

Stefan Holdenrieder¹

Tumormarker-Diagnostik im Urin

Urin bietet sich als ideales Untersuchungsmaterial zur Erkennung und zum Monitoring von Karzinomen des Urogenital-Trakts an. Insbesondere serielle Bestimmungen sind gut durchführbar, denn Urin kann leicht nicht-invasiv gewonnen werden. Da die Grösse einiger tumorassoziierter Biomarker unterhalb der Nierenschwelle liegt, ist sogar die Diagnostik weiterer Tumore denkbar. Allerdings haben sich bis heute nur wenige urinbasierte Biomarker für die Routine-Tumordiagnostik etablieren können.

Tumorerkrankungen in der Schweiz

Wie in anderen westlichen Ländern sind auch in der Schweiz Tumorerkrankungen eine der drängendsten medizinischen Herausforderungen. In der letzten Erhebung des Bundesamtes für Statistik der Schweizerischen Eidgenossenschaft wurden 24 154 Krebsneuerkrankungen bei Männern und 20 051 Neuerkrankungen bei Frauen für das Jahr 2017 berichtet. Insgesamt erkrankten mehr als einer von fünf Menschen vor dem 70. Lebensjahr an Krebs. Zudem ist Krebs die häufigste Ursache für vorzeitige Sterblichkeit vor dem 85. Lebensjahr: Im Jahr 2017 waren in der Schweiz 9 523 krebsbedingte Todesfälle bei Männern und 7 772 bei Frauen zu verzeichnen. Die häufigsten Krebslokalisationen waren bei Männern die Prostata, gefolgt von Lunge und Dickdarm, bei Frauen die Brustdrüse, gefolgt von Dickdarm und Lunge. Urologische Karzinome der Harnblase und der Nieren waren mit 1 268 bzw. 1 000 Fällen deutlich weniger häufig [1].

Bei allen Tumorarten hängt die Prognose wesentlich von einer Diagnose im frühen Stadium ab, solange der Tumor noch operabel ist und keine Fernmetastasen vorhanden sind. Deshalb sind die diagnostischen Bestrebungen auf eine frühzeitige Tumorerkennung und im weiteren Verlauf auf ein möglichst individualisiertes Monitoring gerichtet, um die Therapien im Krankheitsverlauf anpassen zu können.

Breites Spektrum an heute verfügbaren Tumormarkern

In der medizinischen Labordiagnostik stehen heute eine Vielzahl an Tumormarkern zur Verfügung. Dies sind meist Glykoproteine und -lipide, die von der Oberfläche tumoröser Zellen

abgeschilfert werden, oder intrazelluläre Bestandteile, die aktiv sezerniert oder passiv freigesetzt werden. Vor fast 60 Jahren wurden erstmals die tumorassozierten Oberflächenmoleküle Carcino-embryonales Antigen (CEA) und Alpha-Fetoprotein (AFP) beschrieben, die physiologisch eine zentrale Rolle während des Wachstums in der Embryonal- und Fetalzeit spielen. Später kamen die Hybridommarker CA 15-3, CA 19-9, CA 125 und CA 72-4 als diagnostische Antigene hinzu. Intrazelluläre Tumormarker sind physiologisch u.a. als Enzyme (z.B. neuronenspezifische Enolase und prostataspezifisches Antigen), Hormone oder deren Vorstufen (z.B. Calcitonin, Progastrin-releasing Peptide) oder als Teile des zellulären Zytoskeletts (Zytokeratin-Fragmente) von Bedeutung [2, 3].

Zu den neuen, noch in klinischen Validierungen befindlichen Biomarker-Klassen zählen genetische (Mutationen) und epigenetische Veränderungen (DNA-Methylierungen und Histon-Modifikationen) auf im Blut zirkulierenden Nukleinsäuren, Veränderungen der Transkripte (mRNA) und regulatorischer Faktoren (z.B. microRNA), veränderte Peptide und Proteine, deren Metabolite sowie die Tumorzellen selbst. Allerdings können all diese Veränderungen in geringem Umfang auch bei nichttumor erkrankten Personen vorgefunden werden. In diesem Sinne sind die meisten derzeit verfügbaren Tumormarker tatsächlich nicht tumorspezifisch. Jedoch ist die Quantität oder Anhäufung solcher Veränderungen in vielen Fällen hinweisend auf ein malignes Geschehen [3].

Diagnostische Bedeutung von Tumormarkern im Blut und Urin

Im Blut wird die Konzentration der Tumormarker von zahlreichen Faktoren beeinflusst: Neben dem zellulären Expressions- und Sekretionsgrad spielen die Durchblutung des Tumors, die Me-

tabolisierung der Tumormarker im Organismus und Blutkreislauf sowie deren renale oder hepatische Exkretion eine wesentliche Rolle. Vor diesem Hintergrund sind die häufig nur geringen Tumormarker-Konzentrationen bei frühen, lokal begrenzten Tumoren und die stark erhöhten Werte bei ausgedehntem Tumorbefall, aber auch bei physiologischen Einschränkungen des Markerkatabolismus (insbesondere bei renalen, hepatischen und autoimmunen Erkrankungen) nachvollziehbar [3, 4].

Umso wichtiger scheint es, leicht zu gewinnende, tumornahe Untersuchungsmaterialien zur Diagnostik heranzuziehen, wie z.B. Urin für den Nachweis von Karzinomen des Urogenitaltrakts. Dies ist v.a. für Nieren- und Blasenkarzinome naheliegend, für die es im Blut keine aussagekräftigen Marker für die Routinediagnostik gibt. Zusätzlich können auch Tumormarker für nicht urologische Karzinome im Urin nachgewiesen werden, sofern ihre Grösse unterhalb der Nierenschwelle liegt.

Zu diesen Fragestellungen gibt es zahlreiche Studien mit diversen Markern, z.B. Zytokeratinen, weiteren Proteinen, Peptiden und ctDNA, doch in der Routinediagnostik haben sich nur wenige urinbasierte Biomarker etablieren können. Dies mag an der Schwierigkeit zur zuverlässigen Quantifizierung, Verdünnungseffekten im Urin, der Notwendigkeit zur Normalisierung, der Abhängigkeit von der Nierenfunktion und störenden Interferenzen bei Hämaturie und urogenitalen Infekten liegen. Dennoch sind einige Urin-Tumormarker von Bedeutung, die im Folgenden vorgestellt werden sollen.

Bence-Jones-Paraprotein im Urin

Der erste Nachweis eines Tumormarkers im Urin gelang Mitte des 19. Jahrhunderts: Bei der sogenannten Kochprobe durch Erhitzen des Urins trübte sich bei Patienten mit einem Leichtket-

¹ Prof. Dr. med. Stefan Holdenrieder, Institut für Laboratoriumsmedizin – Munich Biomarker Research Center – Deutsches Herzzentrum München, Klinik an der Technischen Universität München

ten-Myelom bei etwa 60 °C der Urin ein, was bei weiterem Erhitzen wieder verschwand. Dies beruht auf der Eigenschaft der Bence-Jones-Paraproteine, in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Salzkonzentration des Urins beim Erwärmen auf etwa 60 °C auszufallen und bei weiterem Erhitzen auf etwa 100 °C wieder in Lösung zu gehen. Anstelle der heute obsoleten Kochprobe erfolgt die qualitative Bestimmung einer Bence-Jones-Paraproteinurie nun mittels Elektrophorese sowie einer selektiven Immunfixations-Untersuchung für die Kappa- und Lambda-Leichtketten im Urin [5].

Die quantitative Charakterisierung erfolgt über die nephelometrische Bestimmung der Leichtkettenkonzentration im Serum oder Urin und der Quotientenbildung der Anteile beider Leichtketten-typen. Die quantitative Bestimmung der Leichtketten im Serum bietet dabei den Vorteil, dass sie unabhängig von einer Nierenschädigung und von Matrixeffekten im Urin ist. Neben dem Leichtketten-Myelom finden sich erhöhte Leichtketten-Werte im Serum sowie ein verschobener K/L-Quotient beim nicht sekretorischen Myelom, bei einer primären Amyloidose sowie einer Light Chain Deposition Disease [5].

Prostate Cancer Antigen 3 mRNA

Für die Früherkennung eines Prostatakarzinoms steht mit dem prostata-spezifischen Antigen (PSA) ein organspezifischer Tumormarker im Blutserum zur Verfügung, der jedoch nicht tumorspezifisch ist und auch bei gutartigen Prostataerkrankungen wie einer benignen Prostatahyperplasie oder einer Prostatitis erhöht sein kann. Zur besseren Einordnung im Graubereich um die Entscheidungsgrenze von 2 bis 10 ng/ml können der Anteil des freien PSA im Serum oder die PCA3- mRNA im Urin als zusätzliche Marker die Einordnung in maligne oder benigne Läsionen unterstützen [6].

PCA3 ist ein nicht kodierendes prostata-spezifisches Gen, das in mehr als 95 % der Prostatatumoren im Vergleich zu Nichttumorgewebe der Prostata überexprimiert ist. Das PCA3-Gen befindet sich auf dem Chromosom 9q21-22 und besteht aus vier Exons. Nach einer Prostatamassage kann die PCA3-mRNA im Urin nachgewiesen und

nach Normalisation mit der nicht tumorspezifischen PSA-mRNA in einem PCA3-Score quantifiziert werden.

PCA3 ist in der Frühdiagnose dem PSA und dem freien PSA überlegen und wird in Nomogrammen eingesetzt, um bei einem positiven PSA-Ergebnis die Zahl der unnötigen Biopsien zu reduzieren oder bei einem negativen PSA-Befund eine Entscheidung zur Rebiopsie zu unterstützen. Durch Berücksichtigung von PCA3 in Risikobewertungsmodellen kann die Prädiktion eines Prostatakarzinoms und v.a. von hochgradigen Tumoren verbessert werden [6, 7].

Urinary Bladder Cancer Antigen

Zum Nachweis eines Harnblasenkarzinoms kommen mehrere Marker ganz unterschiedlicher Herkunft in Frage: Der Assay für das Urinary-Bladder-Cancer-Antigen (UBC) detektiert die Zytokeratinfragmente 8 und 18 im Urin.

Physiologisch kommen die sauren Typ-I-Keratine (Zytokeratine 9–20) und die basischen Typ-II-Keratine (Zytokeratine 1–8) ubiquitär im menschlichen Körper vor, insbesondere in epithelialen Geweben. Da der UBC-Antigen-Assay die Zytokeratinfragmente 8 und 18 im Urin misst, ist eine erhöhte Organspezifität für den Urogenitaltrakt zu erwarten. Allerdings erfolgt die Metabolisierung der kleinen Zytokeratinfragmente überwiegend renal, sodass die Spezifität relativ gering ist. Deshalb liegt die klinische Bedeutung der UBC-Antigen-Bestimmung möglicherweise eher im Therapiemonitoring und der Rezidiventdeckung eines Blasenkarzinoms. Zur verlässlichen Beurteilung der Werte ist dabei eine Korrektur bzgl. der Kreatininausscheidung im Urin vorzunehmen. Weitere Zytokeratin-Tests, z.B. zur Bestimmung von Zytokeratin-19-Fragmenten (CYFRA 21–1) im Urin, erreichen vergleichbare oder bessere Ergebnisse als der UBC-Antigen-Assay [8–10].

Bladder Tumor Antigen

Der Bladder-Tumor-Antigen-Assay (BTA) detektiert den Komplementfaktor H (CFH) oder ein dazu ähnliches Protein (Complement factor H related protein [CFHrP]). CFH ist ein 155 kDa schweres Protein und ist mit mindestens vier weiteren Faktor-H-verwand-

ten Proteinen in einem Gencluster auf dem Chromosom 1 codiert. In gesunden Zellen spielt der CFH eine zentrale Rolle in der Regulation der alternativen Komplementaktivierung und schützt so gesunde Zellen vor komplementvermittelten Schädigungen. Ausserdem wird CFH in Blasenkarzinomzellen synthetisiert, vermutlich um Tumorzellen der Immunabwehr zu entziehen.

Aufgrund der Expression des Komplementfaktors H und der ihm verwandten Proteine beim Blasenkarzinom ist die Anwendung des BTA-Assays im Urin als sensitiver Test für oberflächliche und invasive Karzinome vom Hersteller vorgesehen. Allerdings können benigne urologische Erkrankungen, insbesondere entzündliche Erkrankungen und solche, die mit einer Hämaturie einhergehen, ebenfalls hohe Werte verursachen, was die Spezifität deutlich beeinträchtigt. Da dies jedoch die differenzialdiagnostisch relevanten Patientengruppen betrifft, ist der diagnostische Einsatz des Tests erheblich limitiert. Möglicherweise ist er für Verlaufuntersuchungen, etwa zur Therapiekontrolle und Nachsorge beim Blasenkarzinom, geeignet [11, 12].

Nucleus Matrix Antigen

Das nukleäre Matrix-Antigen oder nukleäres Matrixprotein 22 (NMP 22) ist wie andere nukleäre Matrixproteine Teil der nukleären Matrix, die das strukturelle Baugerüst des Zellkerns darstellt. Die nukleäre Matrix ist ein dreidimensionales Netz aus RNA, Proteinen, residualen Nukleoli sowie peripheren Laminen.

Verschiedene nukleäre Matrixproteine sind gewebe- bzw. organspezifisch. So ist das nukleäre Mitose-Apparat-Protein (NuMA) in urothelialen Karzinomzellen etwa 25-mal konzentrierter als in normalen Zellen. Deshalb bietet sich die Bestimmung von NuMA im Urin als sensitiver Marker für das Blasenkarzinom an. Auch für das Nierenzell-, Prostata-, Mamma-, Cervix-, Kolon- und HNO-Karzinom wurden spezifische NMP beschrieben. Nukleäre Matrixproteine dienen als Ansatzpunkt für enzymatische Abläufe. Sie sind bei der Genexpression, der DNA-Replikation und -Transkription sowie bei der RNA-Prozessierung beteiligt. Das NuMA-Protein ist bei der Verteilung des genetischen



Diagnostic de marqueurs tumoraux urinaires

L'urine constitue une substance de test idéale, facile à obtenir, pour le dépistage et la surveillance des cancers de l'appareil urogénital. Etant donné que la taille de certains biomarqueurs associés aux tumeurs est inférieure au seuil d'élimination rénal, on peut même envisager de diagnostiquer d'autres tumeurs. Toutefois, seuls quelques biomarqueurs urinaires ont pu être établis à ce jour dans le protocole diagnostique standard des cancers. Quelques nouveaux marqueurs potentiels sont présentés ici, parmi lesquels l'ARNm du PCA3 (Prostate Cancer Antigen), marqueur complémentaire du cancer de la prostate, ou encore l'antigène UBC (Urinary Bladder Cancer), l'antigène BTA (Bladder Tumor Antigen) et la protéine de matrice nucléaire NMP 22 dans le cancer de la vessie. Le dépistage du BTA et du NMP 22 est autorisé par la FDA américaine (Food and Drug Administration) pour le diagnostic du cancer de la vessie. Cependant, leur sensibilité et leur spécificité vis-à-vis des tumeurs sont trop basses, en particulier dans les stades précoces, pour que ces marqueurs puissent servir à établir un diagnostic précoce en dehors de groupes à haut risque.

schen Materials während der Mitose involviert.

Für einige NMP werden hohe Sensitivitäten für die Detektion von Tumoren beschrieben, so auch für das NMP 22 im Urin für die Diagnostik des Blasenkarzinoms. Allerdings können benigne urologische Erkrankungen und entzündliche Erkrankungen urologischer wie nicht urologischer Genese ebenfalls zu z.T. sehr hohen Werten führen, was die Spezifität des Tests beeinträchtigt. Trotz der limitierten Tumorspezifität ist der NMP-22-Test in einigen Ländern zum Screening für Blasen-tumore zugelassen und wird im Rahmen der kostenpflichtigen individuellen Gesundheitsleistungen auch als Lateral-Flow-Schnelltest angeboten. Bei einer derartigen Anwendung ist jedoch mit einer hohen Rate an falsch-positiven und falsch-negativen Befunden zu rechnen [10–13].

FDA-zugelassene Tumormarker für Blasenkarzinome im Urin

Neben den genannten BTA- und NMP-22-Assays, die jeweils als qualitativer Point-of-Care-Schnelltest und als quantitativer ELISA erhältlich sind, sind auch ein Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Assay (FISH) (UroVysion) und ein Fluoreszenz-Immun-Histochemie-Assay (ImmunoCyt) von der U.S. Food and Drug Administration (FDA)

für die Diagnostik beim Blasenkarzinom zugelassen. In einem systematischen Review und einer Metaanalyse fassten Chou et al. [14] die Ergebnisse von 57 Studien zusammen und verglichen sie mit Zystoskopie und Histopathologie als Referenz. Hierbei wiesen die Biomarker-Tests Sensitivitäten zwischen 57% und 82% bei Spezifitäten von 74% bis 88% auf. Für BTA im qualitativen und quantitativen Test wurden Sensitivitäten von 64% und 65% sowie Spezifitäten von 77% und 74% gefunden. Für NMP-22 im qualitativen und quantitativen Test waren die Sensitivitäten bei 58% und 69% bei Spezifitäten von 88% und 77%. FISH erreichte eine Sensitivität von 63% bei einer Spezifität von 87% und ImmunoCyt eine Sensitivität von 78% bei einer Spezifität von 78%. Im direkten Vergleich wurden ähnliche Ergebnisse durch den quantitativen NMP-22 und den qualitativen BTA-Assay erzielt. In Kombination der Urin-Biomarker mit der Zytologie wurden etwas höhere Sensitivitäten erzielt als durch die einzelnen Marker allein (81% vs. 69%). Die Sensitivitäten variierten jedoch stark hinsichtlich des Tumorstadiums und -gradings. Insbesondere für die frühen Karzinome war die Performance der Tests mit einer hohen Rate an falsch-negativen Ergebnissen schlechter [14].

Screening-Tests in der Praxis

Die Konsequenz eines unbedachten Einsatzes der Biomarker-Tests in der Screening-Situation bei Personen mit einem niedrigen Tumorrisiko kann an einem konkreten Fall in unserem Labor nachvollzogen werden: Eine 40-jährige Akademikerin, Mutter zweier kleiner Kinder, liess anlässlich eines Besuchs bei ihrem Gynäkologen den qualitativen NMP-22-Schnelltest zur Krebsvorsorge durchführen. Das Testresultat war schwach positiv. In einer separaten Probe wurde das Ergebnis durch den quantitativen NMP-22-Immunoassay im Labor bestätigt. Verständlicherweise führte das bei der Patientin zu grosser Besorgnis, worauf ein langes Gespräch stattfand, um ihr die Relevanz der Ergebnisse zu erklären.

Bei ihrer nicht vorhandenen Risikokonstellation (keine Familienanamnese, keine Raucherin, keine berufli-

che Exposition, junges Alter usw.) war die Inzidenzrate eines Blasenkarzinoms bei 6 von 100 000 Personen, d.h. 99 994 Personen in dieser Risikoklasse sind frei von einem Blasenkarzinom. Bei einer NMP-22-Sensitivität von ca. 65% würden nun 4 der 6 Tumorpatienten richtigerweise entdeckt. Bei einer Spezifität von ca. 80% würden jedoch 20% der 99 994 gesunden Personen, also 19 999 Personen, fälschlicherweise positiv getestet. Insgesamt ergäbe sich ein positiv prädiktiver Wert von nur 0,02% (4 aus 20 003 Personen). Mit anderen Worten ist das Ergebnis mit 99,98%-iger Wahrscheinlichkeit ein falsch positives Ergebnis – insbesondere aufgrund der niedrigen Vortestwahrscheinlichkeit. Diese Aufklärung findet in der Regel jedoch nicht vor dem Angebot des Schnelltests statt und kann im Nachhinein die Besorgnis natürlich nicht zerstreuen. Die Folge im konkreten Fall waren mehrere zytologische und auch eine zystoskopische Untersuchung, die keine tumorspezifischen Befunde ergaben. Deshalb ist der Einsatz von Tumormarker-Tests in der Screening-Situation nur gezielt, nach entsprechender Aufklärung und in Hochrisiko-Gruppen angebracht.

Ausblick für die Tumordiagnostik im Urin

Mit zunehmendem Einzug der OMICS-Technologien ins Labor eröffnen sich für die Zukunft auch für die Tumordiagnostik im Urin neue und vielversprechende Ansätze. So wurde vor Kurzem eine umfassende Charakterisierung zellfreier DNA im Plasma und Urin von Patienten mit Nierenzellkarzinomen beschrieben [15]. Auch Studien des Urin-Metaboloms zeigen grosses Potential für die Identifizierung neuer Marker, ein besseres Verständnis der Tumorphysiologie sowie eine zukünftige Diagnostik [16]. Dafür müssen die neuen diagnostischen Ansätze jedoch noch sorgfältig evaluiert werden.

Korrespondenz
holdenrieder@dhm.mhn.de

Referenzen

Online unter www.sulm.ch/d/pipette ->
Aktuelle Ausgabe (Nr. 6-2020)