

## 1. Einleitung

Krebs ist in der westlichen Welt neben kardiovaskulären Erkrankungen die häufigste Todesursache. Der Sammelbegriff Krebs umfasst das ungebremste Wachstum entarteter körpereigener Zellen im Organismus, das in allen Geweben entstehen kann. Der Begriff „Krebs“ wurde vermutlich durch den griechischen Arzt Hippokrates im 5. Jahrhundert v. Chr. eingeführt (Karkinos (griech.) = Krebs), der damit ein „nicht heilendes Geschwür“ bezeichnete und der durch sein übergreifendes Wachstum mit den Zangen eines Krebses verglichen wurde. Ansätze zur chirurgischen Behandlung waren in allen Zeitepochen vorhanden, die wesentlichen Voraussetzungen für eine frühzeitige Diagnostik und - zusätzlich zu einem chirurgischen Eingriff - weitere Behandlungsmöglichkeiten wurden jedoch erst im 20. Jahrhundert geschaffen.

Das ungebremste Gewebewachstum, mit dem Tumore in Erscheinung treten, wurde durch das Modell der „Mehrschritt-Tumorentstehung“ erklärt (Vogelstein and Kinzler, 1993). Auf dem Weg vom Normalgewebe zum bösartigen, wenig differenzierten und invasiv wachsenden Tumor werden verschiedene Änderungen der normalen zellulären Funktionen angehäuft, die unterschiedlichste Prozesse wie Zellproliferation, DNA-Reparatur, Chromosomenstabilität, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen, Angiogenese und auch Apoptose betreffen und auf die drei Stufen der Initiation, Promotion und Progression der Karzinogenese wirken. Im Vergleich zu der zellulären Regulation in Normalgeweben werden aktivierte Gene, die im ursächlichen Zusammenhang mit transformierenden Prozessen in Tumoren stehen, als Onkogene oder auf Grund ihrer supprimierenden Wirkung als Tumorsuppressorgene bezeichnet.

Für die meisten identifizierten Onko- oder Tumorsuppressorgene wurden genetische Änderungen wie Mutationen oder Deletionen identifiziert, die zu einem Verlust der Funktion oder auch zum Verlust der Expression führen. Die in vergleichenden Expressionsstudien von Genen des Normal- und Tumorgewebes beobachteten Expressionsunterschiede können ihre Ursache in diesen genetischen Änderungen, aber auch unabhängig davon haben (Sager, 1997). Neben Genen wie Rb und p53, die in einer Vielzahl von Tumoren ein Allel verloren haben und im anderen eine Mutation tragen (Zwei-Treffer-Hypothese, Knudson, 1971), wurde eine zweite Klasse von Genen identifiziert, deren Expressionsniveau in Tumoren herunter reguliert ist und supprimierend beispielweise auf Metastasenbildung wirkt, wie z. B. bei Maspin oder Connexin 26, ohne dass sie genetische Aberrationen aufweisen. Gene, die in den Tumoren im Vergleich zu den Normalgeweben herunterreguliert sind, werden durch den Verlust ihrer Funktion als potentielle Tumorsuppressorgene betrachtet (Zhang et al., 1998).

## 1.1 Epidemiologie und Diagnostik des Prostatakarzinoms

Nach Angaben der Deutschen Krebsgesellschaft ist der Prostatakrebs mit jährlich 29000 neuen Fällen und etwa 9000 Todesfällen der zweithäufigste Tumor des Mannes in Deutschland. In den USA ist das Prostatakarzinom der häufigste maligne Tumor des Mannes. Auf Grund eines hohen Anteils von latenten Tumoren ist das Prostatakarzinom wahrscheinlich der Tumor mit der höchsten Prävalenz, aber nur 20-30% aller Fälle sind klinisch manifest und behandlungsbedürftig. Als Risikofaktoren für Prostatakrebs gelten die ethnische Zugehörigkeit (30 mal höhere Inzidenz bei schwarzen Amerikanern als bei Japanern), eine zu fettreiche Ernährung, Vererbung sowie hormonelle Ursachen (Remmel, 1997a).

Die Prostata ist eine exokrine Drüse, die ein Sekret bildet und speichert und während der Ejakulation abgibt. Sie liegt am Blasengrund an und umgibt den Blasen Hals und einen Teil der Urethra. Die Prostata besteht aus 30-50 verzweigten Drüsen, deren 15-30 Ausführungsgänge in die Urethra münden. Die überwiegende Organmasse wird durch die Außendrüse gebildet, die die durch eine fibromuskuläre Zone abgegrenzte Innendrüse umschließt. Eine fibroelastische Kapsel umgibt die Prostata mit einer inneren Schicht aus glatten Muskelzellen (Remmel, 1997). Zu den häufigsten Formen der nicht malignen Aberrationen der Prostata gehört neben der Prostatitis die Benigne Prostatahyperplasie (BPH). Die BPH ist eine der häufigsten Erkrankungen beim Mann im höheren Lebensalter und etwa 75% der Männer in der Altersgruppe von 60-69 Jahren leiden unter den Folgen, die durch den Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren, insbesondere des Androgens, verursacht wird (Remmel, 1997).

Prostatakrebs ist hauptsächlich ein Tumor, der bei älteren Männern auftritt. Der Median der Diagnose liegt bei 72 Jahren und viele der Patienten mit lokalisierten Tumoren sterben an anderen Krankheiten, ohne Probleme mit ihrem Tumor zu haben. Die Wachstumsrate des Tumors variiert von sehr langsam bis zu einem moderaten Wachstum. Die Überlebensrate der Prostata-Tumor-Patienten hängt vom Ausmaß des Tumors ab. Wenn der Tumor auf die Prostata-Drüse reduziert ist, geht die mittlere Überlebensrate über 5 Jahre hinaus. Bei lokal fortgeschrittenen Tumoren stirbt eine signifikante Zahl der Patienten an ihrer Erkrankung, die durchschnittliche Überlebensrate kann trotzdem bei 5 Jahren liegen. Hat der Prostatakrebs sich auf entfernte Organe ausgebreitet, ist eine Therapie nicht mehr möglich und die durchschnittliche Überlebensrate sinkt auf 1-3 Jahre (Rübgen, 1997a). Weitere Faktoren für die Prognose und für den Einsatz therapeutischer Mittel zu dem histologischen Grad des Tumors sind das Patientenalter, zusätzliche Erkrankungen und der PSA-Wert.

Diagnostiziert wird das Prostatakarzinom bei nicht symptomatischen Patienten als latentes Prostatakarzinom im Rahmen einer Autopsie, als inzidenten Karzinom nach histologischer Aufarbeitung des Prostatagewebes oder als okkultes Prostatakarzinom nach Erscheinung von Metastasen (Mostofi et al., 1992). Die Bestimmung des PSA-Wertes ist für die Diagnostik klinischer Prostatakarzinome im Screening von Patienten in Vorsorgeuntersuchungen und von symptomatischen Patienten von hoher Bedeutung und wird durch weitere diagnostische Maßnahmen wie die transrektale Ultrasonographie (TURS) ergänzt. Das PSA (Prostate Specific Antigen) ist eine Glykoprotein-Serin-Protease, die in epithelialen Zellen der Prostata gebildet wird. Das Niveau der PSA Expression ist im Seminalplasma etwa 1000 mal höher als im Serum. Im Karzinomgewebe werden > 10mal höhere Serumwerte erreicht und ein hoher PSA-Wert signalisiert generell eine ungünstigere Prognose.

### 1.1.1 Molekulare Grundlagen des Prostatakarzinoms

Die Bildung von Prostatatumoren wird stark hormonell gesteuert (Huggins and Hodges, 1941), wie auch der Vergleich mit kastrierten Männern zeigt, bei denen dieser Tumor nicht bekannt ist. Der Großteil der Tumore besteht aus exokrinen Androgen-responsiven Zellen (Bonkhoff and Remberger, 1996). Die sekretorischen Drüsenepithelien exprimieren den Androgenrezeptor und werden androgenabhängig reguliert (Sar et al., 1990). In direkter Umgebung zu den sekretorischen Epithelien liegen in geschlossenen oder unterbrochenen Verbänden die Basalzellen, die androgenunabhängig sind und das proliferative Zellkompartiment in der normalen und hyperplastischen Prostata bilden. Einzelne Zellen aus der Basalzelllage exprimieren den Androgenrezeptor und differenzieren unter Androgeneinfluss in sekretorisch-luminale Zellen (Bonkhoff and Remberger, 1996). Zwischen den Drüsenepithelien liegen vereinzelt die neuroendokrinen Zellen. Das Prostatastroma besteht aus glatter Muskulatur und Bindegeweben mit kollagenen elastischen Fasern und umgibt die Drüsen.

Mehr als 95% der primären Prostatatumore sind Adenokarzinome und haben damit ihren Entstehungsursprung in Epithelzellen des drüsenbildenden Gewebes. Im Allgemeinen korreliert die Tumordifferenzierung und die Abnormalität des histologischen Bildes mit der Wahrscheinlichkeit von Metastasen und der Überlebensrate.

Epitheliale und drüsige Normabweichungen wie Atypie, Dysplasie, Carcinoma in situ werden unter dem Begriff prostatiche intraepitheliale Neoplasie (PIN) zusammengefasst und bezeichnen Bereiche von proliferierenden sekretorischen Zellen mit Kernanplasie. PINs werden als Vorstufe der Entwicklung des Prostatakarzinoms betrachtet, da sie häufig in verschiedenen Bereichen der Prostata mit den Tumoren kolokalisiert sind und chromosomale Aberrationen besitzen, die auch in frühen neoplastischen Transformationen beobachtet werden. Für die einzelnen Schritte der Progression konnten vielfach einzelne molekulare Mechanismen identifiziert werden, die zu einem Modell der Progression des Prostatakarzinoms führen (s. Abb. 1).

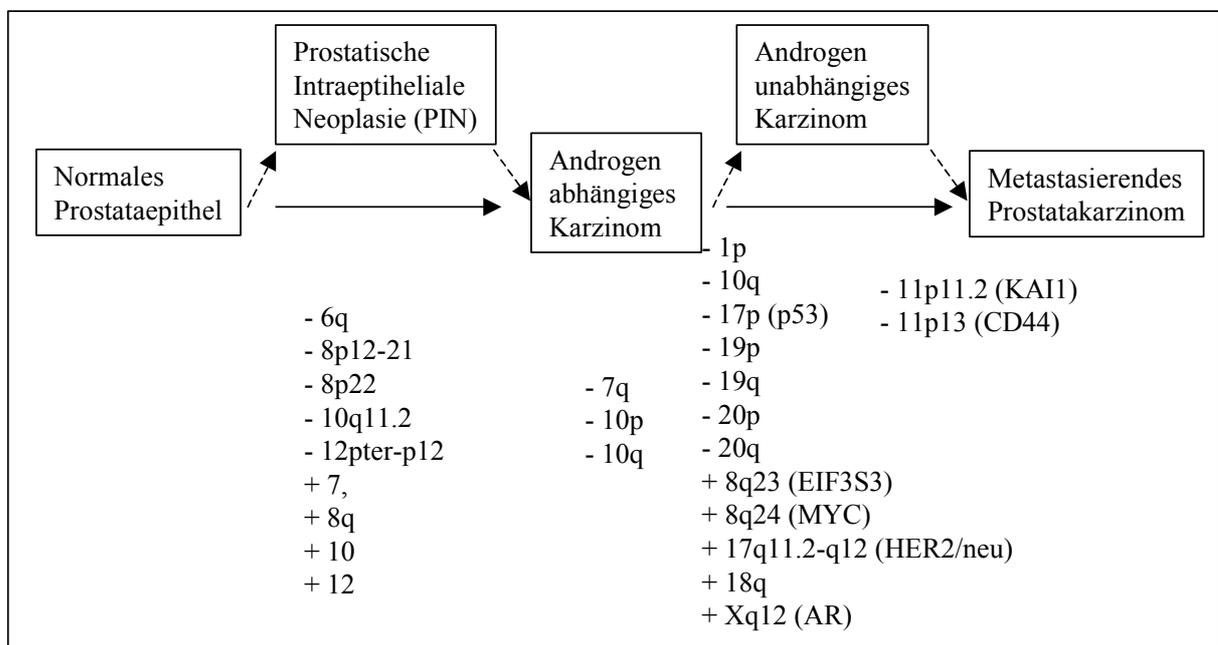


Abb. 1: Modell der molekularen Ursachen der Progression des Prostatakarzinoms. Für die jeweiligen Abschnitte der Tumorphysion sind die damit in Zusammenhang gebrachten chromosomalen Aberrationen (-Verlust, + Gewinn) dargestellt. Die in den Regionen identifizierten Gene mit einer Funktion im Prostatakarzinomen sind in Klammern angegeben.

In PINs und niedrig gradigen Prostatatumoren konnte unter anderem der Verlust von 6q, 8p12-21, 8p22, 12pter-p12, 10q11.2 sowie die Amplifikation der Chromosome 7, 8q, 10 und 12 beobachtet werden (De Marzo et al., 2001). Inwieweit jedoch alle Prostatakarzinome aus PINs hervorgehen oder vielleicht noch weitere Vorstufen bestehen, ist nicht bekannt. Der Verlust von Bereichen von Chromosom 7q, 10p und 10q korreliert mit einem höheren Stadium und einem schnelleren Progress des Tumors (Ittmann, 1996). Der Übergang vom Androgen-sensitiven Karzinom, das auf eine Hormontherapie anspricht, zu einem Androgen-insensitiven Karzinom, wird mit einem verstärkten Verlust chromosomaler Bereiche von 1p,

10q, 19p, 19q, 20p und 20q sowie einer Amplifikation von 8q, 18q und Xq in Verbindung gebracht (Nupponen and Visakorpi, 1999). In diesen chromosomalen Regionen konnten zum Teil Gene identifiziert werden, die die Tumorentwicklung beeinflussen, wie z. B. das c-myc Onkogen (8q24) und der Androgenrezeptor (Xq12) (Verma et al., 1999). Die Fähigkeit zur Metastasierung des Tumors geht sowohl vom Androgen-sensitiven, wie auch vom Androgen-insensitiven Prostatakarzinom aus. Für die Gene KAI1 und CD44 konnte ein Einfluss auf die Metastasierung der Tumore durch die Herunterregulation der Expression beobachtet werden (Dong et al., 1996; Gao et al., 1997)

Neben dem eigentlichen Wachstumsregulator der Prostata, dem Androgen, haben noch eine Reihe weiterer Wachstumsfaktoren wie „epidermal-growth-factor“ (EGF), „basic-fibroblastic-growth-factor“ (bFGF) und „transforming-growth-factor“ (TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ ) eine zum Teil stimulierende Funktion. In anderen Tumoren bekannte Onkogene wie ras, c-fos und ERBB spielen auch im Prostatakarzinom eine Rolle. So konnte die Expression des Her-2/neu mit einem Anstieg des Malignitätsgrades, schlechterer Prognose und Metastasierung in Verbindung gebracht werden (Morote et al., 1999). Das in Tumoren häufig inaktivierte Tumorsuppressorgen p53 ist in unbehandelten Prostatatumoren nur selten inaktiviert, zeigt aber in hormonunabhängigen Prostatatumoren häufige Veränderungen (Heidenberg et al., 1995). Der Transkriptionsfaktor KLF6 (Kruppel-like factor 6), der in der selten verlorenen Region 10p15 lokalisiert ist und regulierend auf viele zelluläre Prozesse wirkt, zeigte in LOH-Untersuchung von Prostatapatienten in etwa 77% der Fälle einen Allelverlust, von denen 71% der Fälle eine Mutation trugen. Funktionelle Untersuchungen konnten die Funktion des KLF6 als ein mögliches Tumorsuppressorgen bestätigen, da eine Reduzierung der Proliferation durch den Wildtyp, aber nicht mehr durch das mutierte Protein erfolgt (Narla et al., 2001). Die Beispiele zeigen eine Reihe von Genen, die an zentralen Positionen in verschiedenen Signaltransduktionswegen regulierend wirken und damit eine wichtige Rolle in der Karzinogenese spielen.

Die Nutzung der identifizierten Gene in einer korrigierenden Gentherapie zur Wiedereinführung von Tumorsuppressorgenen wie p53 (Eastham et al., 2000) oder zur Unterdrückung von negativen Effekten von Onkogenen wie c-myc (Steiner et al., 1998) zeigte in Tiermodellen zum Teil beachtliche Erfolge, führte jedoch in der Therapie des humanen Prostatakarzinoms bisher zu keinem erfolgreichem Therapeutikum (Harrington et al., 2001).

### 1.1.2 Histopathologische Klassifizierung und Behandlung von Prostatatumoren

Für die Behandlung und Prognose eines identifizierten Prostatakarzinoms ist die Klassifizierung notwendig. Die TNM-Klassifikation berücksichtigt die Ausbreitung des Primärtumors auf die Prostata und seine Infiltration, die Bildung regionärer Lymphknotenmetastasen, wie auch von Fernmetastasen (Hermanek et al., 1992).

Zur Klassifizierung des Differenzierungsgrads der Prostatatumore wird das Prostatagewebe an Hand von Kriterien bewertet, die Relevanz für die Prognose des Patienten haben können. Diese Kriterien beziehen sich auf die Drüsenform, -größe, -abstand, die Herdgrenze und Stromainvasion und nehmen bei abnehmender histologischer Differenzierung einen Punktwert zwischen 1 und 5 an. Auf Grund der in Prostatatumoren häufig vorliegenden unterschiedlichen Wachstumsmuster wird das Gradierungssystem in ein primäres (vorherrschendes) und ein sekundäres (weiteres) Muster unterteilt. Nach Addition der Punkte werden sie zu einem Gesamtwert zwischen 2 und 10 kondensiert, der ein Maß der Differenzierung und des Malignitätsgrades darstellt (Gleason, 1992). Ein hoher Gleasonwert steht für eine geringere Differenzierung und somit einen aggressiveren Tumor. Als hochgradige Tumore gelten Gleasonwerte von mehr als 7 während kleinere Gleasonwerte als niedrig gradig gelten.

Wichtig für die Bewertung nach radikaler Prostatektomie ist die Begutachtung des Resektionsrandes zur Beurteilung von möglichen Residualtumoren, die über die Prostata hinaus in umliegendes Gewebe gewachsen sind. Der Status von Residualtumoren (R0 kein Residualtumor, R1 Residualtumor) ist ein wichtiger Prognosefaktor für den weiteren Verlauf der Erkrankung.

Aktuelle Behandlungen des Prostatakarzinoms ermöglichen ein verlängertes erkrankungsfreies Überleben bei lokalisierten Tumoren, seltener bei ausgebreiteten Tumoren. Auch bei einem Teil der Patienten mit einem scheinbar klinisch lokalisiertem Tumor bilden sich streuende Tumore nach lokaler Therapie mit Bestrahlung oder Prostatektomie. Die Methode der Wahl für einen begrenzten lokalen Tumor bei Patienten mit guter gesundheitlicher Verfassung mit einem Alter von unter 70 Jahren ist die radikale Prostatektomie, die vollständige Herausnahme des Organs. Die 5-Jahre-Überlebensraten betragen etwa 80% und die 10-Jahre-Überlebensraten 70% (Zincke et al., 1994).

Bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen, die die Grenzen des Organs überschritten haben, wird vor einer geplanten radikalen Prostatektomie als neoadjuvante Therapie häufig die Behandlung mit Antiandrogenen eingesetzt. In Studien konnte gezeigt werden, dass der PSA-Wert deutlich abfällt und der Tumor bzw. die gesamte Prostata verkleinert wird (Fair et al., 1993; Soloway et al., 1993). Zu beachten ist beim Einsatz der neoadjuvanten Therapie, dass hormonresistenten Zellen verstärkt die Möglichkeit zum Wachstum und zur Metastasierung gegeben wird.

## 1.2 Überblick über das Harnblasenkarzinom

Als Urothelkarzinome werden aus Epithelien der ableitenden Harnwege hervorgehende Tumore bezeichnet, die sich vom Nierenbecken über die Harnleiter (Ureter) bis zur Harnblase erstrecken. Die Lokalisation von Urothelkarzinomen in den ableitenden Harnwegen korreliert mit der Urothel-Oberfläche, so dass die Harnblase mit etwa 93% der gesamten Urothel-Oberfläche auch etwa 92,5% der Urothelkarzinome hervorbringt. Etwa 95% der Tumore der ableitenden Harnwege gehen vom Urothel (Übergangsepithel) aus. Das Urothel besteht in der Regel aus drei Kernlagen und liegt auf einer Basalmembran auf (Rübben, 1997b).

Nach Angaben des Interdisziplinären Tumorzentrums Tübingen erkranken jährlich in der Bundesrepublik Deutschland 15.000 Menschen neu an Harnblasenkrebs. Die Wahrscheinlichkeit, einen Blasentumor zu bekommen, ist stark altersabhängig, für Männer viermal höher als für Frauen und für weiße Männer doppelt so hoch wie für Farbige. Einen weiteren, jedoch deutlich geringeren, Einfluss auf die Karzinogenese hat die Exposition von aromatischen Aminen und Nitrosaminen.

Das TCC (Transitional Cell Carcinoma) kann histopathologisch in zwei Gruppen unterteilt werden, die sich durch ihre unterschiedlichen Stadieneinteilung unterscheiden: oberflächliche papilläre Tumore und invasive Tumore (Knowles, 1999). Etwa 80-90% aller Blasentumore wachsen als oberflächliche papilläre Tumore mit einer Wiederkehrwahrscheinlichkeit von 60%, aber einer nur sehr geringen Progressionsrate zu invasiven Tumoren. Für die Entwicklung eines invasiven Tumors werden zwei verschiedene Modelle diskutiert: einerseits kann der oberflächlich papilläre Tumor progredieren, andererseits kann sich die invasive Form auch aus einem Karzinom in Situ (CIS) bilden (Gibas and Gibas, 1997).

Die Diagnostik von Harnblasentumoren beschränkt sich auf symptomatische Patienten, da für Screeningverfahren keine Marker zur Verfügung stehen. Neben einer klinischen Untersuchung werden Urinuntersuchungen und Zytologie wie auch Zytoskopie zur grundlegenden Diagnostik von Harnblasenkarzinomen eingesetzt. Bei gesicherten Karzinomen werden zur Ausbreitungsdiagnostik bildgebende Verfahren wie die Computertomographie, Kernspintomographie oder Abdomensonographie eingesetzt. Durch die Transurethrale Tumorsektion (TUR) wird die Möglichkeit zu einer genaueren histologische Klassifizierung gegeben und im Falle eines nicht invasiven Tumorstadiums dient sie zusätzlich als Therapie. Für die Behandlung der Tumore und eine Prognose ist die TNM-Klassifikation für die Bestimmung der Infiltrationstiefe von Bedeutung (Hermanek et al., 1992).

Eine Anzahl von genetischen Aberrationen wurde gefunden, die für TCCs typisch sind. In verschiedenen Studien wurde ein Verlust der Heterogenizität (Loss Of Heterozygosity, LOH) in 30 bis 60% der Fälle an 2p, 2q, 3p, 4p, 4q, 5q, 8p, 9p, 9q, 10q, 11p, 11q, 13q, 14q, 17p und 18q und Amplifikationen von 1q, 8q, 8q24, 11q13 und 17 gefunden (Rosin et al., 1995; Simon et al., 1998; Knowles et al., 1994). Die häufigste Veränderung, die in TCCs aller Stufen und Grade beobachtet wird, ist LOH auf Chromosom 9, so dass diese Veränderung als ein initialer Schritt bezeichnet wird (Baud et al., 1998). Ein potentielles Tumorsuppressorgen auf Chromosom 9p21 ist das p16 Gen, das mehr als 50% LOH in den umgebenden Positionen zeigt (Baud et al., 1998) und kleine homozygote Deletionen aufweist (Cairns et al., 1995). Auf dem 9q Arm wurden mehrere potentielle Tumorsuppressorgene isoliert (Simoneau et al., 1999; Shigyo et al., 1998).

Eine Region auf Chromosom 8p, die mit hohem Tumorgrad assoziiert ist und in der ein Tumorsuppressorgen vermutet wird, ist 8p22. Eine weitere Region mit LOH ist die Region von 8p11.2-12 (Takle and Knowles, 1996), in der das „secreted frizzled related protein 1“ (sFRP1) identifiziert wurde, das in Brusttumoren herunterreguliert ist (Zhou et al., 1998).

Es wurde gezeigt, dass hauptsächlich in hochgradigen und weit fortgeschrittenen TCCs die Region 17p des p53-Gens und 13q des Rb-Gens häufig von LOH betroffen sind (Miyamoto et al., 1996; Christensen et al., 1998). Die Häufigkeit von p53 Mutationen war um ein Vielfaches höher in CIS und muskelinvasiven Tumoren als in oberflächlichen papillären Tumoren (Spruck et al., 1994).

Ein Vergleich von nichtinvasiven und minimalinvasiven Tumoren führt zur Identifikation von chromosomalen Aberrationen im invasiven Typ, wie z. B. dem Verlust von 8p, die möglicherweise für die Progression des Tumors verantwortlich sind (Richter et al., 1997; Simon et al., 1998). Die Familie der Rho-Proteine spielt auf Grund ihrer Funktion vermutlich auch eine Rolle in Prozessen der Invasion und Migration von Harnblasentumoren (Schmitz et al., 2000). RhoA konnte in einer Reihe von verschiedenen Tumoren als überexprimiert identifiziert werden (Fritz et al., 1999), die Expression des Rho-Inhibitors RhoGDI2 konnte hingegen nur in der aggressiven stark metastasierenden Blasenzelllinie T24T und nicht in der Zelllinie T24 beobachtet werden (Seraj et al., 2000).

### 1.3 Wnt- und Ras-Signaltransduktionswege

Wie auch in Tumoren anderer Gewebe stellen Signaltransduktionswege häufig Ansatzpunkte für eine mögliche Therapie des Prostatakarzinoms dar. Die Wirkung des Androgens wurde beispielsweise durch Einsatz von Antiandrogenen wie z. B. Flutamid unterdrückt. Ähnlich wie die Antiandrogene führt der Einsatz von  $5\alpha$ -Reduktase Inhibitoren, die die Umwandlung des Testosterons in das effektive Androgen Dihydrotestosteron durch die  $5\alpha$ -Reduktase inhibieren, zu einer signifikanten Reduktion des Tumolvolumens, jedoch nicht zu einem Verschwinden des Tumors (Gormley, 1991).

Ein Signaltransduktionsweg mit zentraler Bedeutung in der Karzinogenese verschiedener Tumore ist der Wnt-Signalweg. Durch Bindung von Liganden der Wnt-Familie an die 7-Transmembranrezeptor-Familie der frizzled Gene wird eine Signalkaskade initiiert. Abb. 2 zeigt die damit initiierte Kaskade, die über eine Modulation der Stabilität des cytosolischen  $\beta$ -Catenin eine Aktivierung der Transkription der Zielgene einleitet. In Abwesenheit eines Wnt-Signals wird das cytosolische  $\beta$ -Catenin durch den Proteinkomplex, bestehend aus Axin, Adenomatous polyposis coli (APC), Proteinphosphatase 2A, Glykogen-Synthetase-Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) und  $\beta$ TrCP, aktiv phosphoryliert. Die Phosphorylierung führt zu einer kovalenten Bindung von Ubiquitin und einer daraus resultierenden Degradierung in den Proteosomen. Die Bindung von Wnt an den frizzled Rezeptor aktiviert das Dishevelled Protein, inhibiert die Aktivität der GSK3 $\beta$  und stabilisiert den cytosolischen  $\beta$ -Catenin Pool.  $\beta$ -Catenin ist dann in der Lage, in den Zellkern zu gelangen, bindet an Mitglieder von Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF1 Familie und führt zur Expression von wachstumsregulierenden Genen wie z. B. c-myc oder Cyclin D1 (Peifer and Polakis, 2000).

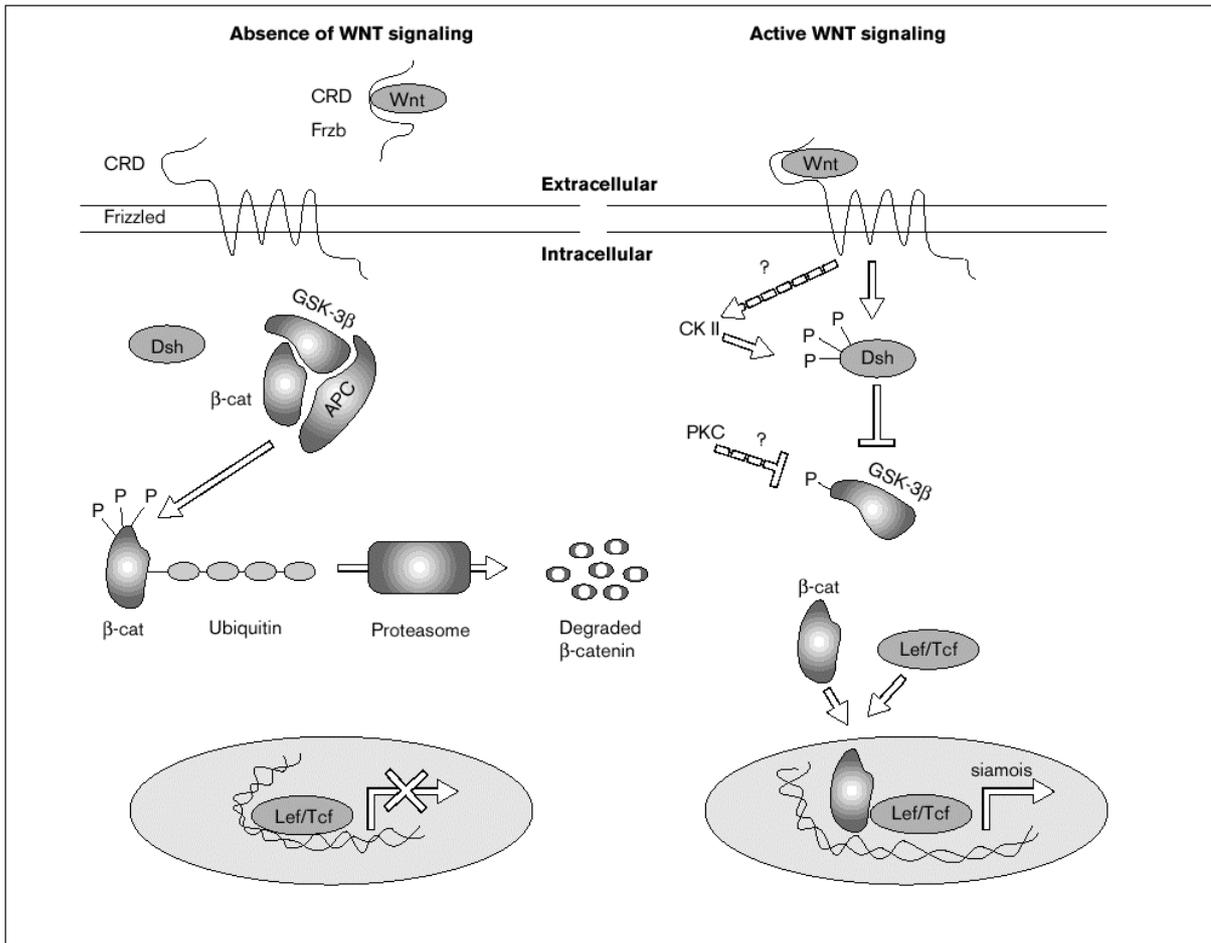


Abb. 2: Übersicht über den Wnt-Signaltransduktionsweg in Abwesenheit des Liganden und nach Bindung an den frizzled Rezeptor (aus Brown and Moon, 1998). Bindet das Wnt-Protein an den frizzled Rezeptor wird die Signalkaskade initiiert, die zur Transkription von Genen im Zellkern führt.

Der Einfluss einzelner Komponenten des Signalweges auf die Signalweiterleitung ist in vielen Tumoren durch eine Herunterregulation verändert, wie z. B. durch das  $\beta$ -Catenin (Kallakury et al., 2001) in der Prostata oder auch in der Blase (Zhu et al., 2000). Auf Grund des hierarchischen Aufbaus des Signalweges ist jedoch eine weitere Regulation an verschiedenen Stellen der Kaskade möglich, so dass Mitglieder des Signalweges im Weiteren noch näher betrachtet werden.

Ein weiterer Signaltransduktionsweg mit zentraler Bedeutung in der Karzinogenese zahlreicher Tumore ist der Ras-Signalweg. Die Superfamilie der Ras-Proteine spaltet sich in mehrere Unterfamilien auf, deren Mitgliedern allen gemeinsam ist, dass sie zwischen einem aktiven GTP-beladenen und einem inaktiven GDP-beladenen Zustand wechseln. Die Hydrolyse des GTP durch die intrinsische GTPase-Aktivität der Ras-Proteine wird durch GTPase-aktivierende-Proteine (GAP) beschleunigt, während der Austausch von GDP gegen GTP durch GTP-Austauschfaktoren (GEF) unterstützt wird.

In Tumoren der Bauchspeicheldrüse, des Darms und der Lunge liegt das Ras-Gen häufig in einer mutierten permanent aktiven Form vor und führt zu einer ständigen Aktivierung der Transkription von Zielgenen (Bos, 1989). Ein weiteres Onkogen, das über den Ras-Signalweg führt, ist das c-erbB-2, ein Tyrosin-Kinase-Rezeptor, der über einen Adaptor und den Ras GDP-GTP Austauschfaktor Sos aktivierend wirkt (Janes et al., 1994). Das NF1-Gen, das als GTPase aktivierendes Protein für p21-Ras wirkt, wurde als Tumorsuppressorgen durch Kopplungsanalysen von Patienten mit Neurofibromen gefunden (Cawthon et al., 1990). Eine Mutation des NF1 führt zu einer Erhöhung des Ras-GTP in den betreffenden Zellen, einer dadurch bewirkten Aktivierung des Signalweges und zu einer verstärkten Gentranskription. Die bisher zahlreichen bekannten Beispiele einer Einflussnahme von Mitgliedern des Ras-Signalweges oder seiner Unterfamilien, lässt weitere regulatorische Schlüsselpunkte für eine Beeinflussung der Onkogenese vermuten.

## **1.4 Auswahl von Methoden zur Bestimmung der differentiellen mRNA-Expression**

Die differentielle Expression von mRNA in Zellen verschiedenster Gewebe kann auf unterschiedliche Weise untersucht werden. Die Techniken unterscheiden sich hauptsächlich in ihrem Bedarf an RNA und in ihrer Möglichkeit, mehrere Gene oder Gewebe parallel zu betrachten.

### **1.4.1 Northern Hybridisierungen**

Die Auftrennung von RNA in Agarosegelen, der anschließende Transfer auf eine Zellulose- oder eine Nylonmembran und die Detektion mit einer radioaktiv markierten Sonde wird, in Analogie zu den Arbeiten von Edwin Southern mit dem Transfer genomischer DNA auf Membranen (Southern, 1975), Northern Hybridisierung genannt.

Das Verfahren ist in der Lage, neben der Stärke der gewebespezifischen Expression eines Gens durch die Gelauf trennung auch die Größe des Transkripts und der möglichen Spleißvarianten zu zeigen. Durch die schon langjährige Etablierung dieser Methode in vielen Laboren bieten verschiedene kommerzielle Anbieter gebrauchsfertige Membranen mit RNA extrahiert aus unterschiedlichen Geweben und Klassifikationen an und ermöglichen für Untersuchungen einen direkten Zugriff auf humane Gewebe. Auf Grund der hohen Auftragungsmengen von 2  $\mu\text{g}$  Poly-A<sup>+</sup>-RNA oder 20  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA können keine mikrodisszierten Zellen verwendet werden.

### 1.4.2 Quantitative-PCR

Die Nutzung der Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) geht auf Arbeiten aus der Mitte der 80er Jahre zurück und erlaubt die spezifische Amplifikation von DNA Fragmenten (Saiki et al., 1985). Durch Einsatz der thermostabilen DNA-abhängigen DNA Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA Polymerase) (Saiki et al., 1988) ist es möglich, einzelne Sequenzen spezifisch zu amplifizieren und das Produkt in der exponentiellen Phase der Reaktion zu quantifizieren.

Das unterschiedliche Expressionsniveau eines Gens in verschiedenen Geweben kann auf diese Weise durch die unterschiedliche Amplifikation der cDNA gezeigt werden. Die Verwendung der *Taq* DNA Polymerase setzt die Umwandlung der mRNA in cDNA durch eine RNA-abhängige DNA Polymerase (Reverse Transcriptase) voraus, die dann in der PCR amplifiziert werden kann.

Zur Detektion der PCR-Produkte in der exponentiellen Phase der Amplifikationsreaktion können interkalierende Reagenzien wie z. B. SYBR<sup>®</sup> Green (Applied Biosystems, Weiterstadt) genutzt werden, die bei Bindung an doppelsträngige DNA nach Anregung mit UV-Licht fluoreszieren und so in jedem PCR-Zyklus zur Quantifizierung genutzt werden können. Ein Nachteil des Verfahrens ist das Quantifizieren von spezifischen wie auch ebenso unspezifischen Produkten.

Eine andere Methode zur Detektion von spezifischen Amplifikationsprodukten ist die Nutzung der inhärenten 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq* DNA-Polymerase. Während der Amplifikation bildet die Anlagerung einer Sonde an die Zielsequenz ein Substrat, das von der 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq* DNA-Polymerase gespalten wird, wenn das Enzym von einem aufwärts gelegenen Primer die Sequenz bis zu der Sonde verlängert (Lee et al., 1993). Diese Abhängigkeit von der Hybridisierung der Sonde an die Zielsequenz ermöglicht eine Sondenspaltung nur, wenn die Zielsequenz amplifiziert wird. Die Detektion der Sondenspaltung wird durch eine fluorogene Markierung der Sonde ermöglicht. An die Sonde wird ein fluoreszierender Reporterfarbstoff und ein Quencherfarbstoff gekoppelt. Die räumliche Nähe der beiden Farbstoffe in der intakten Sonde ermöglicht über einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) eine Reduktion der Fluoreszenz. Eine Spaltung der Sonde erhöht die detektierbare Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes durch räumliche Trennung vom Quencher, bewirkt eine Loslösung von der Zielsequenz und erlaubt damit eine weitere Primerverlängerung. Mit jedem Zyklus der PCR steigt mit gebildetem Produkt die Fluoreszenz durch Spaltung weiterer Sondenmoleküle.

### 1.4.3 Hoch-Durchsatz Expressionsuntersuchungen durch Affymetrix Oligonukleotidchips

Die Untersuchung nicht nur eines Gens, sondern in einem parallelen Ansatz vieler verschiedener Sequenzen, wird durch unterschiedliche Verfahren ermöglicht. Die traditionelle Gen-für-Gen-Analyse ist nicht in der Lage den Zeitpunkt der Expression von Genen während der Entwicklung, den Einfluss von Krankheiten oder physiologischen Antworten auf die Änderung des Expressionsverhaltens einer Vielzahl von Genen zu beschreiben. Für einen solchen Anspruch ist eine globale Betrachtung von biologischen Prozessen mit einer simultanen Datenerhebung nach Möglichkeit aller Komponenten nötig. Nach ersten Versuchen von Edwin Southern zur Hybridisierung von markierten Nukleinsäuren, die mit ihren auf festen Oberflächen aufgetragenen komplementären Nukleinsäuren hybridisierten, war es nur noch ein kleiner Schritt zu Untersuchung von Filter-basierten Klonbibliotheken. Der Einsatz von Glas als festem Untergrund für die Hybridisierung erlaubte die Miniaturisierung und fluoreszenzbasierte Detektion. Dadurch war es möglich, auf einen Mikroskop-Objekträger bis zu 10.000 cDNAs aufzutragen und mit einer zweifach markierten Probe zu hybridisieren (Schena et al., 1995). Ein anderes Verfahren im Gegensatz zur Auftragung von cDNAs auf einen Objekträger bestand in der räumlich hoch aufgelösten Synthese von Oligonukleotiden auf einer Glasoberfläche. Dieses Verfahren erlaubt die Synthese von etwa 300.000 verschiedenen Oligonukleotiden auf einer Fläche von 1,28 x 1,28 cm (Fodor et al., 1991). Diese dicht gepackten Glasoberflächen werden auf Grund ihrer Produktionsverfahren, die vielfach aus der Halbleiterindustrie adaptiert wurden, als Chips oder auch „Genechips“ bezeichnet und durch die amerikanische Firma Affymetrix Inc. (Santa Clara, Kalifornien) hergestellt. Der Umgang mit diesen Chips wurde durch den Einsatz von zwei Schlüsseltechnologien ermöglicht. Die erste ist die Herstellung von hundertausenden Oligonukleotiden auf engem Raum in einer präzisen Lokalisation (Pease et al., 1994), die zweite ist die hochauflösende konfokale Laser-Fluoreszenz-Mikroskopie, die die Messung von molekularen Bindungen in den einzelnen Feldern der Oligonukleotide mit Kantenlängen von 24 µm ermöglicht (Fodor et al., 1993). Für die Synthese der Oligonukleotide wird die Festphasen-DNA-Synthese mit der Photolithographie verbunden. Auf die Glasoberfläche werden synthetische Verbindungsstücke gebunden, die mit photochemisch zu entfernenden Schutzgruppen modifiziert sind. Durch eine photolithographische Maske wird Licht zur photochemischen Entfernung von Schutzgruppen auf spezifisch lokalisierte Punkte der Oberfläche geleitet. Hydroxyl-geschützte Desoxynukleoside binden an die nicht mehr

geschützten, zuvor mit Licht bestrahlten, Positionen und bilden die Grundlage für weitere Syntheserunden mit neuen Masken. Die beschriebene Produktionsmethode bedarf aufwändiger Herstellungsverfahren, die eine gleichbleibend hohe Qualität durch den Hersteller gewährleisten.

Die von Affymetrix Inc. einsatzbereit hergestellten Chips werden mit Nukleinsäuren hybridisiert, die in einer in-vitro Transkription amplifiziert und mit Biotin markiert werden. An das Biotin wird anschließend ein Streptavidin-Phycoerythrin-Komplex gebunden, der in der Lage ist, nach Anregung durch Licht zu fluoreszieren.

Für die Synthese eines Chips werden nach Algorithmen von Affymetrix Inc. 20 verschiedene Oligonukleotide aus einer Sequenz in einer Länge von 25 Basenpaaren ausgewählt. Für jedes Oligonukleotid (PM = Perfect Match) wird zusätzlich ein mit einer Fehlpaarung in der Mitte gelegenes Oligonukleotid synthetisiert (MM = Mismatch). Die Fehlpaarung an der Position 13 ist jeweils die komplementäre Base zur perfekten Sequenz. Diese beiden Oligonukleotide bilden zusammen ein Probenpaar und werden vereinigt mit den anderen neunzehn Probenpaaren zu einem Probensatz (s. Abb. 3).

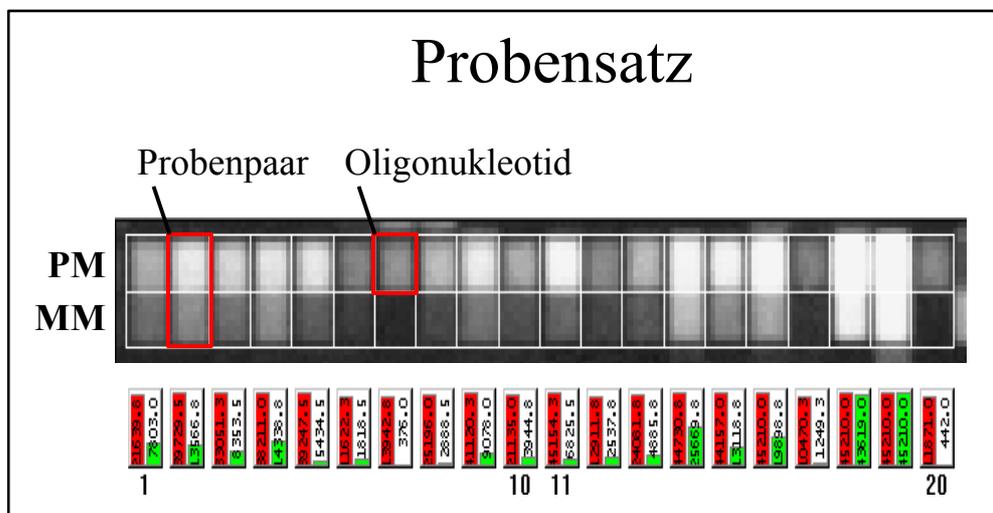


Abb. 3: Darstellung des gescannten Bildes eines Affymetrix Probensatzes mit seinen 20 perfekten und 20 fehlpaarigen Oligonukleotid-Feldern (PM = Perfect Match; MM = Mismatch). Die Balkendiagramme und die dazugehörigen Werte geben die gescannten Fluoreszenzintensitäten in rot für PM und in grün für MM wieder.

Nach Hybridisierung der markierten cRNA an die Oligonukleotide des Chips wird durch den Scanner nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 570 nm die Fluoreszenz gemessen. Für jedes der 24 µm x 24 µm großen Felder wird in einer Auflösung von 3 µm pro Pixel die Intensität bestimmt. Die Hybridisierung der repräsentativen mRNA des entsprechenden

Gewebes ermöglicht eine Messung der Expression mehrerer tausend Gene in einem Versuch. Unterschiede in der Expression von Genen können durch den Vergleich von Hybridisierungen verschiedener Gewebe, in Zeitreihen als physiologische Antwort auf Induktionen oder zwischen Normal- und Tumorgewebe bestimmt werden. Der Vergleich verschiedener Chips, die mit unterschiedlichen Proben hybridisiert wurden, ermöglicht die Identifikation von Genen, die mit einem wechselnden Phänotyp in Verbindung gebracht werden können.

#### 1.4.4 *In silico* Methoden

Der Einsatz bioinformatischer Methoden zur Auswahl von Genen wird durch stark wachsende Mengen von Sequenzinformationen durch das „Human Genome Project“ und weitere damit in Zusammenhang stehende Datenbanken immer weiter vorangetrieben (Sanseau, 2001). So können durch verschiedene Verfahren die Häufigkeiten einzelner Transkripte, in der Gesamtheit aller exprimierter Transkripte eines Gewebes, bestimmt werden. Der Einsatz der SAGE-Technik (Serial Analysis of Gene Expression) ermöglicht eine schnelle und relativ günstige Möglichkeit zur Ermittlung des Expressionsspektrums (Velculescu et al., 1995), hat jedoch den Nachteil einer hohen Ungenauigkeit durch die Sequenzierung kurzer Fragmente von 9-11 Basen, die eindeutig ein einzelnes Gen repräsentieren sollen.

Eine aufwändigere Methode, die durch die Verwendung deutlich längerer Sequenzen neben der Untersuchung bekannter Gene auch die Identifikation unbekannter Gene ermöglicht, ist die Sequenzierung von ESTs (Expressed Sequence Tag). Die Verwendung von öffentlich zugänglichen (dbEST, NCBI) und kommerziell angebotenen (Incyte Genomics, Palo Alto, USA) EST-Sequenzen führt zu einer repräsentativen Gesamtheit von EST-Sequenzen, die aus einer Anzahl unterschiedlicher Gewebelbibliotheken hervorgegangen sind. Werden die einzelnen ESTs entsprechend ihrer Ursprungsgewebe und nach Normal- und Tumorgewebe unterteilt, kann durch einen Sequenzabgleich mit dem Programm BLAST (Altschul et al., 1990) für jedes Gen die Zahl der homologen EST-Sequenzen der einzelnen Bibliotheken bestimmt werden. Dadurch ist es beispielsweise möglich, ein Gen zu identifizieren, das stärker in Prostatanormal- als in Prostatatumorgewebe exprimiert ist, auf Grund der höheren Anzahl von EST-Sequenzen des Gens in der Normal- als in der Tumorbibliothek.