

48. De Witte JH, Sweep CGJ, Klijn JGM, Grebenschikov NI, Peters HA, Look MP, Van Tienoven TH, Heuvel JJTM, Van Putten WLJ, Benraad ThJ and Foekens JA. Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor (PAI-1) in cytosols and pellet extracts derived from 892 breast cancer patients. *Brit J Cancer* 1999; 79: 1190-1198.
49. De Witte JH, Sweep CGJ, Klijn JGM, Grebenschikov N, Peters HA, Look MP, Van Tienoven ThH, Heuvel JJTM, Bolt-De Vries J, Benraad ThJ and Foekens JA. Prognostic value of tissue-type plasminogen activator (tPA) and its complex with the type-1 inhibitor (PAI-1) in breast cancer. *Brit J Cancer* 1999; 80: 286-294.
50. Budillon A. Molecular genetics of cancer. *Cancer* 1995; 76: 1869-1873.
51. Quirke P, Mapstone N. The new biology: histopathology. *Lancet* 1999; 354 (suppl.I): 26-31.

52. Lee EY-HP. Tumor suppressor genes and their alterations in breast cancer. *Sem Cancer Biol* 1995; 6: 119-125.

Summary

Serum tumor markers: past, state-of-the-art, and future. Thomas CMG and Sweep CGJ. Ned Tijdschr Klin Chem 2001; 26: 13-24.

Today, serum determinations of tumour markers are indispensable attributes in the diagnosis and treatment of cancer and, therefore, have a definite place in clinical practice. After a short historical flashback we systematically review a number of contemporary aspects of serum tumour markers related to various organ systems and briefly indicate possible future developments.

Key-words: tumor markers; Dutch working group on tumor markers

Ned Tijdschr Klin Chem 2001; 26: 24-27

CA 15.3 en andere MUC1-testen

G.J. van KAMP¹, A.A. VERSTRAETEN² en F.G.M. SNIJDEWINT²

De mucine familie, die momenteel 9 leden omvat, bestaat uit membraan-geassocieerde en gesecreteerde mucines. MUC1-mucine wordt gedetecteerd met monoclonale antilichamen, o.a. in de CA 15.3 assay. Diverse testen zijn verkrijgbaar die met verschillende antilichamen het MUC1-mucine aantonen. Selectie van geschikte monoclonalen kan o.a. geschieden met epitooptyping. Prototype assays met verschillende antilichaamcombinaties tonen aan dat verrassende nieuwe combinaties mogelijk zijn. MUC1-mucine assays zijn niet geschikt voor screening, maar lenen zich wel voor follow-up van patiënten met mammacarcinoom.

Trefwoorden: MUC1, mucine, CA 15.3, tumormarker, borstkanker

Op het westelijk halfmond is borstkanker van alle maligne aandoeningen de belangrijkste doodsoorzaak bij vrouwen en passeert als zodanig de hart- en vaatziekten. Ongeveer 12% van de vrouwen wordt geconfronteerd met borstkanker en 3,5% sterft aan deze ziekte. Het enorme aantal gevallen van deze maligniteit is waarschijnlijk de reden waarom meer geld geïnvesteerd wordt in borstkankeronderzoek dan in onderzoek aan prostaatcancer. Het zwaartepunt van

het onderzoek ligt bij het ontwikkelen van technieken en markers die het mogelijk maken de aandoening in een zodanig vroeg stadium te vinden dat een behandeling kan worden ingezet die zo min mogelijk bijwerkingen heeft. Als eerste tumormarker werd CEA (carcino-embryonisch antigeen) ontwikkeld voor detectie en follow-up van darmkanker en later ook voor borstkanker. Voor het aantonen van borstkanker is CEA echter te ongevoelig en te weinig specifiek. Daarom wordt CEA nu voornamelijk gebruikt als een algemene marker voor adenocarcinoma's ter ondersteuning van de diagnose en vooral bij de follow-up van de patiënt na behandeling.

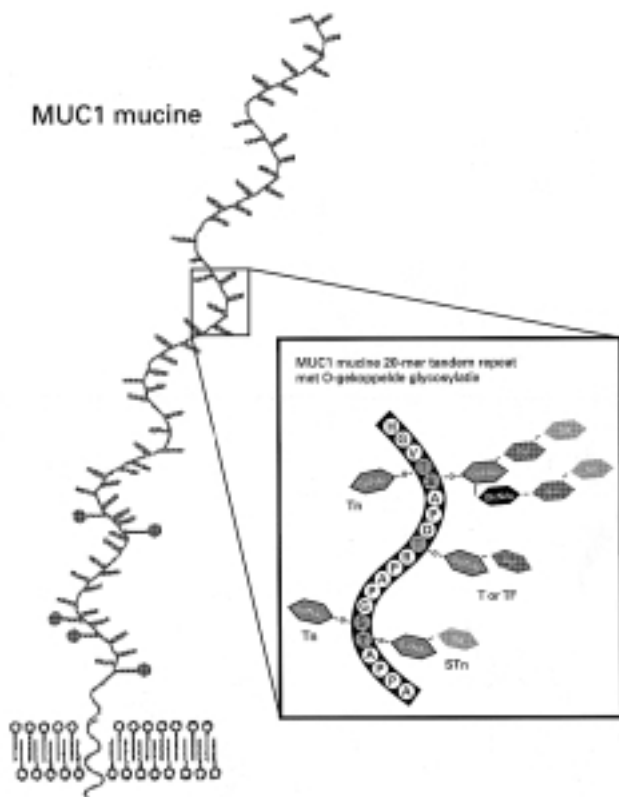
De opkomst van de monoclonale antilichaam (MoAb) techniek in de tachtiger jaren, maakte het ontwikkelen mogelijk van tumormarkertesten met een veel grotere specificiteit. Eén van de eerste testen die op basis van MoAbs ontwikkeld werd was de CA 15.3 test, waarmee het borstkanker geassocieerde MUC1-mucine aangetoond kan worden. Deze test is nog steeds één van de meest toegepaste tumormarkertesten.

Mucines

Het MUC1-mucine behoort tot een steeds groter wordende familie van mucines, genummerd van MUC1 tot momenteel MUC9. Mucines, de belangrijkste component van de mucus, zijn hoog-moleculaire glycoproteïnen, die onderverdeeld kunnen worden in membraan-geassocieerde (MUC1 en MUC4) en gesecreteerde mucines (onder andere MUC2 en MUC3). Alle mucines hebben gemeenschappelijk dat ze zijn opgebouwd uit een groot aantal zogenaamde aminozuur "tandem repeats", die sterk geglycosyleerd

Afdeling Klinische Chemie¹ en Afdeling Verloskunde en Gynaecologie², Academisch Ziekenhuis, Vrije Universiteit, Amsterdam.

Correspondentie: Dr. G.J. van Kamp, Afdeling Klinische Chemie, Academisch Ziekenhuis, Vrije Universiteit, Postbus 7057, 1007 MB Amsterdam.



Figuur 1. Schematische weergave van de structuur van een MUC1-molecuul.

zijn en die een voor ieder mucine karakteristieke samenstelling hebben. Het MUC1-gen is gelokaliseerd op chromosoom 1q21 en bevat de code voor het MUC1-transmembraanmucine. Het MUC1-mucine is een glycoproteïne met een gestrekte structuur en is opgebouwd uit een variabel aantal (30-90) repeats van 20 aminozuren (GVTSAPDTRPAPGSTAPPAH). Het heeft een molecuulgewicht van 300-1000 kD, waarvan 50% voor rekening van carbohydraten komt. De moleculen strekken zich uit tot een lengte van 200-500 nm en zijn in de celwand verankerd via een hydrofoob transmembraan-gedeelte en een cytoplasmatisch gedeelte van 69 aminozuren (figuur 1). De MUC1-mucine repeats bevatten relatief veel serine, threonine en proline residuen en zijn in hoge mate O-geglycosylerd. N-glycosylering is alleen te vinden aan het transmembraan gedeelte. Hier vindt ook proteolyse van het mucinemolecuul plaats, waardoor het mucine afgescheiden wordt in o.a. melk en in geringe mate ook in de circulatie komt.

Mucine komt voor op epitheelcellen in klierweefsel van verschillende organen zoals de borst, pancreas, endometrium, ovarium, testes en luchtwegen. Door zijn extreme grootte dekken de apicaal gerichte MUC1-mucinemoleculen de cel effectief af. Andere op de celwand aanwezige moleculen zoals receptoren en adhesiemoleculen zijn daardoor moeilijk bereikbaar. De cel wordt door MUC1-mucine beschermd tegen proteolytische enzymen. Het mucine speelt ook een rol bij cel-celinteractie.

In vergelijking tot gezond borstweefsel is in maligne borsttumoren de genexpressie verstoord, met als resultaat een verhoogde synthese en een verminderde

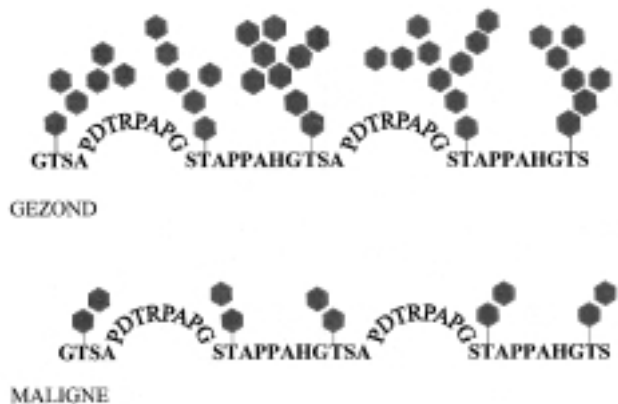
en afwijkende vorm van glycosylering. In maligne weefsel is het MUC1-mucine niet langer apicaal aanwezig, maar op het gehele celoppervlak aantoonbaar. Dit proces kan leiden tot een verhoogde afsplitsing van mucine en een toegenomen MUC1-mucineconcentratie in de circulatie. Ook wordt de cel-celadhesie verstoord, resulterend in een lossere weefselstructuur, wat kan leiden tot metastasering.

MUC1-testen

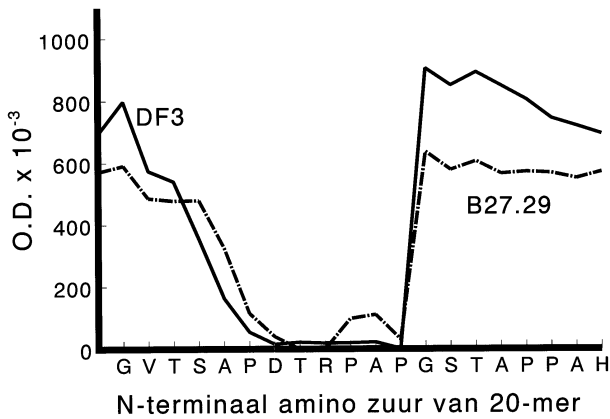
Testen voor het aantonen en kwantificeren van de serum MUC1-mucine concentratie zijn van belang gebleken voor het volgen van de behandeling en verdere follow-up van borstkanker patiënten. Door de veranderde glycosylering van het MUC1-mucine van borstkankerepitheel worden immunogene gebieden op de peptidekern van het molecuul beter toegankelijk voor herkenning door MoAbs.

Er is een groot aantal MoAbs ontwikkeld, die reageren met epitopen op het MUC1-mucinemolecuul. Enige van deze MoAbs zijn gebruikt voor het opzetten van immunotesten voor het kwantificeren van MUC1-mucine in lichaamsvloeistoffen. De oorspronkelijke Centocor CA 15.3 RIA-test was de eerste en nog steeds in diverse vormen meest gebruikte dubbelantilichaam sandwichtest met de combinatie van de MoAbs 115D8 als "catcher" en DF3 als gelabelde "detector". Andere MUC1-mucine bindende MoAbs zijn gebruikt voor het ontwikkelen van een aantal andere testen; daarvan zijn CA 27/29, CA 549, ACS BR, CA 549 en BR-MA de meest bekende.

In gezond epitheel dekken suikerketens van het sterk geglycosylerde mucine, de eiwit "back-bone" vrijwel geheel af, zodat deze niet of nauwelijks toegankelijk is voor het immuunsysteem (figuur 2). In maligne weefsel, waar de glycosylering sterk is verminderd, komt ten minste een deel van de aminozuursequentie van de mucinerepeats vrij en dat geeft zo de mogelijkheid tot binding van specifieke monoclonale antilichamen gericht tegen (een deel van) het peptide. Welk deel van het peptide door de bekende monoclonale antilichamen herkend wordt, kan van belang zijn voor het opzetten van MUC1-mucine-testen. Door een geraffineerde techniek werd van een groot aantal MoAbs een "fingerprint" gemaakt (1).



Figuur 2. Verschil in glycosylering van aminozuurreeksen in gezond en maligne weefsel.



Figuur 3. Bindingspecificiteit van diverse MoAbs in epitooptingerprintexperiment.

MoAbs werden getest op hun reactiviteit met synthetische 20-mer peptiden, elk beginnend met een ander aminozuur uit het MUC1-mucine repeat. Hiervoor werden de afzonderlijke peptiden gecoat op opeenvolgende putjes van een microtiterplaat. De binding van de MoAbs met deze peptiden werd bepaald. De putjes, waar een peptide als coating was gebruikt dat niet de epitooptstructuur bevat die herkend wordt door het antilichaam, werden niet aangekleurd; zie als voorbeeld figuur 3. De “dip” treedt op waar het MoAb geïncubeerd is in putjes met een peptide waarin de specifieke epitooptstructuur niet aanwezig is. Voor de MUC1-MoAbs DF3 en B27.29 bestaat de noodzakelijke aminozuursequentie uit APDTRPAP, terwijl het epitoopt herkend door B-12 en Ma522 gelokaliseerd zijn in hetzelfde gebied, maar wat korter, respectievelijk wat langer zijn. De essentiële aminozuurvolgorde in het epitoopt voor een aantal MoAbs is weergegeven in tabel 1. Het arg-residu, geflankeerd door PDT- en PAP-sequenties, blijkt essentieel te zijn voor het mucine-epitoopt dat door de meeste anti-MUC1-mucine MoAbs herkend wordt. Er wordt dan ook gepostuleerd dat dit immunodominante gedeelte een “knop” vormt op het eiwitmolecuul, hoewel recente kristallografische studies van een anti-MUC1-MoAb met het bijbehorende epitoopt dit niet bevestigen. De specificiteit van anti-MUC1-MoAbs kan afhankelijk zijn van de mate waarin het MUC1-molecuul is geglycosyleerd. Zo herkent een aantal MoAbs alleen hypogeglycosyleerd mucine, terwijl andere MoAbs, zoals die gebruikt worden in veel commerciële testen, zowel normaal geglycosyleerd als hypogeglycosyleerd, tumorgeassocieerd MUC1 herkennen. Tot deze laatste groep behoren de in commerciële testen gebruikte MoAbs 115D8 en Ma695, die specifiek zijn voor een glycosylering afhankelijk epitoopt.

Het testen van “antibodies”

De “carcinomaspecificiteit” van verschillende combinaties van MoAbs kan bepaald worden door het éne MoAb als “catcher” te coaten aan de vaste fase en het tweede als gelabeld detectorantilichaam te gebruiken. Gepoolde sera van patiënten met borstkanker en een hoge serum CA 15.3-concentratie werden in een

Tabel 1. Identificatie van een epitoopt door fingerprinting. Door overlappende 20-meren op binding van diverse monoclonalen te testen wordt bepaald welke aminozuren deel uitmaken van het door het betreffende antilichaam herkende deel van het epitoopt.

Monoclaal	(sub)klasse	Repeat
B12	IgG1	PDTRPAP
B27.29	IgG1	saPDTRpaP
DF3	IgG1	tsAPDTRPAP
BC4W154	IgM	DTRpAP
MF30	IgG1	pgSTAPPAH
Ma552	IgG1	GVTSAPDTRPAP
BC4E549	IgG1	TSAPDTRPAP

groot aantal MoAb-combinaties getest en de uitkomst werd vergeleken met de resultaten van een serumpool van gezonde controles. Een combinatie werd (arbitrair) specifiek genoemd als voor de serumpool van de kankerpatiënten een 10x hoger signaal werd verkregen dan voor het controleserum werd gevonden: de test met de hoogste ratio maligne/ normaal mucine vormt volgens deze criteria de meest specifieke test-combinatie. Een homologe test met Ma695 en een heterologe combinatie Ma552/B27.29 zouden de meest specifieke testen opleveren, direct gevolgd door de combinatie BC4W154/B27.29 (2). Het MoAb dat als “catcher” het best scoorde in combinatie met andere MoAbs als detector, is Ma695, een MoAb gericht tegen een carbohydraatgerelateerd epitoopt. De meeste andere MoAbs die goed scoorden als vaste fase antilichaam, zijn gericht tegen peptide-epitopen. Bij het kiezen van een combinatie van MoAbs bij het ontwikkelen van een test, speelt niet alleen de specificiteit, maar ook de affiniteit van het antilichaam voor het antigeen een cruciale rol. Daarom kan de reële waarde van een combinatie, in termen van specificiteit en effectiviteit, pas echt bepaald worden door een groot aantal sera van kankerpatiënten én van gezonde personen te testen.

De resultaten voor enige van de tientallen MoAb-combinaties is weergegeven in tabel 2, waarbij met name de combinaties zijn opgenomen zoals deze gebruikt worden in commercieel verkrijgbare testen (tabel 3). In deze testen worden vaak MoAbs gecombineerd, waarvan één MoAb een geglycosyleerd epitoopt herkent en het tweede specifiek is voor een peptide epitoopt, zoals bijv. in de CA 15.3 en BR-MA testen, resulterend in een goede ratio voor binding aan en detectie van carcinoomgerelateerd MUC1 en “gezond” MUC1.

Verschillende MoAbs zouden, ook vanwege de hoge affiniteit voor het antigeen, als combinatie zeer interessante testen kunnen opleveren: bijvoorbeeld MoAbs 115D8 met B12 of Ma 552 met DF3. Door de overname van Boehringer Mannheim door Roche zou de combinatie 115D8 met B12, respectievelijk uit testen van beide firma’s, een goede test kunnen opleveren.

Tabel 2. Efficiëntie van diverse combinaties van antilichamen. Weergegeven is de ratio van de waargenomen binding aan serum van borstkankerpatiënten en gezonde controles.

Vaste fase	Detector-antilichaam					
	DF3	Ma695	BC4W154	B12	M38	B27.29
115D8	14,5	4,7	10,5	21,0	8,5	32,2
Ma552	24,0	20,1	26,3	13,0	13,1	40,2
Ma695	13,3	28,9	2,1	14,9	18,8	5,8
B27.29	13,5	8,9	2,8	7,2	9,6	9,8
BC4W154	29,0	8,9	5,5	9,6	14,0	35,5

Tabel 3. MUC1-mucine monoclonale antilichaamcombinaties en labels in commerciële testen.

	MoAb		label	type test
	catcher	detector		
Centocor CA 15-3	115D8*	DF3	¹²⁵ I	heterologe RIA
Roche Enzymun CA 15.3	115D8*	DF3	Peroxidase	heterologe EIA
Roche Elecsys CA 15-3	115D8*	DF3	Ru-chelate	elektrochemoluminescentie assay
Roche MCA**	B-12	B-12	peroxidase	homologe EIA
DPC BR-MA	Ma552	Ma695*	alk. phosphatase	two-site sequentiële chemoluminescentie
Biomira Truquant BR CA27.29***	B27.29		¹²⁵ I	competitieve inhibitie RIA
Bayer/Chiron ACS BR CA27.29***	B27.29		acridinium ester	competitieve inhibitie chemoluminescentie

*: 115D8 en Ma695 binden aan een geglycosyleerd epitoom; **: mucin breast cancer associated antigen; ***: CA27.29 antigen (eiwit backbone gerelateerd epitoom) gecoatete vaste fase.

Conclusie

Met MUC1-mucine (CA 15.3) testen wordt geen mammacarcinoom specifiek antigeen gemeten; bij diverse maligniteiten van andere organen, zoals ovarium, prostaat en pancreas, kunnen ook verhoogde CA 15.3 waarden gevonden worden. CA 15.3 is daarom niet geschikt voor screening en toepassing als

diagnostische parameter. Wel is er een goede correlatie met het ziekteverloop van >70% van de patiënten, behandeld voor mammacarcinoom, zoals in figuur 4 geïllustreerd.

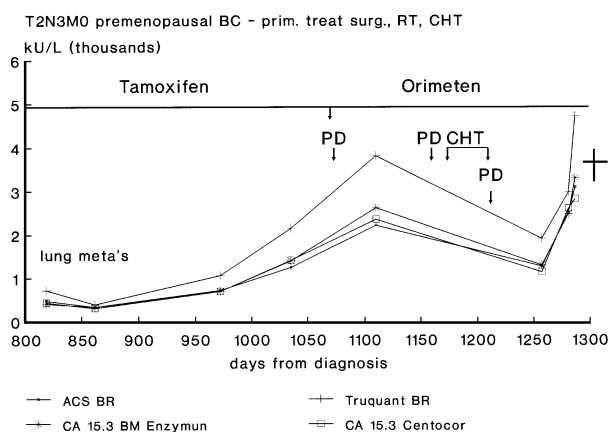
Literatuur

- Schol DJ, Meulenbroek MF, Snijdwint FG, von-Mensdorff-Pouilly S, Verstraeten RA, Murakami F, Kenemans P, Hilgers J. 'Epitope fingerprinting' using overlapping 20-mer peptides of the MUC1 tandem repeat sequence. *Tumor Biol* 1998; 19 Suppl 1: 35-45.
- Norum LF, Varaas T, Kierulf B, Nustad K. Carcinoma-associated MUC1 detected by immunoradiometric assays. *Tumor Biol* 1998; 19 (suppl.1):134-146.

Summary

CA 15.3 and other MUC1-tests. Kamp GJ van, Verstraeten AA and Snijdwint FGM. *Ned Tijdschr Klin Chem* 2001; 26: 24-27. The nine membered mucin family consists of membrane associated and secreted mucins. MUC1 mucin can be detected with a variety of antibodies, for instance as incorporated in the CA 15.3 assay. Various tests are available, using different antibodies. The properties of such antibodies can be evaluated with epitope fingerprinting techniques. Prototype assays with various antibody combinations reveal that surprising new combinations are feasible. Although not suitable for population screening, MUC1 mucin assays are helpful in the follow-up of patients with breast cancer.

Key-words: MUC1 mucin; CA 15.3; tumor marker; breast cancer



Figuur 4. Verloop van de CA 15.3 spiegel bij een premenopausale patiënte met borstkanker met diverse MUC1-mucinetesten. RT: radiotherapie; CHT: chemotherapie; PD: progressieve ziekte klinisch aantoonbaar. Tamoxifen is een anti-oestrogeen, blokkeert de werking van oestrogenen; Orimeten is een aromataseremmer, blokkeert de synthese van oestrogenen.