



Früherkennung asbestbedingter Krebserkrankungen

Calretinin – ein vielversprechender Biomarker für die Bestimmung von Mesotheliomen in Blutproben von Asbest-Exponierten

Georg Johnen, Irina Raiko, Ingrid Sander, Daniel G. Weber, Monika Raulf-Heimsoth, Jens Kollmeier, Adrian Gillissen, Arnaud Scherpereel, Klaus-Michael Müller, Thomas Brüning

Die Produktion und Verwendung von Asbest ist seit langem verboten. Trotzdem ist die Zahl der asbestbedingten Krebserkrankungen – in erster Linie bösartiger Lungentumoren und Mesotheliome – weiterhin sehr hoch. Aufgrund der langen Latenzzeit wird hier in den nächsten Jahren noch keine wesentliche Änderung erwartet. Durch eine verbesserte Früherkennung der Tumoren – möglichst noch in klinisch symptomfreien Entwicklungsstadien – können die Chancen für eine kurative Therapie wesentlich gesteigert werden. In Zusammenarbeit mit verschiedenen Instituten und Forschergruppen haben Wissenschaftler des IPA jetzt eine vielversprechende Methode für den Einsatz des Biomarkers Calretinin für die Früherkennung speziell von Mesotheliomen entwickelt.

Infolge der langen Latenzzeit sind die Zahlen asbestbedingter Krebserkrankungen weiterhin sehr hoch, obwohl die Produktion und Verwendung von asbesthaltigen Produkten in Deutschland schon vor Jahrzehnten eingeschränkt beziehungsweise in 1993 schließlich vollständig verboten wurde. Die Latenzzeit für Mesotheliome beträgt im Mittel 36 Jahre mit einer Standardabweichung von 25 Jahren. Daher wird erwartet, dass die Zahl der jährlich neu auftretenden Mesotheliome auch in den kommenden Jahren auf einem hohen Niveau verbleibt. Derzeit sind es jährlich knapp 1000 Fälle mit einer anerkannten BK 4105. Obwohl beispielsweise der Asbestverbrauch in England eher als in Deutschland zurück ging, wird hier aktuell für Mesotheliome eine „Gaußsche Kurve“ mit Höhepunkt der Fallzahlen in 2016/17 erwartet (Abb. 1). Vor dem Hintergrund der langen Latenzzeit in Kombination mit der hohen Standardabweichung, die sich durch die Gaußsche Kurve widerspiegelt, wird das Thema der beruflich bedingten Lungen- und Pleuratumoren

noch weit bis in die 20er Jahre des 21. Jahrhunderts eine große Herausforderung für die entsprechende Sekundärprävention der gesetzlichen Unfallversicherung darstellen.

Hinzu kommt das Problem „Krebs als Alterskrankheit“: Mit steigendem Alter steigt die Krebsinzidenz, unter anderem auf Grund verminderter DNA-Reparaturmechanismen. Dies gilt in der Konsequenz natürlich auch für beruflich bedingte Tumoren. So ist beispielsweise aus den diesbezüglichen Daten des Statistischen Bundesamtes erkennbar, dass das mittlere Sterbealter Mesotheliomerkrankter von 66,9 Jahre im Jahr 1980 auf 72,9 Jahre im Jahr 2009, also um sechs Jahre angestiegen ist.

Asbestexponierten Arbeitnehmern werden in Deutschland von den Trägern der gesetzlichen Unfallversicherung regelmäßige nachgehende Untersuchungen angeboten. Trotzdem ist das frühzeitige

Erkennen von Lungentumoren und Pleura-Mesotheliomen weiterhin sehr schwierig. Vielfach werden die Tumoren erst in weit fortgeschrittenen Entwicklungsstadien diagnostiziert, wenn bereits klinisch manifeste Beschwerden vorliegen, die Gesamtkonstitution der Patienten verschlechtert ist und somit die Therapieoptionen eingeschränkter sind. Trotz großer Fortschritte bei den bildgebenden Verfahren hat auch die hochauflösende Computertomographie bisher nicht zu einem Durchbruch geführt. Zudem wäre hier bei regelmäßigen Untersuchungen mit einer nicht unerheblichen Strahlenbelastung zu rechnen. Daher besteht weiterhin ein großer Bedarf an einfach anzuwendenden minimal-invasiven Verfahren, die ohne Belastung für den Patienten eingesetzt werden können. Hier bieten die im Blut bestimmbaren Biomarker eine große Chance, die bestehenden Verfahren zu ergänzen und die Früherkennung zu verbessern.

Der immunhistochemische Marker Calretinin

In der internationalen Fachliteratur wurden bisher nur wenige blutbasierte Mesotheliom-Marker beschrieben. Zahlreiche Publikationen beschreiben hingegen immunhistochemische Marker zur Diagnose von Mesotheliomen in Gewebeschnitten. Einer der erfolgreichsten immunhistochemischen Marker ist das Calretinin. Dabei handelt es sich um ein Protein, das vermehrt in den Tumorzellen eines Mesothelioms produziert wird, während es hingegen in anderen Tumoren, wie auch Pleura- Metastasen primär anderenorts lokalisierter Tumoren, nicht oder kaum nachweisbar ist.

Basierend auf diesen Erfahrungen wurde ein neuer Assay entwickelt, mit dem das Calretinin-Protein auch im Blut, das heißt im Plasma oder Serum, nachweisbar ist. Die Idee hinter dem blutbasierten Nachweis ist, dass ständig einige der Zellen eines Mesothelioms

entweder ins Blut gelangen oder die Inhalte abgestorbener Mesotheliom-Zellen direkt ins Blut abgegeben werden und somit detektierbar sind. Ziel ist letztendlich, mit einem empfindlichen Nachweisverfahren auch die geringen Mengen an Calretinin im Blut nachzuweisen, die bei früheren Stufen der Mesotheliom-Entwicklung zu erwarten sind.

Neuer Assay zum Calretinin-Nachweis am IPA entwickelt

Im Rahmen der Entwicklung des Testverfahrens wurden am IPA zunächst eigene, neuartige Antikörper generiert und aus Kaninchenserum gewonnen, da mit kommerziell erhältlichen Antikörpern (Schierle et al. 1997) nicht die notwendige Nachweisempfindlichkeit erreicht werden konnte. Im Folgenden wurde damit ein sogenannter Sandwich-ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) aufgebaut (Raiko et al. 2010). Das Schema des ELISA ist in Abb. 2a dargestellt. Der Nachweis beruht darauf, dass das Calretinin in einer zugegebenen Plasma-Probe durch den ersten Antikörper zunächst „eingefangen“ wird und dann ein zweiter Antikörper bindet, an dem sich ein Adapter befindet. Über diesen Adapter des zweiten Antikörpers kann schließlich ein Enzym angekoppelt werden, welches eine Farbreaktion katalysiert, die den eigentlichen Nachweis sichtbar macht. Der Assay hat einen Detektionsbereich von 0,1 bis 9,0 ng/ml Calretinin und ist den Varianten mit kommerziellen Antikörpern überlegen (Abb. 2b).

Da Plasma- oder Serumproben in der Praxis nicht immer unter idealen Bedingungen gehandhabt und gelagert werden können, muss das Calretinin-Antigen für den Einsatz als Biomarker eine hinreichende Stabilität aufweisen. Im Rahmen der Entwicklung des Testsystems wurden daher Plasmaproben mit definierten Mengen an Calretinin verschiedenen widrigen Bedingungen ausgesetzt. Weder

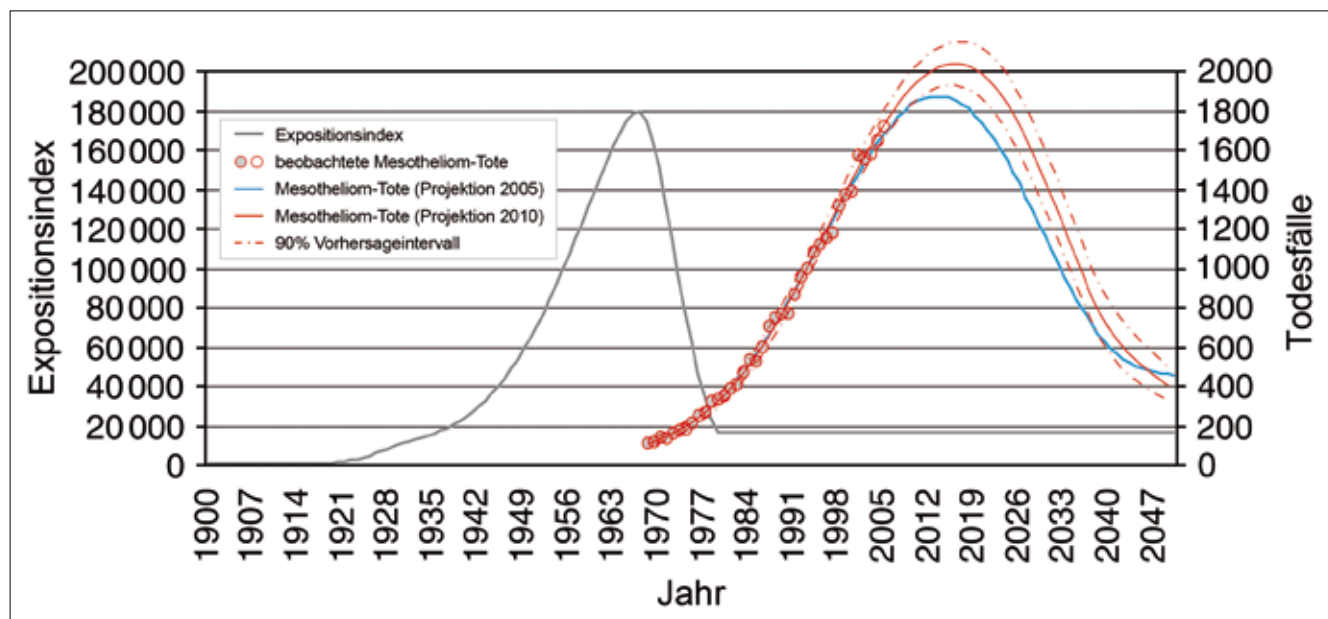


Abb. 1: Historischer Asbestverbrauch sowie zeitlicher Verlauf und Projektion der jährlichen Mesotheliom-Neuerkrankungen in Großbritannien. Abbildung modifiziert nach Hodgson et al. 2005 mit eingefügter, aktueller Neuberechnung der Projektion nach Tan et al. 2010 (einschließlich 90% Vorhersageintervall). Der neue Höhepunkt der Fallzahlen wird für 2016/17 erwartet.



mehrfaches Einfrieren und Auftauen, noch fünf Tage bei Raumtemperatur, 4°C oder -80°C zeigten einen signifikanten Einfluss auf die Nachweisbarkeit des Biomarkers Calretinin. Zudem kann der Marker in verschiedenen Medien, wie Serum, EDTA-Plasma oder Heparin-Plasma, bestimmt werden.

Mesotheliome im Blut nachweisen

Die entscheidende Frage für einen neuen Biomarker ist jedoch, ob dieser in Proben von Tumorpatienten auch erhöht nachweisbar ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Plasma- beziehungsweise

Serumproben von 97 Gesunden, 35 ehemals asbestexponierten Arbeitern (u.a. mit Asbestose oder Pleuraplaques) sowie 49 Mesotheliompatienten verglichen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3 dargestellt. Die Werte aller drei Gruppen zeigten jeweils signifikante Unterschiede zueinander. Die Mesotheliom-Patienten unterscheiden sich deutlich von den beiden tumorfreien Gruppen.

Eine weitere kritische Frage betrifft die Histologie der Mesotheliome. Man unterscheidet hier epitheloide, sarkomatoide und biphasische Tumoren. Letztere weisen sowohl epitheloide als auch

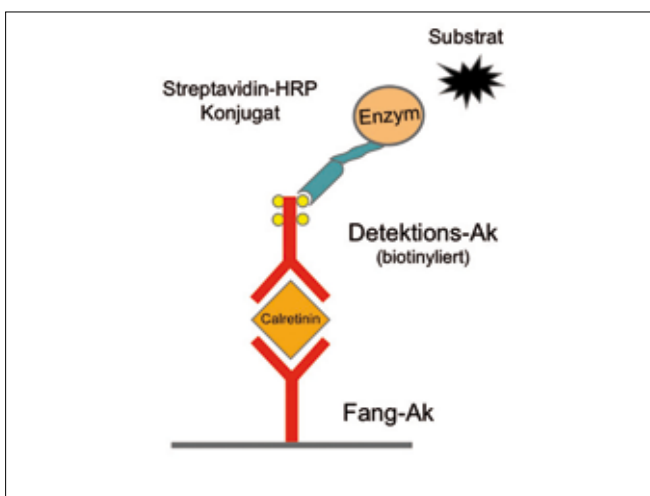


Abb. 2: (a) Design des Calretinin-ELISA. Ein selbstentwickelter Antikörper (polyklonal, Kaninchen) gegen Calretinin dient als sogenannter Fang-Antikörper. Derselbe Antikörper, mit Biotin als Adapter, fungiert als Detektions-Antikörper. An diesen bindet ein Streptavidin-Enzym-Konjugat (HRP = horseradish peroxidase), das eine Farbreaktion ermöglicht.

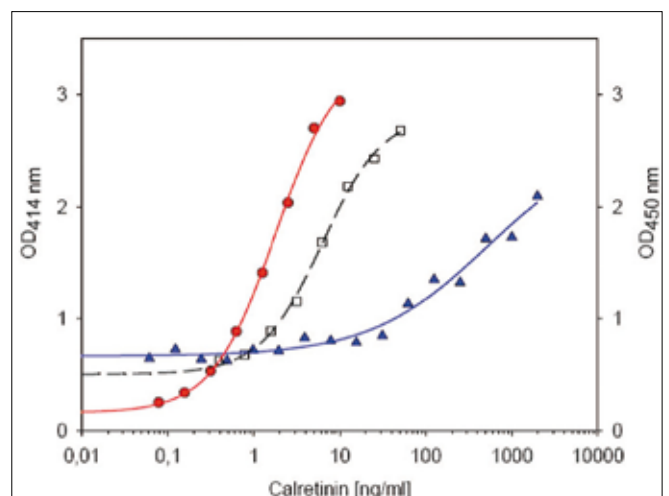


Abb. 2: (b) Standardkurve des Calretinin-ELISA. Der neue Assay (rot) ist empfindlicher als die kommerziellen Varianten (schwarz, blau) und zeigt weniger Hintergrundsignal. Der Detektionsbereich des IPA-Calretinin-ELISA liegt zwischen 0,1 und 9,0 ng/ml Calretinin. < 0,0001).

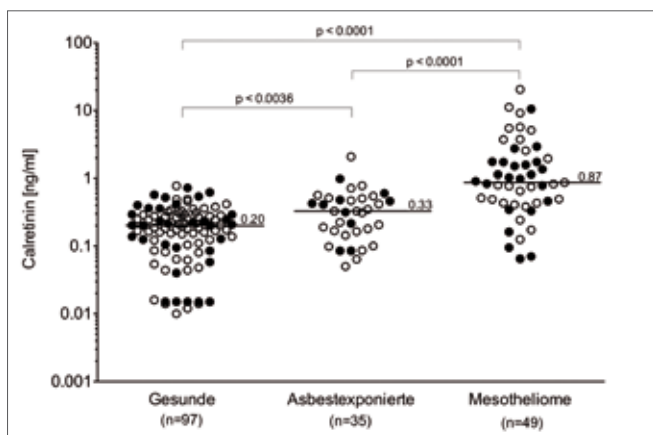


Abb. 3: Nachweis von Calretinin in Plasma (●) und Serum (○)-Proben von 97 Gesunden, 35 Asbestexponierten (mit z.T. benignen Asbest-assoziierten Erkrankungen wie Pleuraplaques und Asbestose) und 49 Mesotheliompatienten. Die entsprechenden Medianwerte betragen 0,20, 0,33 bzw. 0,87 ng/ml. Die Mesotheliompatienten unterscheiden sich signifikant von den Gesunden und Exponierten (jeweils $p < 0,0001$).

sarkomatoide Tumoranteile auf. Bisherige Marker detektieren vornehmlich epitheloide Mesotheliome oder epitheloide Anteile in biphasischen Mesotheliomen. Die seltenere sarkomatoide Form wird häufig weniger gut detektiert. Da die zur Verfügung stehende Probensammlung kein Material eines Patienten mit einem reinen sarkomatoiden Mesotheliom enthielt, konnten nur Proben von epitheloiden und biphasischen Mesotheliompatienten verglichen werden. Diese zeigten nahezu identische Medianwerte, was vermuten lässt, dass auch die sarkomatoiden Anteile in den biphasischen Tumoren zum erhöhten Calretininwert in den Proben beigetragen haben könnten. Dies wurde durch immunhistochemische Unter-

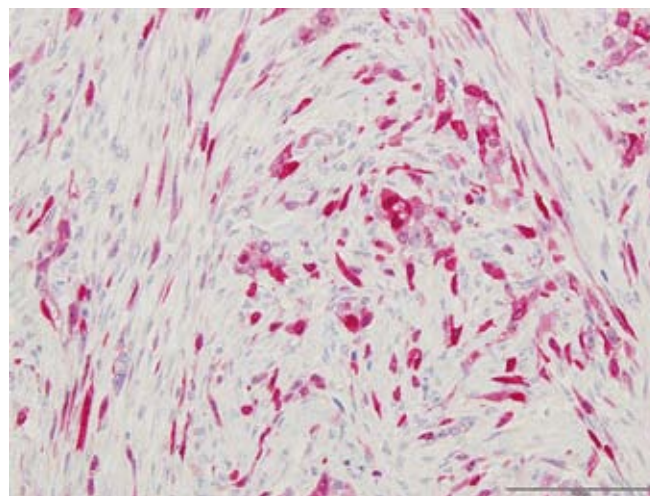


Abb. 4: Repräsentative immunhistochemische Färbung des histologischen Schnittes eines Mesothelioms. Der neu entwickelte Antikörper färbt gleichermaßen epitheloide und sarkomatoide Tumorzellen.

suchungen bestätigt, bei denen der im neuen ELISA verwendete Antikörper eingesetzt wurde. Sarkomatoide Mesotheliome sowie sarkomatoide Anteile in biphasischen Mesotheliomen zeigten eine starke Färbung mit dem neuen Antikörper (Abb. 4).

Calretinin-Nachweis vielversprechende Ergänzung für Marker-Panel

Der neu entwickelte Calretinin-ELISA zeigt eine gute Empfindlichkeit und erscheint hinreichend robust für den Feldeinsatz. Es können sowohl Serum- als auch Plasmaproben zur Bestimmung verwendet werden. Calretinin ist ein vielversprechender Biomarker, der im Gegensatz zu den bisher verfügbaren Biomarkern auch in Gewebeschritten von sarkomatoiden Mesotheliomen gut nachgewiesen werden kann. Calretinin hat daher das Potenzial, andere blutbasierte Marker als Teil eines Marker-Panels zu komplementieren. Für eine mögliche Anwendung in der Mesotheliom-Früherkennung wird der neue Calretinin-ELISA derzeit mit mehr Fällen und verschiedenen Kontrollen weiter evaluiert sowie im Rahmen der MoMar-Studie, einer prospektiven Kohortenstudie mit geplanten 2 000 ehemals asbestexponierten Versicherten, validiert.

Die Autoren:

Prof. Dr. Thomas Brüning, Dr. Georg Johnen,
Dr. (UA) Irina Raiko, Prof. Dr. Monika Raulf-Heimsoth,
Dr. Ingrid Sander, Dr. Daniel G. Weber,
IPA

Dr. Jens Kollmeier,
HELIOS Klinik Emil von Behring, Berlin
Prof. Dr. Adrian Gillissen,
Klinik für Lungen- und Bronchialmedizin des Klinikums Kassel,
Prof. Dr. Arnaud Scherpereel,
Hôpital Calmette, Lille
Prof. Dr. Klaus-Michael Müller
Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie am Universitätsklinikum
Münster

Literatur

1. Tan E, Warren N, Darnton AJ, Hodgson JT. Projection of mesothelioma mortality in Britain using Bayesian methods. *Br J Cancer* 2010; 103: 430-436
2. Hodgson JT, McElvenny DM, Darnton AJ, Price MJ, Peto J. The expected burden of mesothelioma mortality in Great Britain from 2002 to 2050. *Br J Cancer* 2005; 92: 587-593
3. Schierle GS, Gander JC, D'Orlando C, Ceilo MR, Vogt Weisenhorn DM. Calretinin-immunoreactivity during postnatal development of the rat isocortex: a qualitative and quantitative study. *Cereb Cortex* 1997; 7: 130-142
4. Raiko I, Sander I, Weber DG, Raulf-Heimsoth M, Gillissen A, Kollmeier J, Scherpereel A, Brüning T, Johnen G. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of human calretinin in plasma and serum of mesothelioma patients. *BMC Cancer* 2010; 10: 242