

Krebsdiagnostik durch funktionelle Analyse von Serumalbumin

Dr. Kerstin Schnurr, Katja Waterstradt, MedInnovation GmbH, Berlin

Die Diagnose des aktiven Wachstums von Tumoren im Körper ist schon in sehr frühen Stadien der Krebserkrankung möglich: Mit einer speziell entwickelten Technologie, die auf der Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) basiert, lassen sich die Transporteigenschaften des Proteins Serumalbumin in einer Blutprobe charakterisieren. Die funktionelle Albuminanalyse mit Hilfe des MMS(Mobilität der molekularen Struktur)-Tests ermöglicht die Messung spezifischer Veränderungen der Transport- und Detoxifikationseigenschaften des Proteins in frühen Krankheitsstadien, denn die Transporteigenschaften des Albumins werden durch niedermolekulare, von Tumorzellen sezernierte Substanzen spezifisch beeinflusst. Mit der ESR-Albuminanalyse ist es uns gelungen, diese Veränderungen mit hoher Sensitivität und Spezifität nachzuweisen und daraus diesen einfachen und schnellen *in-vitro*-Test abzuleiten. Studien zum Proof-of-Principle haben wir erfolgreich abgeschlossen, und erste Validierungsstudien wurden durchgeführt. Das Verfahren eröffnet neben der Krebs-Diagnose auch eine frühzeitige Beurteilung des Erfolges der Tumorthherapie (z.B. Operation, Chemotherapie, Strahlentherapie) sowie die Früherkennung eines Rezidivs.

Das Krankheitsstadium in dem Tumorerkrankungen erkannt werden, spielt eine entscheidende Rolle für den Erfolg ihrer Therapie. Für die meisten Tumorarten gilt: je früher ein Tumor diagnostiziert werden kann, desto größer die Heilungschancen. Eine Möglichkeit zur Erkennung sehr frühen malignen Geschehens im Organismus bietet die Analyse der Transport- und Detoxifizierungseigenschaften von Serumalbumin. Das Serumalbumin ist eines der wichtigsten Transportproteine im Blutplasma. Es transportiert wasserlösliche Stoffe wie Fettsäuren, Bilirubin, Spurenelemente oder Arzneimittel, wobei es durch die Bindung dieser Substanzen

zu Veränderungen in der Konformationsmobilität des Albuminmoleküls kommt. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass niedermolekulare Substanzen im Blut (als Surrogatmarker) den Status von Zellen und Geweben hinsichtlich pathologischer Veränderungen anzeigen können und dass diese durch das Albumin gebunden werden^{2,3}. Die daraus resultierende Anreicherung am Albumin kann die freie Konzentration dieser niedermolekularen Substanzen im Blut um das bis zu 500-fache übersteigen^{4,5}. Die Analyse solcher Biomarker findet zunehmend Anwendung bei der Diagnostik verschiedener Krebserkrankungen.

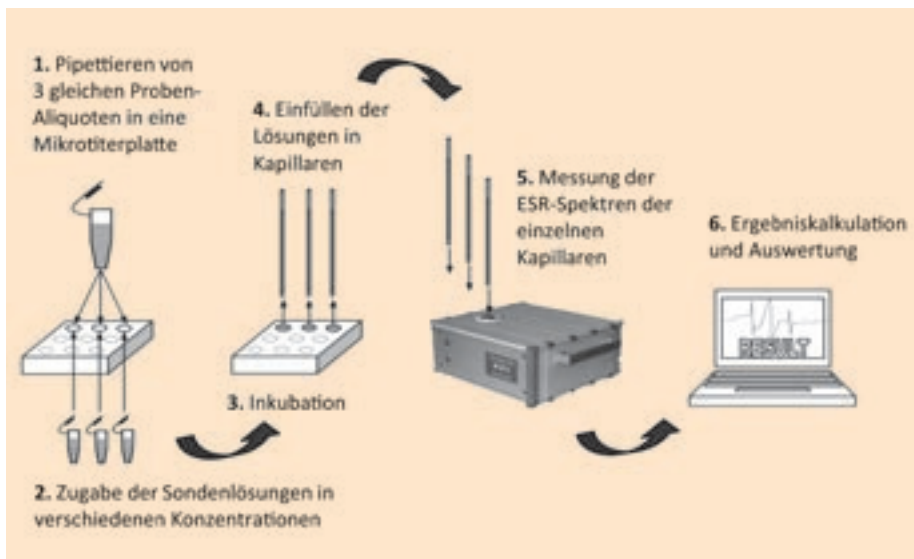


Abb. 1: Arbeitsschritte von der Probe zum Ergebnis

Seit dem Jahr 2005 steht mit dem MMS-Test steht ein neues CE-zertifiziertes Verfahren zur Verfügung, das zur Diagnose und/oder Überwachung von Krebserkrankungen eingesetzt werden kann – ganz unabhängig von der Krebsart. Der MMS-Test auf Basis der Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR) misst anhand der Beladungskapazität von Serumalbumin mit Fettsäuren, in welcher Konformation das Transportprotein vorliegt und ob krebspezifische Liganden daran gebunden wurden.

Der MMS-Test

Für den Test wird einer albuminhaltigen Probe (Serum bzw. EDTA-Plasma) zunächst eine spezifische, mit einem stabilen Radikal gekoppelte, langkettige Fettsäure als „Reportermolekül“ zugesetzt. Durch Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen eines polaren Agens werden *in vitro* Konformationsänderungen im Serumalbumin induziert und damit die verschiedenen *in vivo*-Zustände der Albuminkonformation (Beladung, Transport und Entladung) simuliert. Die gemessenen Parameter reflektieren dabei die Konformationsänderungen des Serumalbumins.

Zum Vergleich werden drei Aliquots des Patientenserums oder -plasmas mit drei verschiedenen Sondenlösungen inkubiert (Abb. 1). Diese Sondenlösungen enthalten unterschiedliche Konzentrationen der spinmarkierten Fettsäure und des polaren Agens. Die in Kapillaren gefüllten Lösungen werden anschließend in dem eigens dafür entwickelten MMS-(ESR) Analysator vermessen und die ESR-Spektren mit einer speziellen Software analysiert. Die Auswertung der Spektren gestattet eine Interpretation der Konformationsmobilität sowie Transport- und Detoxifikationseigenschaften des Serumalbumins.

Um die Konformationsmobilität des Albumins zu charakterisieren, werden die ESR-Spektren der am Serumalbumin gebundenen spinmarkierten Fettsäure mithilfe einer quantenmechanischen Funktion analysiert. Diese, auf dem Hamiltonoperator basierende Simulation, ermöglicht eine detaillierte Beschreibung des Bindungsverhaltens der Fettsäure. Die so gewonnenen Informationen werden mit mathematischen Modellen in einen Entscheidungsparameter (DR – Diagnostisches Resultat) umgewandelt⁶.

Es zeigen sich signifikante Unterschiede in der Konformationsmobilität des Serumalbumins zwischen gesunden Probanden und Tumorpatienten (Abb. 2a). Die tumorspezifische Veränderung der Zusammensetzung niedermolekularer Substanzen im Blut ist die wahrscheinlichste Ursache für diesen Befund. Mit dem MMS-Test können nach bisherigem Erkenntnisstand alle Arten von Krebserkrankungen im Organismus schnell und zuverlässig, mit einer hohen diagnos-

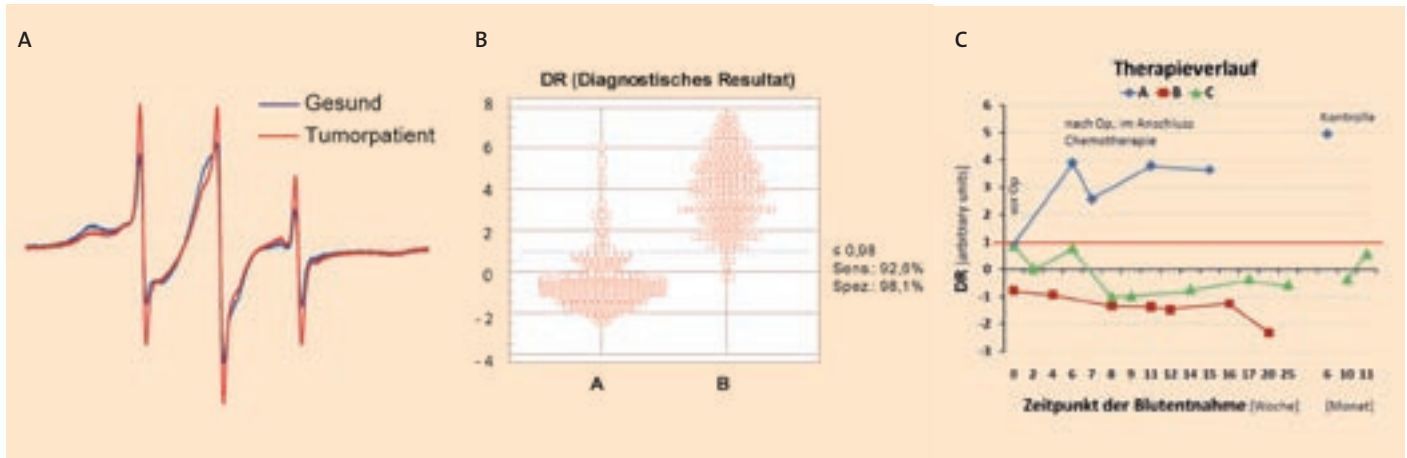


Abb.2: A: Vergleich der ESR-Spektren von einer gesunden Person (blau) und einem Tumorpatienten (rot); B: Punktdiagramm der ROC-Analyse zur Differenzierung von gesunden Personen (Gruppe B, N=311) und Tumorpatienten (Gruppe A, N=367) mit Sensitivität und Spezifität des angegebenen cut-off-Wertes; C: Verlauf des DR-Wertes während der Tumorthherapie: (A) kurativer Verlauf, (B) Tumorwachstum mit starker Progression (Patient verstorben), (C) Tumorwachstum mit geringer Progression

tischen Sensitivität (92,6%) und Spezifität (98,1%) im Sinne einer Ja-Nein-Entscheidung mit einer Interlaborreproduzierbarkeit von 98,3% aufgedeckt werden. Ein positiver MMS-Test zeigt ein aktives malignes Geschehen an. Aussagen zur Lokalisation des Tumors sind derzeit allerdings erst ansatzweise möglich.

In Abbildung 2b sind 367 Tumorpatienten mit verschiedenen Krebsarten (A-Gruppe) 311 gesunden Personen (B-Gruppe) gegenübergestellt. Die beiden Gruppen sind sowohl in ihrer Geschlechts- als auch in der Altersstruktur analog. Mit Hilfe des DR-Wertes ist eine Differenzierung von gesunden Personen und Tumorpatienten mit hoher diagnostischer Sicherheit möglich. Im Falle von aktivem Tumorwachstum ist der DR-Wert kleiner als 1. Der MMS-Test ist ein geeigneter Kandidat für einen allgemeinen Krebstest zur Krebsfrühdagnostik: Bei mehr als 75 Blutspendern (30-65 Jahre), die nach ihrer letzten Spende über eine gesicherte Krebserkrankung berichteten, waren retrospektiv krebsbedingte Albuminveränderungen in deren Plasmarückstellproben durchschnittlich bis zu 12 Monaten vor der Krebsdiagnose zu diagnostizieren³.

Kontrolle des Therapieverlaufes

Die Eignung des MMS-Tests zum Therapie-Monitoring bei Krebserkrankungen resultiert aus der relativ kurzen Halbwertszeit des Serumalbumins von 19 Tagen. Untersuchungen bei Patienten während und nach der Therapie zeigten eine sehr gute Korrelation mit dem Therapieergebnis (Abb. 2c). Ist der aktive maligne Herd beseitigt, kommt es nach zwei bis drei Wochen zu einer Normalisierung der Transport- und Detoxifikationsfunktionen des Serumalbumins. Der DR-Wert eignet sich damit zur Kontrolle des Therapieverlaufes, da der DR-Verlauf den Erfolg der Therapie widerspiegelt.

In Abbildung 2c sind drei exemplarische Therapieverläufe dargestellt. Im Falle einer 64-jährigen Frau mit einem Sigma-Karzinom (Patient A) zeigt der ansteigende DR-Wert, dass der Tumor durch die Operation und anschließende Chemotherapie erfolgreich behandelt werden konnte. Eine deutliche Progression des Tumors zeigt dagegen der Verlauf des DR-Wertes eines 84-jährigen Mannes mit einem Magen-Karzinom (Patient B), der an der Krebserkrankung verstarb. Bei einem 70-jährigen Mann mit einem Rektum-Karzinom (Patient C) konnte der Tumor durch die Operation und anschließende Chemotherapie nicht geheilt werden, es folgte eine palliative Therapie. Der Verlauf des DR-Wertes spiegelt bei allen drei Patienten die klinischen Befunde wider und ist somit sowohl für die Kontrolle des Therapieerfolges als auch das Erkennen des Auftretens eines Rezidivs geeignet.

Weiterentwicklung der Diagnostik

Da mit dem MMS-Test zurzeit nur eine allgemeine Aussage zum Tumorwachstum im Körper erfolgen kann, ist es ein dringliches Ziel der aktuellen Forschung der MedInnovation GmbH, zusätzlich die Information zur Tumorklassifikation in den Test zu integrieren. Erste Untersuchungen haben gezeigt, dass sich signifikante Unterschiede in den ESR-Spektren verschiedener Tumorarten zeigen. Die aus der ESR-Spektrenanalyse gewonnenen biophysikalischen Parameter des Bindungsverhaltens der spinmarkierten Fettsäure werden zukünftig mit Hilfe mathematischer Methoden zur Bestimmung der Tumorklassifikation beitragen. Eine prospektive Studie zur Validierung der bisherigen Ergebnisse wird baldmöglichst angestrebt.

Desweiteren zeigten Untersuchungen an Patienten mit sowohl benignen als

auch malignen Darmerkrankungen, dass mit der dem MMS-Test zugrundeliegenden Technologie Vorstufen des kolorektalen Karzinoms, die Adenome, in Abhängigkeit von ihrem Entartungsrisiko unterschieden werden können. So wurden 32 von 41 villösen Adenomen (hohes Entartungsrisiko) als tumor-positiv und 14 von 17 tubulären Adenomen bzw. Polypknospen (geringes Entartungsrisiko) als tumor-negativ eingestuft. Dies ermöglicht die Neuentwicklung einer auf dieser Technologie basierenden Analyse hinsichtlich einer Darmkrebs-Früherkennung im Rahmen eines einfachen Bluttests.

Zur Weiterentwicklung der MMS-Technologie ist eine enge Zusammenarbeit mit anderen Firmen oder Instituten unerlässlich. Deshalb haben wir großes Interesse an Kooperationen sowohl mit industriellen als auch mit klinischen Partnern, zum Beispiel auf dem Gebiet der Identifizierung der am Albumin gebundenen Substanzen.

Literatur

- [1] Gelos M, et al. submitted
- [2] Lowenthal M.S., et al., Clin. Chem. 51 (2005), 1933-1945
- [3] Lopez M.F., et al., Clin. Chem. 51 (2005), 1946-1954
- [4] Mehta A, et al., Dis. Markers 19 (2004), 1-10
- [5] Belluco C, et al., Annals of Surgical Oncology 14(9) (2007), 2470-2476
- [6] Seidel P, et al., Z. Med. Phys. 15 (2005), 265-272

Korrespondenzadresse

Dr. Kerstin Schnurr
 MedInnovation GmbH
 Freiheitstraße 124/126
 15745 Wildau
 Tel.: + 49-(0)3375-213000
 Fax: + 49-(0)33 75-213033
 info@medinnovation.de
 www.medinnovation.de