

# CYFRA 21-1: Ein Serumtest für das Monitoring von Lungentumor-Patienten: Technische Erprobung und biochemische Grundlage

**CYFRA 21.1: A serum test for the monitoring of patients with lung tumors:  
Biochemical fundamentals and technical trials**

D. Banauch, H. Bodenmüller, B. Ofenloch-Hähnle, D. Jaworek, A. Dessauer  
Boehringer Mannheim GmbH, Forschungszentrum Tutzing

## Einleitung

Monoklonale Antikörper gegen Intermediärfilamente werden für die immunhistochemische Diagnostik im breiten Rahmen eingesetzt. Für die Differenzierung maligner epithelialer Tumore haben sich Antikörper gegen Cytokeratine (CK) als besonders vorteilhaft erwiesen [1].

Broers et al. [2] beschrieben detailliert den Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen CK 8, 18 und 19 zur immunhistochemischen Typisierung von Lungentumoren in Humangewebe.

Da Cytokeratine unlösliche Bestandteile des Zellskelets darstellen, wurde bis vor kurzem ein Serumtest auf diese Analyte als wenig erfolgversprechend angesehen. Es gelang uns, durch Bestimmung von löslichen CK-Fragmenten einen Sandwich-ELISA-Test® aufzubauen (Enzymunt-Test CYFRA 21-1), der die CK-Bestimmung in Serum und Plasma erlaubt [3].

## Biochemische Charakterisierung

### Auswahl und Charakterisierung der Antikörper

Aus einer Gesamtzahl von 13 murinen Antikörpern gegen Cytokeratin 8, 18 und 19 wurde die Antikörerkombination Ks 19.1×BM 19.21 zur Entwicklung eines Serumtests (CYFRA 21-1) herangezogen. Diese Kombination zeigte die höchste diagnostische Sensitivität zur Erfassung von Lungentumoren.

Die Epitope der CYFRA 21-1 Antikörper befinden sich beide auf der Helix 2B in der Rod-Domäne von Cytokeratin 19 (Abb. 1). Von dieser Region ist bekannt, daß sie eine wichtige Rolle in der Heterodimerisation von Typ I/Typ II-Cytokeratinen spielt, wodurch die Cytokeratine gegen proteolytische Angriffe geschützt werden.

Die im CYFRA 21-1 Test verwendeten Antikörper reagieren nicht mit anderen Proteinen. Aus Abbildung 2 geht hervor, daß keine Kreuzreaktionen mit Cytokeratin 8 und 18 auftreten, obwohl ca. 80% Sequenzhomologie von CK 19 im Vergleich zu CK 8 und CK 18 besteht.

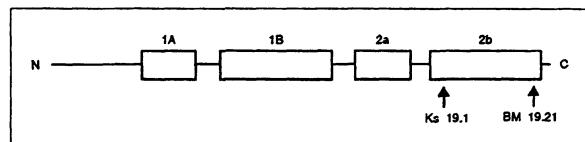


Abb. 1: Schematische Darstellung der Epitope auf dem Cytokeratin 19.

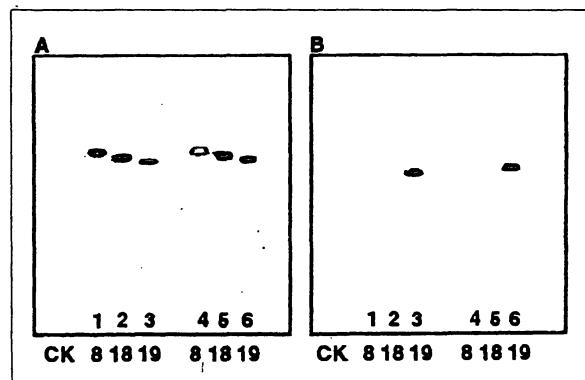


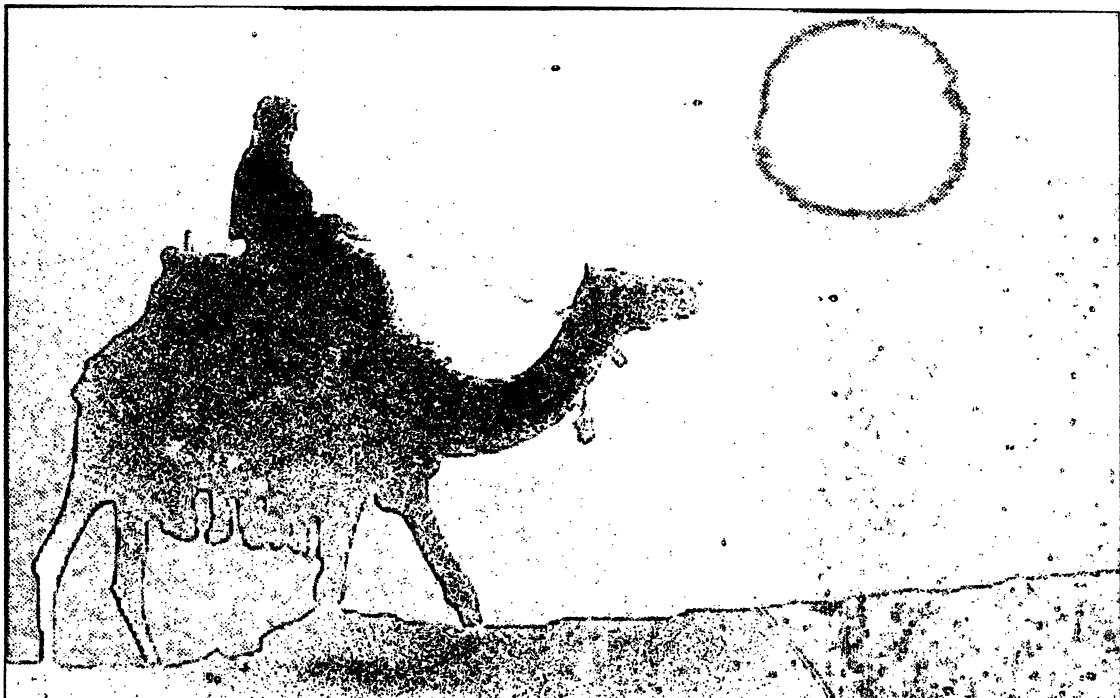
Abb. 2: Spezifität der CYFRA 21-1 Antikörper. A: Proteinanfärbung durch Silber; B: Immunoblot mit Ks 19.1 (Spur 1-3) und BM 19.21 (Spur 4-6). Beide Antikörper reagieren ausschließlich mit CK 19.

## Herstellung des Standardmaterials

Das Standardmaterial wurde aus der humanen Zelllinie MCF-7 gewonnen, die besonders reich an CK 8, CK 18, und CK 19 ist.

Die CK 19 Fragmente wurden entsprechend dem Verfahren von Achtstätter et al. [4] gewonnen:

- Extraktion und Anreicherung der Cytokeratine in Puffer hoher Ionenstärke.
- Lösen in 9M Harnstoff.
- Rekonstitution der Heterodimere durch Herabsetzen der Harnstoffkonzentration.
- Kontrollierte Verdauung durch Chymotrypsin, wodurch die hydrophoben N- und C-terminalen Regionen entfernt werden.



## Oasis. Worth looking out for.

Das neue automatische Blutkultursystem von Unipath.



**Oxoid Automated Septicaemia Investigation System**

**Medica '93 – Produktpräsentation in Halle 4, Stand A23**

Unipath GmbH · Postfach 10 11 27 · 46467 Wesel · Telefon (0281) 152-0 · Telefax (0281) 152-1 · Teletex (17) 281 307 = Unipath

## Produktnachrichten\*

### Automatisierte Retikulozytenzählung am Coulter® STKS und MAX M

Eine der zeitaufwendigsten, manuellen Labormethoden kann jetzt automatisiert mit den Systemen Coulter® (Krefeld) STKS und MAX M durchgeführt werden. Damit wird dieses Messung schnell, präzise und kostengünstig.

Die Bedeutung der Retikulozytenzählung zur Diagnose und Verlaufskontrolle erythropoetischer Störungen ist unbestritten. Durch einfache Hard- und Softwareänderungen kann jeder bereits installierte STKS und MAX M zusätzlich auf die Retikulozytenzählung umgerüstet werden. Das Ergebnis wird damit Bestandteil des kleinen bzw. großen Blutbildes. Die Vorbereitung der Proben ist schnell und unkompliziert und wird in zwei Schritten mit dem Coulter ReticPrep-Reagenzienkit durchgeführt. 32 000 Erythrozyten werden für die Retikulozytenzählung in weniger als einer Minute nach Volumen, Conductivität und Laserlichtstreuung (VCS-Technologie) analysiert und damit die Präzision und Richtigkeit der Messung erhöht. Zusätzlich wird eine Standardisierung erreicht. Das Ergebnis ist ein „Retiplot“ und wird im STKS automatisch dem kompletten Blutbild der Probe zugeordnet. Neben der prozentualen und absoluten Angabe der Zellzahl wird das mittlere Retikulozytenvolumen und der Reifeindex für die Retikulozyten angegeben. 60 Proben werden in der Stunde analysiert. Für die Qualitätskontrolle steht die Coulter® Retic-C-Trilevel-Kontrolle zur Verfügung.

### Automatischer Lumineszenz-Meßplatz

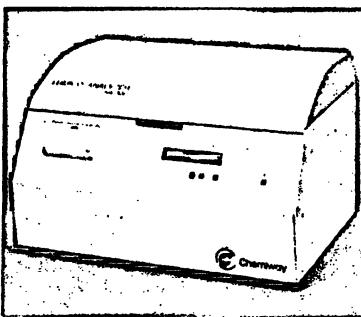
Zum automatischen Messen von lumineszenzmarkierten Tests in Röhrchen gibt es jetzt eine echte Alternative, den Lumico 300. Lumico 300 ist ein kompakter Lumineszenzmeßplatz für 300 Röhrchen (12 x 75 mm) in praktischen Racks mit japanischer Präzision und Verarbeitungsqualität. 300 Proben können in 30 Minuten gemessen und ausgewertet werden.

Lumico arbeitet vollautomatisch. Die Proben werden in Racks in den Probenwechsler gestellt. Die Zugabe und/oder das Auswaschen der Trigger-Lösungen erfolgt automatisch simultan für alle Röhrchen in einem Rack.

Die Arbeitsanweisungen für die Probenbehandlung, Messung und Auswertung können für 30 verschiedene Kits gespeichert werden. Die Auswertungsergebnisse werden direkt auf einem eingebauten Drucker ausgedruckt oder über die RS 232-Schnittstelle an einen zugeordneten Rechner oder ein Datennetz ausgegeben.

Lumico spart Platz im Labor. Der ganze Automat ist nur 70 cm breit, 60 cm tief und 45 cm hoch.

\* Die "Produktnachrichten" erscheinen außerhalb der Verantwortung der Redaktion. Redaktionelle Bearbeitung: Dr. med. M. Eckart, Frankfurter Straße 77, 63067 Offenbach.



Weitere Informationen:  
Zinsser Analytic, 60489 Frankfurt.

### UV/Vis/NIR-Spektroskopie mit Lichtleiterystemen

Physikalische oder chemische Meßdaten können einerseits aus der „Nähe“ durch eine direkte Messung oder andererseits aus der „Ferne“ mittels einer indirekten Messung (Probenentnahme und Messung im Labor o. ä.) erhalten werden.

Natürlich ist es sinnvoll, z. B. einen Temperaturfühler, der die Wärmelöschung eines Rührkesselreaktors überwachen soll, direkt an dem Kessel anzubringen. Ebenso würde niemand auf die Idee kommen, z. B. Drucksensoren, pH-Sonden, „Flow-Meter“, Leitfähigkeitssonden u. v. a. m., fernab vom Ort des Meßinteresses anzuordnen. Je näher sich die Meßsonde am Meßobjekt befindet (so scheint es zumindest), umso besser.

Heute besteht die Möglichkeit, eine UV/Vis/NIR-spektroskopische Messung durch den Einsatz von Lichtleiterfasern weit entfernt vom Spektrophotometer durchzuführen. Durch den Einsatz eines Multiplexers ist es sogar möglich, mit nur einem Spektrophotometer an verschiedenen, räumlich weit voneinander entfernten Positionen zu messen.

Die Firma Varian hat im Rahmen der Pittcon 1993 ein Lichtleiterzubehör für ihre Spektrophotometer Cary 4E (UV/Vis) und Cary 5E (UV/Vis/NIR) vorgestellt. Das System besteht aus einem 7-Kanal-Multiplexer, der wahlweise mit



UV/Vis, mit Vis/NIR oder mit gemischten Fasertypen ausgestattet werden kann. Zwischen den sieben Multiplexerkanälen kann softwaregesteuert gewechselt werden. Der Multiplexer entspricht dem weit verbreiteten SMA-905-Standard. Als Meßköpfe können Transmissions-, Reflexions-, Eintauchsonden, Lichtfaserdurchflusszellen u. v. a. m. benutzt werden.

Die Systemsoftware der Spektrophotometer bietet die Möglichkeit einer benutzergerechten Programmierung. Hierfür stehen neben einer seriellen RS232C-Schnittstelle vier analoge Ausgänge und acht digitale Ausgänge mit TTL-Pegel zur Verfügung. Die Meßdaten anderer externer Maßsonden können mittels acht analogen oder sechzehn digitalen Eingänge in den Programmablauf eingeschleift werden.

Weitere sinnvolle Einsatzmöglichkeiten dieses Lichtleiterzubehörs sind:

- Messungen unter sterilen Bedingungen
- Messungen bei hoher Temperatur und/oder Druck
- Messungen hochtoxischer oder radioaktiver Substanzen
- Messungen in einer „Glove-Box“
- Messungen von sehr kleinen Proben (Tropfen, Kristalle)
- Messungen sehr großer Proben (Windschutzscheiben, LCD-Displays)
- Messungen an einem XY-Positioniertisch
- Messungen der diffusen Reflexion, z. B. an menschlicher Haut
- Überprüfung der Qualität von eingehenden Rohstoffen, z. B. in Tankwagen

Das Spektrophotometer und der Multiplexer können auch über ein Modem oder ein serielles „Linkkabel“ von einem zweiten PC aus ferngesteuert werden. So kann ein Spektrophotometer z. B. von zwei Arbeitsgruppen genutzt werden.

Weitere Informationen von Varian GmbH, 64289 Darmstadt.

### Bibby Dunn Labortechnik

hat die Exklusiv-Vertriebsrechte für Deutschland von

- Bellco Glass (USA)
- Bio-Tek Instruments (USA)
- LH Fermentation (England)

übernommen und wird sowohl auf der diesjährigen „Medica“ als auch „BioTechnica“ einige Produkte zeigen.

Bellco Glass: Die Palette reicht über Produkte für die Zell- und Gewebekultur, die Molekularbiologie, den Routinebereich bis hin zur Forschung. Neben den bekannten modularen Roller-Systemen gibt es Schüttler (mit oder ohne Wasserbad), Rocker und Rührer, einen kleinen Hybridisierungsöfen, Glasartikel wie die bewährten Microcarrier Spinner Flasks und vieles mehr.

Bio-Tek Instruments: Je nach geplantem Einsatz stehen Reader für die Forschung oder die Routine zur Verfügung: ein UV-Modell für den erweiterten Wellenbereich, ein Ultra-Kinetics-Reader, auf Wunsch mit oder ohne temperierbare Inkubationskammer ausgestattet, ein manuelles Ein-Kanal-Photometer sowie ein

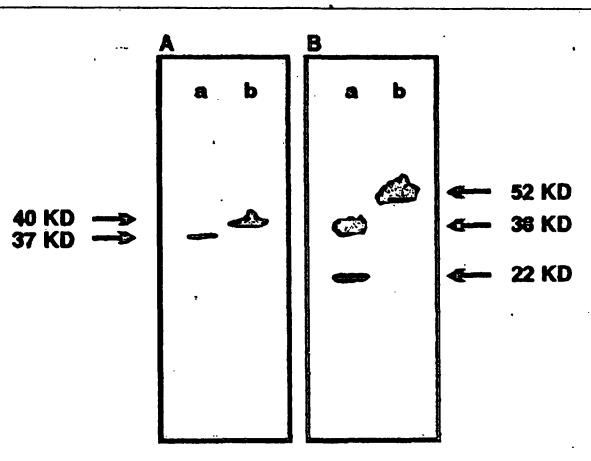


Abb. 3: Immunoblot des Cytokeratin Standardmaterial. A: Detektion durch Mab <CK19> M-Ks 19.1; B: Detektion durch Mab <CK8> M-a 4.1; a: nach Verdauung von Chymotrypsin; b: vor Verdauung von Chymotrypsin.

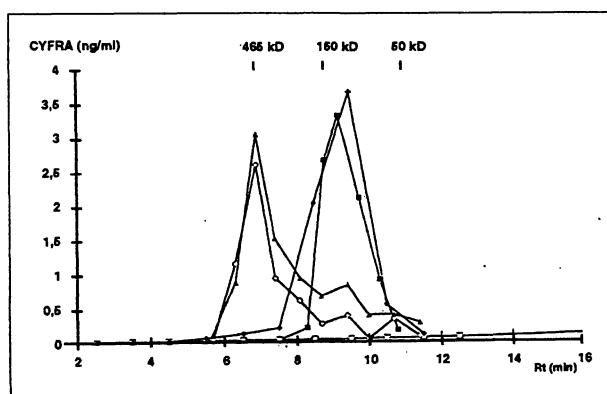


Abb. 4: Standardlösungen oder hochtitrige Humanseren wurden auf einer TSK 3000 FPLC Gelfiltrationssäule getrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden mit dem Enzymun-Test® CYFRA 21-1 auf ihren Gehalt an CK 19 Fragmenten überprüft. Tumorserum 1 (Verdünnung 1:10) (◆) und Tumorserum 2 (□) zeigen die Peaks bei  $100 \pm 10$  kD. Das Standardmaterial in Normalserum (◇) oder BSA (▲) zeigt die Peaks bei  $100 \pm 10$  kD und 450 kD. In Seren von Normalpersonen (○) konnte keine CYFRA 21-1 Aktivität entdeckt werden.

Der Immunoblot (Abb. 3) zeigt, daß nur ein Cytokeratin 19 Fragment in der Standardpräparation vorliegt, während bei Cytokeratin 8 zwei Banden auftreten.

#### Bestimmung der molekularen Größe von Kalibrator und Serumanalyt

Gelfiltrationsexperimente zeigen, daß sowohl der Kalibrator als auch die Serumanalyte als hochmolekulare Komponenten in Lösung vorliegen (Abb. 4). Dies impliziert, daß Heteropolymere von Cytokeratin 19 mit den korrespondierenden Typ II Cytokeratinen, z. B. Cytokeratin 8, auftreten.

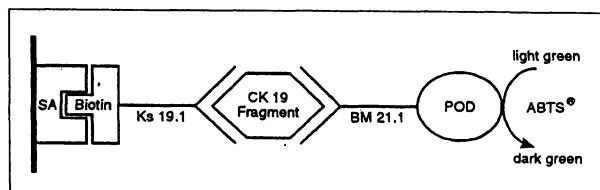


Abb. 5: Sandwichkomplex von Enzymun-Test® CYFRA 21-1.

Tab. 1: Präzision in der Serie

CYFRA 21-1 ng/ml	SD ng/ml	CV %
4,60	0,14	3,0
22,37	0,38	1,7
40,60	0,65	1,6

Tab. 2: Präzision von Serie zu Serie

CYFRA-21-1 ng/ml	SD ng/ml	CV %
4,52	0,11	2,4
21,81	0,62	2,8
44,04	2,10	4,8

#### Bestimmungsmethode

CYFRA 21-1 ist ein Zweistufen-Sandwichtest, dem die Streptavidin-Biotin-Technologie zugrunde liegt. Enzymun-Test® CYFRA 21-1 wird bei  $25^\circ\text{C}$  an den vollautomatisierten Systemen ES 300, ES 600 und ES 700 durchgeführt (Abb. 5):

1. Inkubation von  $35\text{ }\mu\text{l}$  Standard oder Probe und  $700\text{ }\mu\text{l}$  der Inkubationslösung zusammen mit dem biotinylierten Antikörper (Mab Ks 19.1) in Strepavidin beschichteten Polystyrolröhren für 30 min.
2. Waschschritt.
3. Zugabe von  $700\text{ }\mu\text{l}$  Inkubationslösung zusammen mit Detektorantikörper (Mab BM 19.21), 30 min Inkubation.
4. Waschschritt.
5. Zugabe von  $700\text{ }\mu\text{l}$  ABTS® Substratlösung und 60 min Inkubation.
6. Extinktionsbestimmung bei  $422\text{ nm}$  und Berechnung der CYFRA 21-1 Konzentration aus der Standardkurve.

#### Technische Erprobung.

##### A. Präzision

Die Präzision wurde am vollautomatischen Analysengerät ES 300 (Boehringer Mannheim GmbH) an drei nativen Humanseren überprüft. Der Präzision in der Serie lagen 20 Einzelbestimmungen zugrunde (Tabelle 1). Die Präzision von Serie zu Serie wurde aus 10 Einzelbestimmungen an verschiedenen Tagen errechnet (Tabelle 2).

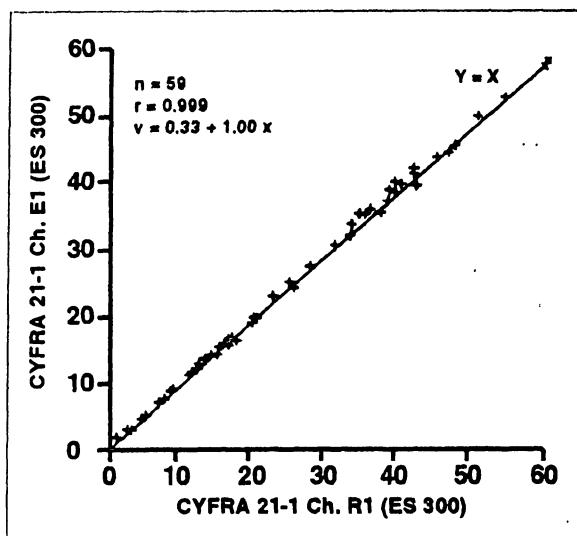


Abb. 6: Enzymun-Test® CYFRA 21-1: Vergleich von Charge R1 mit Charge E2 (ES 300).

#### B. Reproduzierbarkeit der Reagenzherstellung

Der Vergleich von zwei verschiedenen Chargen zeigt eine ausgezeichnete Reproduzierbarkeit der Reagenzien von Charge zu Charge (Abbildung 6).

#### C. Prüfung auf Störeinflüsse

Als Probenmaterialien können neben Serum EDTA-, Heparin- oder Zitratplasma eingesetzt werden.

Eine mögliche Störung durch heterophile Antikörper wird durch Zugabe von polymerisierten monoklonalem M-Ig M vermieden.

#### Schlußfolgerungen

CYFRA 21-1 ist ein neuer Serum-Tumormarker. Er erfaßt zirkulierende lösliche Fragmente von Cytokeratin 19, das zur Familie der Intermediärfilamente gehört.

Beide Antikörper, die im Test eingesetzt werden, reagieren ausschließlich mit Cytokeratin 19. Da sowohl die Biochemie, die Struktur als auch die Gewebeverteilung von Cytokeratin 19 im Detail bekannt sind, ist CYFRA 21-1 einer der wenigen exakt definierten Tumormarker.

Enzymun-Test® CYFRA 21-1 wurde an den vollautomatischen Analysatoren ES 300, ES 600 und ES 700 erprobt. Dabei wurde eine gute Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge, gute analytische Performance data und eine gute Handhabbarkeit bescheinigt, was die Verlässlichkeit des Testsystems unterstreicht.

#### Literatur:

1. Fuchs, E. (1988) Keratins as biochemical markers of epithelial differentiation, *TG* 4 (10), 277–281.
2. Broers, J. L. V. et al. (1988) Cytokeratins in different types of human lung cancer as monitored by chain-specific monoclonal antibodies, *Cancer Res.* 48, 3221–3229.
3. Bodenmüller, H. et al. (1992) Technical evaluation of a new tumor marker assay: The Enzymun-Test CYFRA 21-1; In R. Klapdor (ed.): *Tumor associated antigens, oncogen, receptors, cytokeratins in tumor diagnosis and therapy at the beginning of the 90s*, Zuckschwerdt-Verlag, pp. 137–138.
4. Achstättet, T. et al.: Separation of Cytokeratin Polypeptides by Gel Electrophoretic and Chromatographic Techniques and their Identification by Immunoblotting. *Methods in Enzymology* 134, 355–371.

#### Anschrift der Verfasser:

Dr. D. Banauch  
Dr. H. Bodenmüller  
Dr. B. Ofenloch-Hähnle  
Dr. D. Jaworek  
Dr. A. Dessauer  
Boehringer Mannheim GmbH  
Forschungszentrum Tutzing  
82327 Tutzing