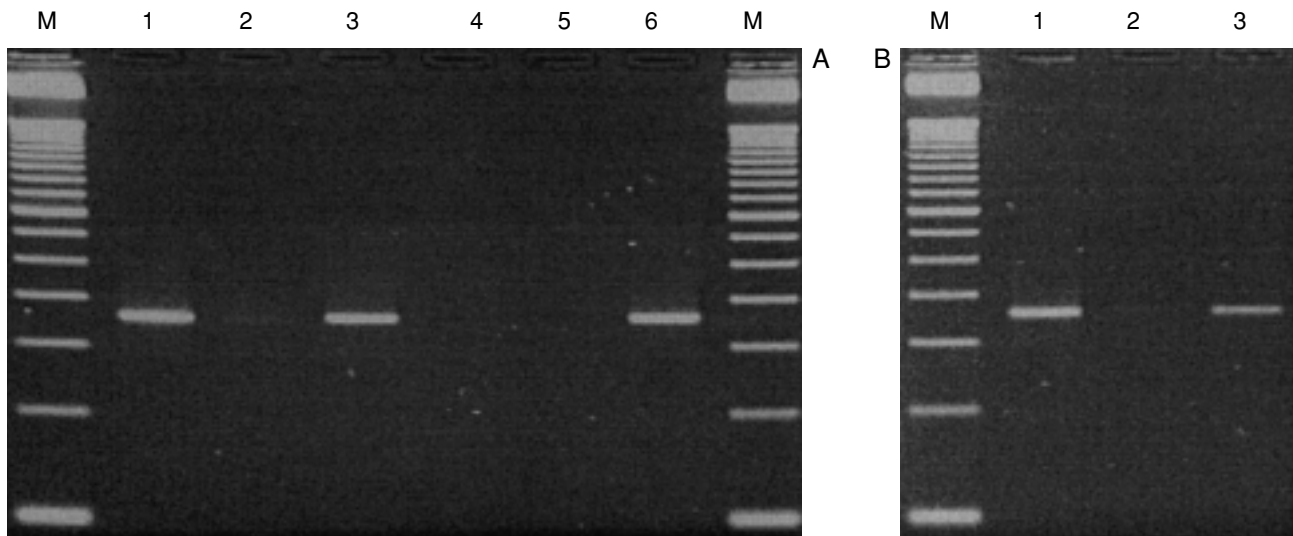


Figuur 1. Mutant-allel-specifieke amplificatie (15,16). Amplificatie treedt alleen op als de 3'-kant van de MASA-primer volledig complementair is aan de mutante variant op het eerste nucleotide van *K-ras* codon 12.

RESULTATEN

Liquor van beide patiënten werd verzameld ten tijde van de initiële klinische presentatie van LMM en gecentrifugeerd. Het pellet werd gebruikt voor cytologie en er konden geen maligne cellen worden aangetoond. Vrij DNA werd geïsoleerd uit 0,5 ml superna-

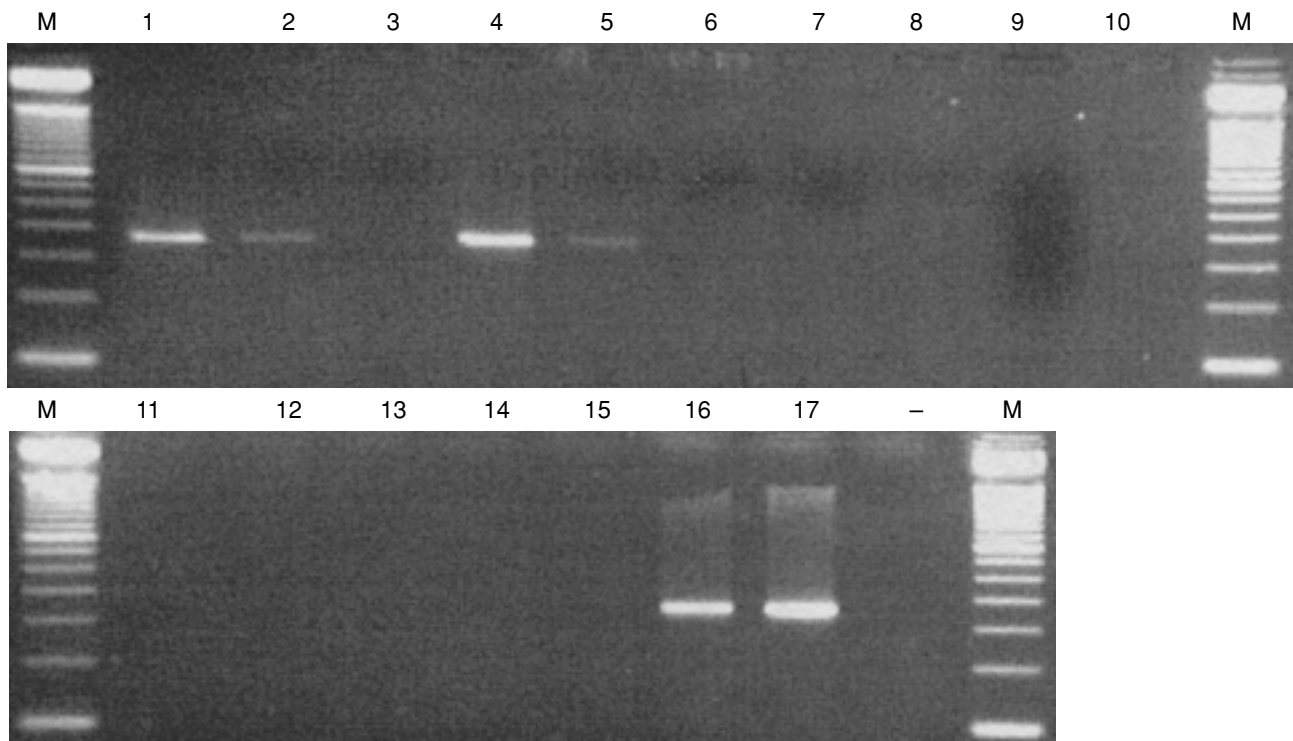
tant. De aanwezigheid van DNA werd bevestigd door amplificatie van totaal *K-ras* (wildtype en mutant) (figuur 2B, laan 1). Een *K-ras*-mutatie, GGT→TGT, algemeen voor het adenocarcinoom van de long (17), werd gevonden voor beide patiënten met MASA (figuur 2B, laan 3). Identieke mutaties werden ook in de primaire longtumor van beide patiënten gevonden



Figuur 2. Mutatie-analyse in adenocarcinoom van de long (A) en cytologisch negatieve liquor (B) van patiënt B.

(A): mutatie-analyse uitgevoerd op DNA geïsoleerd uit de tumor. Laan 1; amplificatie van totaal *K-ras*; lanen 2 en 3, initiële *K-ras*-mutatiescreening gebruik makend van twee MASA-primersets om alle codon 12 mutaties te kunnen detecteren op respectievelijk de nucleotide posities 2 en 1; lanen 4-6, uitsplitsing van de drie MASA-primers specifiek voor codon 12 nucleotide 1.

(B): mutatie-analyse uitgevoerd op DNA geïsoleerd uit de liquor (lanen 1-3). Drie verschillende PCR-forward primers werden gebruikt voor de specifieke amplificatie van totaal *K-ras* (GGT; laan 1), de Δ GT mutatie (MASA specificiteitscontrole; laan 2) en de TGT mutatie (laan 3) als gevonden in de tumor (figuur 2A, laan 6). De reverse primer was in alle gevallen 5'-ACTCATGAAAATGGTCAGAGAAACCTTTAT-3'. PCR-producten werden gescheiden op agarose (2%) en gekleurd met ethidium bromide. M, 50 bp DNA ladder.



Figuur 3. Detectie van totaal (wildtype en mutant) en mutant *K-ras* in de liquor van 5 controle-patiënten. Lanen 1-5, Amplificatie van totaal *K-ras* in de liquor van respectievelijk 2 patiënten met LMM (zonder gemuteerd *K-ras* in de tumor) en 3 patiënten met een niet oncologische ziekte (multipele sclerose, meningitis en de ziekte van Alzheimer). Lanen 6-10, MASA voor een *K-ras*-mutatie in het 1e nucleotide van codon 12 in de hierboven beschreven patiëntenvolgorde; lanen 11-15, MASA voor een *K-ras*-mutatie in het 2e nucleotide van codon 12; laan 16, positieve controle voor mutant codon 12, 1e nucleotide (SW1398-celijn); laan 17, positieve controle voor mutant codon 12, 2e nucleotide (SW480-celijn); laan -, PCR-blanco; lanen M, 50 bp DNA marker.

(figuur 2A) en in de cerebellaire metastase. Er waren geen andere codon 12 *K-ras*-mutaties (figuur 2A, lanen 2,4 en 5; figuur 2B, laan 2). Als controle voor de specificiteit van de assay werd het supernatant van de liquor bij 2 patiënten met LMM zonder een *K-ras*-mutatie in de primaire tumor en bij 3 patiënten met niet-oncologische neurologische aandoeningen (multiple sclerose, meningitis en de ziekte van Alzheimer) onderzocht op *K-ras*-mutaties. Ondanks het gegeven dat bij 4 van de 5 controle-patiënten totaal *K-ras* in het supernatant van de liquor aanwezig was, werd geen mutant *K-ras* gevonden (figuur 3).

Conclusie

Bij een adenocarcinoom van de long met een aangetoonde *K-ras*-mutatie, is detectie van deze mutatie in de liquor cerebrospinalis een veelbelovende test voor (vroeg)diagnostiek van LMM. Bovendien is het relatief eenvoudig om met sensitieve methoden als MASA te screenen voor *K-ras*-puntmutaties in het supernatant van de liquor, dat niet gebruikt wordt voor cytologie. Zelfs zonder voorkennis van de tumormutaties kan de aanwezigheid van een *K-ras*-puntmutatie in de liquor de diagnostiek van LMM ondersteunen. Aangezien *K-ras*-mutaties slechts in 30 % van de adenocarcinomen van de long worden gevonden (17) en zelden voorkomen bij overige, naar de leptomeningen metastaserende tumoren (18), zijn ook andere meer universele moleculaire tumormerkstoffen, zoals met telomerase geassocieerde merkstoffen, voor diagnostiek en follow-up van LMM interessant (19-22).

Dankwoord

Wij danken Herman de Reus (Laboratorium Kinderneurologie en Neurologie), Rian Roelofs en Erwin Wiegierink (beiden Centraal Klinisch Chemisch Laboratorium) voor uitstekende analytische ondersteuning.

Literatuur

1. Posner JB. Neurological complications of cancer. Philadelphia: FA Davis, 1995: 143-171.
2. DeAngelis LM. Current diagnosis and treatment of leptomeningeal metastasis. *J Neurooncol* 1998; 38: 245-252.
3. Wasserstrom WR, Glass JP, Posner JB. Diagnosis and treatment of leptomeningeal metastases from solid tumors. *Cancer* 1982; 49: 759-772.
4. Oostenbrugge RJ van, Twijnstra A. Presenting features and value of diagnostic procedures in leptomeningeal metastases. *Neurology* 1999; 53: 382-385.
5. van den Bent MJ, Vecht ChJ. De vele gedaanten van meningitis carcinomatosa. *Ned Tijdschr Geneesk* 1994; 45: 2225-2229.
6. Glass JP, Melamed M, Chernik NL, Posner JB. Malignant cells in cerebrospinal fluid (CSF): the meaning of a positive CSF cytology. *Neurology* 1979; 1369-1375.
7. Freilich RJ, Krol G, DeAngelis LM. Neuroimaging and cerebrospinal fluid cytology in the diagnosis of leptomeningeal metastasis. *Ann Neurol* 1995; 38: 51-57.
8. Chamberlain MC. Cytologically negative carcinomatous meningitis: usefulness of CSF biochemical markers. *Neurology* 1998; 50: 1173-1175.
9. Zanten AP van. Central nervous system metastases from extracranial malignancies. Diagnostic value of clinical chemical parameters. Proefschrift 1986. Maastricht.
10. Rhodes CH, Glantz MJ, Glantz L, Lekos A, Sorenson GD, Honsinger C, Levy NB. A comparison of polymerase

chain reaction examination of cerebrospinal fluid and conventional cytology in the diagnosis of lymphomatous meningitis. *Cancer* 1996; 77: 543-548.

11. Rhodes CH, Honsinger C, Sorenson GD. Detection of tumor-derived p53 DNA in cerebrospinal fluid. *Am J Clin Pathol* 1995; 103: 404-408.
12. Rhodes CH, Honsinger C, Sorenson G. Detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994; 53: 364-368.
13. Cibas ES, Malkin MG, Posner JB, Melamed MR. Detection of DNA abnormalities by flow cytometry in cells from cerebrospinal fluid. *Am J Clin Pathol* 1987; 88: 570-577.
14. Swinkels DW, de Kok JB, Hanselaar A, Lamers KJB, Boerman RH. Early detection of leptomeningeal metastasis by PCR examination of tumor-derived *K-ras* DNA in cerebrospinal fluid. *Clin Chem*, in press.
15. de Kok JB, van Solinge WW, Ruers TJM, Roelofs RWHM, van Muijen GNP, Willems JL, Swinkels DW. Detection of tumour DNA in serum of colorectal cancer patients. *Scand J Clin Lab Invest* 1997; 57: 601-604.
16. Hasegawa Y, Takeda S, Ichii S, Koizumi K, Maruyama M, Fujii A, Ohta H et al. Detection of *K-ras* mutations in DNA's isolated from feces of patients with colorectal tumors by mutant-allele-specific amplification (MASA). *Oncogene* 1995; 10: 1441-1445.
17. Rodenhuis S, Slebos RJC. Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 2665s-2669s.
18. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 4682-4689.
19. Fujita J, Ueda Y, Bandoh S, Namihira H, Ishii T, Takahara J. A case of leptomeningeal metastasis from lung adenocarcinoma diagnosed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen. *Lung Cancer* 1998; 22: 153-156.
20. Kleinschmidt-deMasters BK, Evans LC, Bitter MA, Shroyer AL, Shroyer KR. Telomerase expression in cerebrospinal fluid specimens as an adjunct to cytological diagnosis. Part II. *J Neurol Sci* 1998; 161: 123-134.
21. DeAngelis LM, Posner JB. Telomerase activity in brain and leptomeningeal metastases. *J Neurol Sci* 1998; 161: 114-115.
22. Kok JB de, Zendman AJ, van de Locht LT, Ruers TJM, van Muijen GNP, Mensink EJ, Swinkels DW. Real-time hTERT quantification: a promising telomerase-associated tumor marker. *Lab Invest* 1999; 79: 911-912.

Summary

Molecular diagnosis of leptomeningeal metastases in cerebrospinal fluid. Swinkels DW, Kok JB de, Vogels OJM, Hanselaar A, Lamers KJB, Gijtenbeek J and Boerman RH. Ned Tijdschr Klin Chem 2000; 25: 49-52.

Molecular detection of tumor-derived DNA in cerebrospinal fluid (CSF) can potentially improve early and sensitive detection of leptomeningeal metastases (LMM). We report the detection of tumor-derived *K-ras* DNA in the CSF of two patients with LMM. Both patients had an adenocarcinoma of the lung which contained a *K-ras* mutation (codon 12: GGT→TGT). Identical mutations were found in the CSF supernatant with mutant-allele-specific amplification (MASA) before cytological examination became diagnostic for LMM. Detection of *K-ras* mutations in the CSF of clinically suspected LMM patients is a promising tool for early diagnosis of LMM derived from primary adenocarcinoma of the lung. Because *K-ras* mutations occur in about 30% of the lung adenocarcinoma and are rare in other solid tumors that metastasize to the leptomeninges, additional molecular markers are needed to increase the clinical usefulness of PCR-based methods for the (early) diagnosis and monitoring of LMM.

Keywords: leptomeningeal metastases; cerebrospinal fluid; mutant-allele-specific amplification.