

Neuer Test zum Nachweis von Darmkrebs

Von der Grundlagenforschung zur klinischen Anwendung: Krebszellennachweis anhand von „Tumor M2-PK“

Philip D. Hardt, Sybille Mazurek, Hans-Ulrich Klör und Erich Eigenbrodt †

Wissenschaftler der Universität Gießen haben im renommierten Fachmagazin „British Journal of Cancer“ einen zukunftsweisenden neuen Test vorgestellt, der in Stuhlproben Krebszellen anhand des Enzyms Tumor M2-PK (Tumor M2-Pyruvatkinase) aufspürt. Das „British Journal of Cancer“ gehört zu der berühmten „Nature Publishing Group“ und gilt auf dem Gebiet der Onkologie als eine der weltweit führenden Fachzeitschriften für die Krebsdiagnostik und -therapie. Der neue Test zum Nachweis von Darmkrebs ist das Ergebnis einer äußerst erfolgreichen Kooperation zwischen dem Institut für Biochemie am Fachbereich Veterinärmedizin der Universität Gießen, der Gastroenterologischen Arbeitsgruppe der Medizinischen Klinik und Poliklinik III des Universitätsklinikums Gießen und der Firma ScheBo Biotech AG aus Gießen.

Darmkrebs zählt heute zu den häufigsten Krebserkrankungen in den westlichen Industrienationen. Allein in Deutschland erkranken jährlich etwa 57.000 Menschen, von denen mehr als die Hälfte sterben. Dabei liegen die Heilungschancen bei frühzeitiger Diagnose nahezu bei 100 %, und die rechtzeitige Entdeckung der Erkrankung kann das Sterberisiko deutlich reduzieren. Zur Diagnose von Darmkrebs stehen derzeit verschiedene Methoden bereit. Diese sind jedoch entweder unangenehm für den Patienten, wie die Dickdarmspiegelung, oder nicht genau bzw. nicht empfindlich genug, wie die Untersuchung auf okultes Blut im Stuhl. Deshalb besteht ein Bedarf an verbesserten Möglichkeiten zur Früherkennung.

Die Arbeitsgruppe um den kürzlich verstorbenen Prof. Dr. Erich Eigenbrodt aus dem Institut für Biochemie am Fachbereich Veterinärmedizin hatte zuvor bereits in grundlegenden Arbeiten gezeigt, dass Tumorzellen im Rahmen der Entwicklung von Darmkrebs die

normale Regulation der Zellteilung verlieren. Charakteristisch für die Tumorzellen ist ein extrem ausgeprägtes Bestreben, sich schnell und unkontrolliert zu vermehren. Eine Voraussetzung für die hohe Teilungsrate ist, dass der Stoffwechsel der Zellen – vergleichbar mit einem Dimm-Lichtschalter – in Richtung „Schalterstellung Tumor/vermehrte Zellteilung“ reguliert wird. Diese „Schalterstellung Tumor“ bzw. die geänderte Energieversorgung der Zellen lässt sich anhand des Enzyms Tumor M2-PK nachweisen und in Stuhlproben quantifizieren. So ergab sich die Frage, ob möglicherweise auch im Stuhl Tumor-M2-PK-Konzentrationen nachweisbar sind und ob sich damit Darmkrebs erkennen lassen würde.

Der Hintergrund: Besonderheiten des Tumorstoffwechsels

Die Umwandlung von normalen Zellen in Tumorzellen ist mit einschneidenden Veränderungen im Stoffwechsel der Zellen verbunden.

Intensive Stoffwechsel-Charakterisierungen und -Vergleiche zeigten, dass bei der Tumorentstehung unabhängig von der Stoffwechsellage des Ursprungsgewebes, aus dem sich die Tumorzellen entwickelt haben, bei bestimmten Parametern immer die gleichen Stoffwechselveränderungen auftreten. Diesen Tumor-spezifischen Stoffwechsel-Phänotyp bezeichnete die biochemische Arbeitsgruppe um Prof. Eigenbrodt und Priv.-Doz. Sybille Mazurek als Tumor-Metabolom (www.metabolic-database.com). Der Begriff Metabolom wurde in Analogie zu den Begriffen Genom und Proteom geprägt und leitet sich von Metabolismus (= Stoffwechsel) ab.

Die hohe Proliferationsrate (= Teilungsrate) der Tumorzellen setzt voraus, dass genügend Ausgangsstoffe für die Synthese von Zellbausteinen zur Verfügung gestellt werden. Außerdem ist ein hohes Anpassungsvermögen der Tumorzellen an wechselnde Sauerstoff- und Nährstoffversorgungen gefordert.

Die Umstellung auf die neuen Stoffwechsel-Anforderungen werden in den Tumorzellen unter anderem durch einen Wechsel im Isoenzymmuster der Zellen bewerkstelligt (Isoenzyme sind Enzyme, die die gleiche Stoffwechselreaktion katalysieren, sich aber in ihrer Proteinstruktur sowie in ihren physikalischen und kinetischen Eigenschaften unterscheiden und die unterschiedlich reguliert werden).

Ein Enzym, bei dem es während der Tumorentstehung generell zu einem Wechsel im Isoenzymmuster kommt, ist die Pyruvatkinase, ein Schlüsselenzym der Glycolyse. Dies ist der Stoffwechselweg, der Glucose unter ATP-Gewinnung (= Energiegewinnung) zu Pyruvat (Brenztraubensäure) und Lactat (Milchsäure) abbaut. Die Pyruvatkinase katalysiert dabei den letzten Ener-

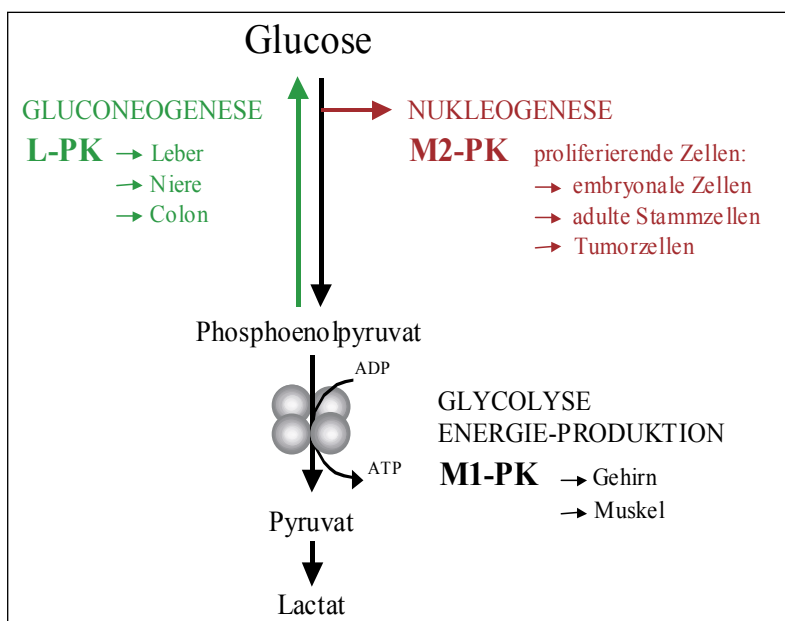


Abb. 1: Isoenzymmuster und Funktion der Pyruvatkinase in verschiedenen Geweben.



Philip D. Hardt, Jahrgang 1967, Studium der Humanmedizin 1988 bis 1994 an der Universität Gießen und der Université Paris VI (Pitié-Salpêtrière). Promotion 1996 in Gießen. Klinische Ausbildung zum Arzt für Innere Medizin am Zentrum für Innere Medizin des Universitätsklinikums Gießen. Schwerpunkte der wissenschaftlichen Arbeit sind Untersuchungen zur ERCP-induzierten Pankreasschädigung, klinische Arbeiten zur chronischen Pankreatitis und zum Diabetes mellitus Typ III, Untersuchungen zur Kultur humaner exokriner Pankreaszini sowie Arbeiten zur Entwicklung der Tumor M2-PK-Messungen als Screeninginstrument bei Gastrointestinalen Tumoren. Entwicklung und Evaluation neuer Testverfahren in der Gastroenterologie (Atemtests zur Magenentleerung und Insulinresistenz) sowie Entwicklung und Evaluation neuer Verfahren zur enteralen Ernährung. Derzeitige Beschäftigung als wissenschaftlicher Assistent an der Medizinischen Klinik und Poliklinik III (Direktor: Prof. Dr. R.G. Bretzel).

gie-liefernden Schritt dieses Stoffwechselweges, die Umwandlung des Glycolyse-Zwischenproduktes Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat (Abbildung 1).

In allen Geweben, in denen sehr schnell sehr große Energiemengen bereitgestellt werden müssen, wie dies im Gehirn und im Muskel der Fall ist, wird das Pyruvatkinase-Isoenzym Typ M1 (M1-PK) exprimiert (Abbildung 1). Gewebe, in denen Glucose nicht abgebaut, sondern aus anderen Stoffwechselprodukten neu gebildet wird (Gluconeogenese), wie dies in der Leber und der Niere der Fall ist, sind durch das Pyruvatkinase-Isoenzym Typ L (L-PK) charakterisiert. In allen proliferierenden, also sich teilenden Zellen, wie embryonalen Zellen, Stammzellen, adulten normal proliferierenden Zellen und vor allem in Tumorzellen findet sich immer das Pyruvatkinase Isoenzym Typ M2 (M2-PK).

Während der Entstehung eines Tumors verschwindet das jeweilige gewebespezifische Isoenzym, wie die L-PK in der Leber oder die M1-PK im Gehirn, und das Pyruvatkinase-Isoenzym Typ M2 wird überexprimiert (Abbildung 2) (Reinacher und Eigenbrodt, 1981).

Die M2-PK führt im Zellstoffwechsel ein Doppelleben. Sie kann in den Zellen in einer tetrameren Form vorkommen, die aus vier gleichen Untereinheiten zusammengesetzt ist, und in einer dimeren Form, die aus zwei Untereinheiten besteht (Abbildung 3). Die tetramere Form der M2-PK ist hochaktiv und mit anderen Glycolyse-Enzymen im so genannten Glycolyse-Enzym-Komplex assoziiert. Die

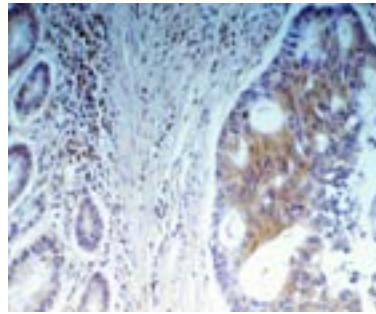


Abb. 2: M2-PK Färbung eines Rektumkarzinoms mit monoklonalen Antikörpern, die spezifisch die dimere Form der M2-PK erkennen. Das Karzinom ist M2-PK positiv (Braunfärbung) während in der normalen Rektummucosa keine M2-PK nachgewiesen werden kann.

räumliche Nähe der im Komplex assoziierten Enzyme ermöglicht eine hocheffektive Umsetzung der Glucose. Die dimere Form dagegen ist unter physiologischen Bedingungen nahezu inaktiv und nicht im Glycolyse-Enzym-Komplex eingebunden.

Die Quartärstruktur der M2-PK (Tetramer oder Dimer) hat entscheidenden Einfluss auf die Verwendungsart der umgesetzten Glucose. Liegt die M2-PK wie in normal proliferierenden Zellen, wie z.B. Fibroblasten, überwiegend in der hochaktiven tetrameren Form vor, wird die Glucose unter Energiegewinnung zu Pyruvat und Lactat abgebaut. In Tumorzellen dagegen überwiegt die inaktive dimere Form. Die dimere Form der M2-PK wurde aus diesem Grund als Tumor M2-PK bezeichnet.

Der Vorteil der dimeren Form der

M2-PK liegt für die Tumorzelle darin, dass es durch die Inaktivierung des letzten Enzyms der Glycolyse ähnlich wie bei einer Straßensperre zu einem Rückstau aller Glycolyse-Zwischenprodukte oberhalb der Pyruvatkinase-Reaktion kommt (Abbildung 3). Diese als Phosphometabolite bezeichneten angestauten Zwischenprodukte stehen dann als Ausgangsstoffe für Zellbausteinsynthesewege wie die Nukleinsäure-, Aminosäure- und Phospholipid-Synthese zur Verfügung. (Mazurek et al., 1997). Die Energie wird dann über einen anderen Tumortypischen Stoffwechselweg, die Glutaminolyse, gebildet (Abbildung 3).

Die Dimerisierung, d.h. der Zerfall der tetrameren Form der M2-PK in die dimere Form (Tumor M2-PK) wird in Tumorzellen durch Oncoproteine induziert.

Oncoproteine sind Proteine, die eine Zelle in eine Tumorzelle umwandeln können. Sie leiten sich von so genannten Proto-Oncoproteinen ab. Dies sind normale zelluläre Proteine, die die Zellteilung regulieren. Durch Mutationen werden sie zu Oncoproteinen und induzieren ein unkontrolliertes Wachstum.

Zu den bisher charakterisierten Oncoproteinen, die eine Dimersierung der M2-PK induzieren, gehören die pp60v-src-Kinase, das Oncoprotein des Rous Sarcoma-Virus, das die M2-PK an der Aminosäure Tyrosin phosphoryliert (Presek et al., 1980) und das E7-Oncoprotein der humanen Papillomaviren Typ 16 (HPV-16), das direkt an die M2-PK bindet (Mazurek et al., 2001). Die Papillomaviren Typ 16 gehören zur Hochrisikogruppe der Papillo-

JUSTUS-LIEBIG-
UNIVERSITÄT
GIESSEN

Dr. Philip D. Hardt

Medizinische Klinik III und Poliklinik
Rodthohl 6
35392 Gießen
Tel.: 0641/99-42752
Fax: 0641/99-42759
E-mail: Philip.D.Hardt@innere.med.uni-giessen.de

JUSTUS-LIEBIG-
UNIVERSITÄT
GIESSEN

Priv.-Doz. Dr. Sybille Mazurek

Institut für Biochemie und Endokrinologie
Fachbereich Veterinärmedizin
Frankfurter Straße 100
35392 Gießen
Tel.: 0641/99-38182
Fax: 0641/99-38179
E-mail: Sybille.Mazurek@vetmed.uni-giessen.de



Sybille Mazurek, Jahrgang 1964, studierte von 1984 bis 1990 Biologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen. Promotion im Jahre 1993 im Institut für Biochemie und Endokrinologie des Fachbereichs Veterinärmedizin, der Universität Gießen über die Wirkung von AMP auf die Proliferation und den Stoffwechsel humaner Adenokarzinomzellen. 2003 habilitierte sie sich im Fachbereich Veterinärmedizin im Fach Physiologische Chemie. Forschungsschwerpunkte: Interaktion der M2-PK mit verschiedenen Oncoproteinen und Regulation des Tumor Metaboloms. Zur Zeit betreut sie ein vom Bundesministerium für Forschung und Technologie gefördertes Projekt über den Tumor-Stoffwechsel als Angriffspunkt für therapeutische Ansätze.

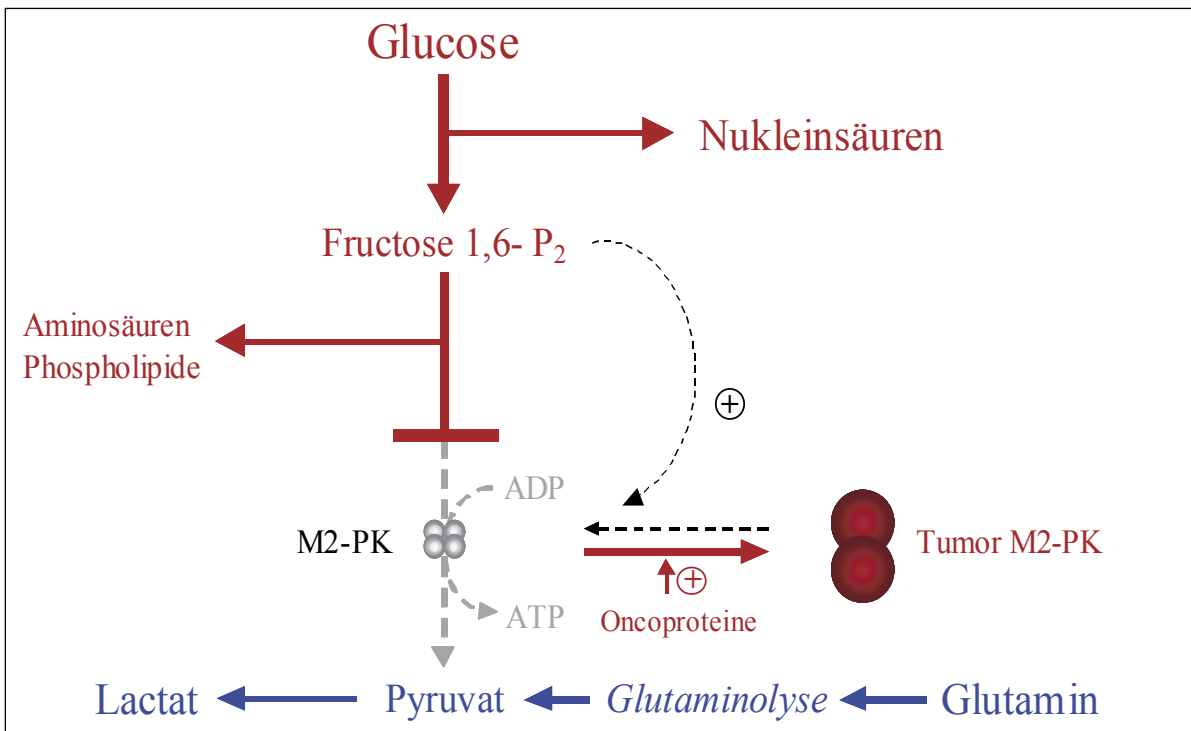


Abb. 3: Metabolische Konsequenzen der Dimerisierung der M2-PK in Tumorzellen.

maviren und werden für das maligne Zervixkarzinom bei der Frau verantwortlich gemacht. Jüngst wurde ebenfalls die A-Raf-Kinase, eine Komponente der Proteinkinasekaskade als Interaktionspartner der Pyruvatkinase entdeckt. Die Proteinkinasekaskade ist eine Kette von hintereinandergeschalteten Proteinkinasen, die abhängig von Wachstumshormonen die Zellteilung steuern.

Das Testsystem zum Nachweis von Tumor-M2-PK

Die Tumor M2-PK (dimere Form der M2-PK) wird also in das Blut und in den Stuhl abgegeben und kann zur Diagnose und zur Verlaufskontrolle in der Krebstherapie herangezogen werden.

Die Quantifizierung des Proteins in den Proben erfolgt über einen sogenannten Sandwich ELISA. Hierzu

wird die zu untersuchende Probe in eine Mikrotiterplatte gegeben, die mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet ist, der ein spezielles Epitop der dimeren Form der M2-PK bindet. Die Tumor M2-PK aus den Proben bindet an die Antikörper und wird auf diese Weise auf der Platte festgehalten. Die restliche Probe wird gewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation mit einem zweiten monoklonalen

Diese Arbeit ist Prof. Dr. Erich Eigenbrodt gewidmet, der im Juni 2004 unerwartet im Alter von nur 55 Jahren verstorben ist. Seine wissenschaftlichen Arbeiten haben maßgeblich zur Entwicklung des Tumor M2-PK Tests beigetragen.

Erich Eigenbrodt, Jahrgang 1949, studierte von 1967 bis 1972 Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen. 1975 Promotion, 1983 Habilitation. Schwerpunkte seiner Forschungsarbeiten waren die Bedeutung der M2-PK und anderer Tumor-spezifischer Stoffwechsel-Charakteristika für die Früherkennung von Tumorerkrankungen, die Aufspürung krebserregender Substanzen und die Tumorthherapie. Seine wissenschaftlichen Arbeiten wurden 1980 mit dem Preis der Justus-Liebig-Universität Gießen, 1983 mit dem Vincenz Czerny-Preis für Onkolo-

gie der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie und 1986 mit dem Preis des Bundesministeriums für Jugend, Familie und Gesundheit für Forschungen zur Einschränkung und zum Ersatz von Tierversuchen im Bereich der pharmakologischen-toxikologischen Prüfung von chemischen Stoffen ausgezeichnet. 1989 wurde er auf die Professur für Vergleichende Biochemie der Tiere im Fachbereich Veterinärmedizin der Universität Gießen berufen. Ab 2003 war er Geschäftsführender Direktor des Instituts für Biochemie und Endokrinologie des Fachbereichs Veterinärmedizin.



Prof. Dr. Erich Eigenbrodt †



Ulrich Klör, Jahrgang 1943, Studium der Humanmedizin von 1962 bis 1968 an der Universität Frankfurt. Medizinalassistent 1969 in Offenbach. Promotion 1969 in Ulm. Klinische Ausbildung zum Arzt für Innere Medizin und Gastroenterologie 1970 bis 1978 in Ulm. 1973 bis 1974 Fellowship am Department of Medicine, University of Washington, Seattle. 1980 bis 1986 Assistant Member, Lipoprotein and Atherosclerosis Research Program, Oklahoma Medical Research Foundation und Associate Professor of Medicine, University of Oklahoma College of Medicine, Oklahoma City, USA. Seit 1986 Leiter der Gastroenterologie und Endoskopie an der Medizinischen Klinik III und Poliklinik (Direktor: Prof. Dr. Reinhard G. Bretzel). Leiter des Labors für Gastroenterologie und Stoffwechsel. Wissenschaftliche Schwerpunkte sind Arbeiten zum Lipidstoffwechsel, insbesondere neue therapeutische Ansätze bei schweren Hypertriglyceridämien ("Gießener Trunk"), Epidemiologie der Helicobacterinfektion bei Deutschen und Migranten, Entwicklung eines neuen Konzeptes zur Entstehung der chronischen Pankreatitis, Entwicklung und Evaluation neuer diagnostischer Verfahren (Tumor M2-PK Atemtests) sowie Arbeiten zur klinischen Ernährung.

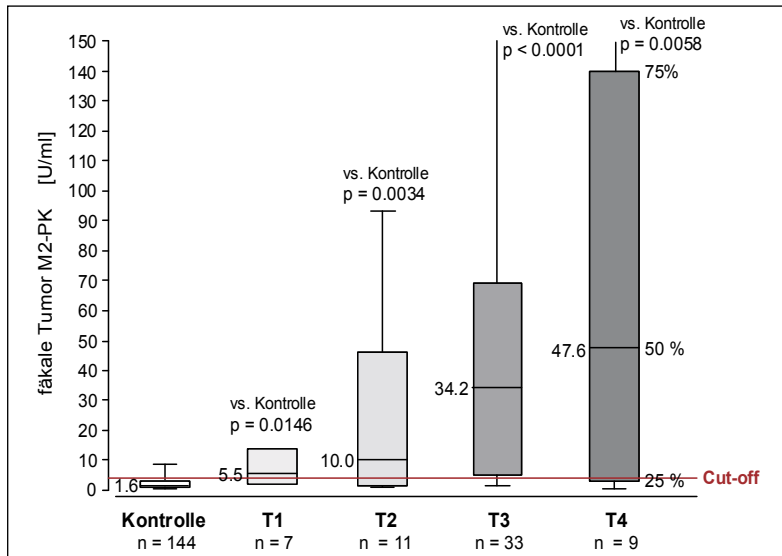


Abb. 5: Tumor-M2-PK in Abhängigkeit vom Tumorstadium und bei Kontrollen. (Die Tumorstadien orientieren sich an der Größe des Primärtumors bzw. dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (Stadium III) oder Fernmetastasen (Stadium IV))

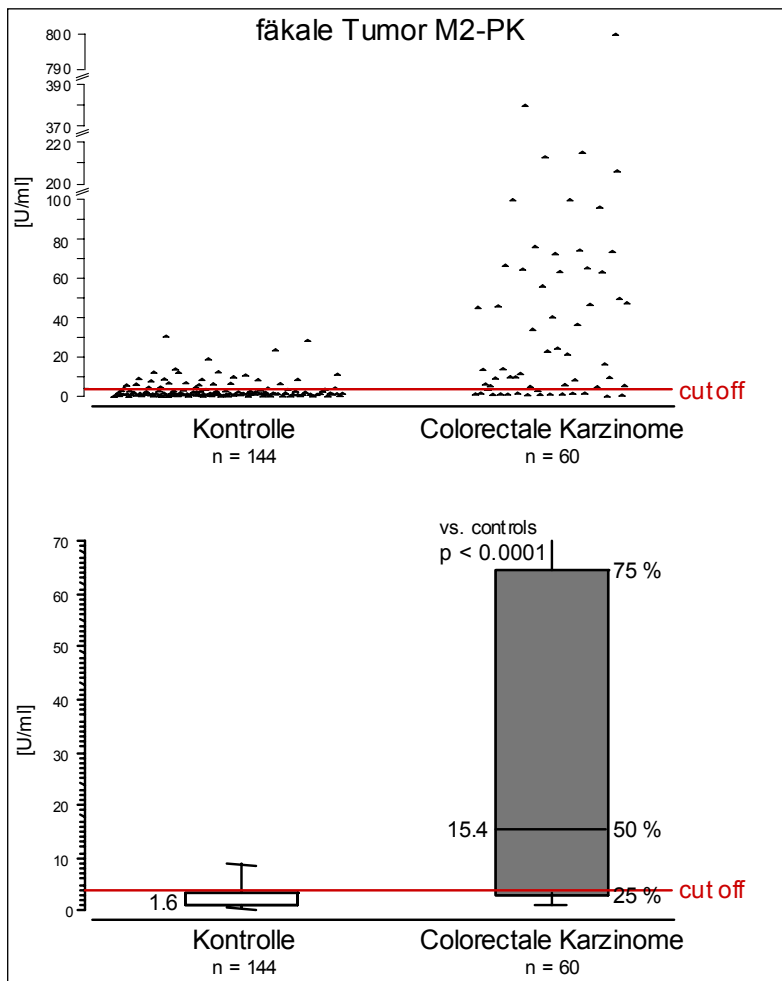


Abb. 4: Tumor-M2 PK bei kolorektalen Karzinomen und Kontrollen (Cut off = Normgrenze)

Antikörper, der gegen ein anderes Epitop der Tumor M2-PK gerichtet ist. Dieser Antikörper ist mit einer Komponente beladen, die eine Farbreaktion auslöst. Die Intensität der Farbreaktion kann quantitativ ermittelt werden und reflektiert die Menge an Tumor M2-PK in der Probe. Der beschriebene ELISA wurde von der Firma ScheBo Biotech AG aus Gießen entwickelt und wird dort unter dem Namen ScheBo® Tumor M2-PK™ im Stuhl hergestellt und vertrieben.

Klinische Anwendung als Stuhltest bei Dickdarmkrebs

Nachdem in einer Pilotstudie an wenigen Patienten gezeigt werden konnte, dass Tumor-M2-PK im Stuhl quantifizierbar ist und dass sich die Werte von Tumorpatienten hochsignifikant von Kontrollpersonen unterscheiden (Hardt et al., 2003), wurde an der Medizinischen Klinik III des Universitätsklinikums eine prospektive Studie bei 60 Patienten mit Darmkrebs und 144 gesunden Kontrollpersonen durchgeführt. Alle Teilnehmer erhielten eine Darmspiegelung. Die Sensitivität des neuen Tests, also die Wahrscheinlichkeit, den Tumor mit dem Test zu erkennen, lag dabei zwischen 60% und 90%, je nach Tumorstadium. Die Spezifität des Tests, also die Wahrscheinlichkeit eines Tumors bei positivem Testergebnis, lag in dem analysierten Kollektiv bei 78%. Die Messergebnisse der Tumor M2-PK sind in den Abbildungen 4 und 5 dargestellt.

Die bisher verfügbaren Tests, wie Blut-im-Stuhl-Tests, besitzen eine deutlich schlechtere Sensitivität von ca. 24 bis 50% (Lieberman et al 2001). Dies erklärt sich schon alleine daher, dass „Blut-im-Stuhl-Tests“ nur die Tumore entdecken können, die tatsächlich bluten. Dies ist aber bei weitem nicht immer der Fall.

Auch die derzeit in Entwicklung befindlichen Verfahren, welche versuchen, die charakteristischen genetischen Veränderungen von Krebszellen als Vorsorgemarker einzusetzen, liefern bisher wesentlich

schlechtere Ergebnisse bei höheren Kosten.

Viel versprechendes Mittel zur Früherkennung von Darmkrebs

Die Dickdarmspiegelung stellt sicherlich weiterhin die sinnvollste Maßnahme zur Früherkennung von Darmkrebs dar, da sie nach allen bisherigen Erkenntnissen am genauesten ist und vor allem auch eine direkte Therapiemöglichkeit aller lokal entfernbaren Tumoren und Tumorstadien bietet. Da allerdings davon ausgegangen wird, dass im Höchstfall 20% der Berechtigten eine Darmspiegelung als Vorsorgemaßnahme durchführen lassen – bisher ist das Angebot lediglich von etwa 2% der Berechtigten wahrgenommen worden – und darüber hinaus leider auch die Kapazitäten für ein bevölkerungsweites Vorsorgeprogramm mit Darmspiegelung nicht bestehen, könnte der neue Test eine durchaus sinnvolle Erweiterung im Vorsorgeprogramm darstellen.

Der Stuhlmarker Tumor M2-PK bietet mit seiner einfachen Analytik

sowohl hinsichtlich der Durchführbarkeit als auch der Testcharakteristika sehr gute Voraussetzungen für ein bevölkerungsweites Screening. Zusammen mit der bei nicht-invasiven Verfahren generell höheren Teilnahmebereitschaft stellt dieser Stuhltest in Kombination mit der koloskopischen Abklärung positiver Befunde ein viel versprechendes Mittel zur Verbesserung der Früherkennung kolorektaler Karzinome dar.

Die vorgestellte Arbeit ist in der Fachzeitschrift British Journal of Cancer unter: P.D. Hardt, S. Mazurek, M. Toepler, P. Schlierbach, R.G. Bretzel, E. Eigenbrodt und H.-U. Klör. Faecal tumour M2 pyruvate kinase: a new, sensitive screening tool for colorectal cancer. British Journal of Cancer (2004) 91(5): 980-984 zu finden.

LITERATUR:

• Hardt PD, Toepler M, Ngoumou B, Rupp J, Klör HU: Measurement of fecal pyruvate kinase type M2 (tumor M2-PK) concentrations in patients with gastric cancer, colorectal cancer, colorectal adenomas and

controls. Anticancer Res. 2003; 23 (2A): 851-853.

- Lieberman DA, Harford WV, Ahnen DJ et al.: One-time screening for colorectal cancer with combined fecal occult-blood testing and examination of the distal colon. N Engl J Med 2001; 345: 555-560.
- Mazurek S, Boschek CB, Eigenbrodt E: The role of phosphometabolites in cell proliferation, energy metabolism, and tumor therapy. J. Bioenerg. Biomembr. 1997; 29: 315-330.
- Mazurek S, Zwerschke W, Jansen-Dürr P, Eigenbrodt E: Metabolic cooperation between different oncogenes during cell transformation: interaction between activated ras and HPV-16 E7. Oncogene; 20: 6891-6898.
- Presek P, Glossmann H, Eigenbrodt E, Schoner W, Rübsamen H, Friis RR, Bauer H: Similarities between a phosphoprotein (pp60src)-associated protein kinase of Rous sarcoma virus and a cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-independent protein kinase that phosphorylates pyruvate kinase type M2. Cancer Res. 1980; 40: 1733-1741.
- Reinacher R, Eigenbrodt E.: Immunohistological demonstration of the same type of pyruvate kinase isoenzyme (M2-PK) in tumors of chicken and rat. Virchows Archiv 1981; 37: 79-88.