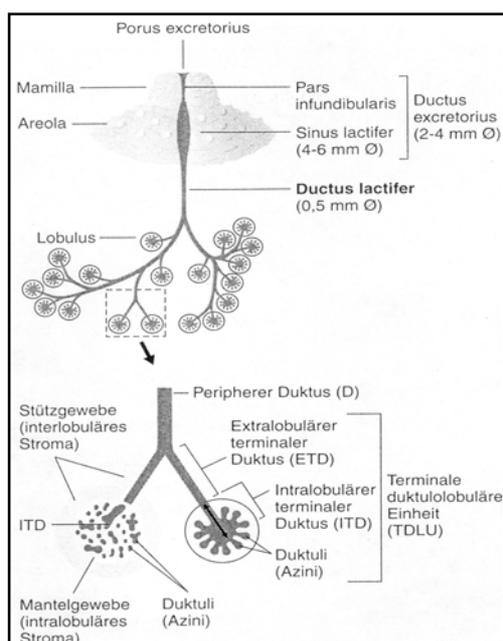


## 1. Einleitung

Der Oberbegriff Krebs oder Tumor umfasst das ungebremste Wachstum von entarteten, körpereigenen Zellen. Vermutlich wurde der Begriff bereits im 5. Jh. v. Chr. vom griechischen Arzt Hippokrates eingeführt (karkinos (griech.) = Krebs). Hiermit war ein „nicht heilendes Geschwür“ gemeint, das wegen seines Wachstums mit den Zangen eines Krebses verglichen wurde. Die weltweit häufigsten Krebsbedingten Todesursachen bei Frauen sind gynäkologische Karzinome, d.h. Mamma-Karzinome, Ovarial-Karzinome und Endometrium-Karzinome. Die amerikanische Krebsgesellschaft („American Cancer Society“, [www.cancer.org](http://www.cancer.org)) erwartete allein im Jahr 2003 mehr als 200.000 Brustkrebs-Neuerkrankungen in den USA. Für Deutschland lag die Zahl der erwarteten Brustkrebs-Neuerkrankungen für das Jahr 1998 bei ca. 50.000 Fällen, davon bereits 10% der Neuerkrankungen bei Frauen unter 45 Jahren (Schätzung des Robert-Koch-Institutes, [www.rki.de/KREBS](http://www.rki.de/KREBS)).

### 1.1. Epidemiologie des Mammakarzinoms

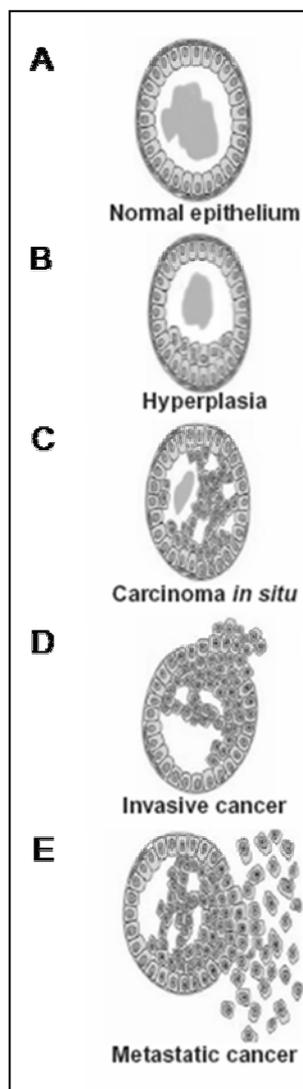
Das Ursprungsgewebe des Mammakarzinoms ist in den meisten Fällen das Epithel, das die Milchgänge der weiblichen Brustdrüse auskleidet. Die Epithelzellen unterliegen ständigem hormonellem Einfluss während des monatlichen Zyklus der Frau, in der Schwangerschaft und der Menopause. Dies ist eine Ursache für das häufige Auftreten von Mammakarzinomen bei Frauen im Vergleich zu der geringen Häufigkeit von Mammakarzinomen bei Männern.



Man unterscheidet im Brustgewebe die duktaalen Anteile (Ductus lactifer = Milchgang), die kleinere und größere Milchabführende Gänge (Duktuli) bilden und in die Mamilla (Brustwarze) münden, sowie die lobulären Anteile, die zusammen mit den terminalen Duktuli die Milchproduzierenden Strukturen (terminale duktulolobuläre Einheit) des Milchgangssystems darstellen. Die Epithelgewebe sind umgeben von stützendem Bindegewebe, dem inter- und intralobulären Stroma, das auch als Stütz- bzw. Mantelgewebe bezeichnet wird (Abb. 1).

Abb. 1: Aufbau der Brustdrüse und Terminologie

Im normalen Brustgewebe sind eine innere Schicht von luminalen Epithelzellen und eine äußere Schicht von Myoepithelzellen durch eine intakte Basalmembran vom umgebenden Bindegewebe getrennt (Abb. 2A). Im Brusttumorgewebe hingegen stehen die Tumorzellen in direktem Kontakt mit dem umgebenden Stroma. Die ursprüngliche Doppel-Schicht-Struktur ist aufgelöst und die Barriere aus Myoepithelzellen nur noch selten zu beobachten. Diese Strukturänderungen sind typisch für invasive Brustkarzinome, die ansonsten in ihrer klinischen und histologischen Erscheinung sehr heterogen sind (Abb. 2D).



Man unterscheidet zwei große Gruppen des Mammakarzinoms aufgrund ihres Ursprungsortes im Brustgewebe: das häufiger vorkommende invasiv-duktales Karzinom (IDC; 70-80% aller Brustkarzinome) und das seltenere invasiv-lobuläre Karzinom (ILC; 10-20% aller Brustkarzinome). Neben diesen Hauptgruppen des Mammakarzinoms gibt es zahlreiche seltenere Varianten, z.B. muzinöse oder medulläre Karzinome, die sich aufgrund ihrer Histologie von den duktalem und lobulären Karzinomen unterscheiden [DeVita *et al.*, 2001]. Etablierte prognostische Faktoren beim Mammakarzinom sind neben dem histologischen Tumortyp das Erkrankungsalter und der menopausale Status der Patientin. Der TNM-Status des Tumors, sowie der Östrogenrezeptor- (ER-) und Progesteronrezeptor- (PR-) Status sind weitere wichtige Anhaltspunkte für die Erstellung der Prognose. Der TNM-Status (UICC Klassifikation) beschreibt die Primärtumorgröße (pT 1-4), den Befall regionaler Lymphknoten (pN 0-3) und das Auftreten von Fern-Metastasen (pM) [Sobin, 2001; Wittekind *et al.*, 2002]. Die genannten Faktoren erlauben die Abschätzung der längerfristigen Prognose und bestimmen das therapeutische Vorgehen in Bezug auf die operative Therapie bzw. nachfolgende Chemo-, Strahlen- oder Hormontherapien.

Abb. 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Stadien der Progression von soliden Tumoren (verändert nach [Albertson *et al.*, 2003]). A: normales Epithel, B: benigne Läsion (Hyperplasie), C: *in situ* Karzinom, D: invasives Karzinom, E: metastasierendes Karzinom.

Die Entstehung und Progression des Mammakarzinoms wird heute durch eine Anhäufung genetischer Veränderungen erklärt. Frühe, meist nicht diagnostizierte Veränderungen sind benigne Läsionen im Epithel, so genannte Hyperplasien, die aufgrund einer erhöhten Proliferationsrate der Epithelzellen auffällig werden (Abb. 2B). Bisher ist nicht bekannt, ob es sich bei den benignen Läsionen um Vorstufen der malignen Veränderungen handelt. Die malignen *in situ* Karzinome werden hingegen als unmittelbare Vorstufe des malignen invasiven Mammakarzinoms gesehen (Abb. 2C). Das duktales *in situ* Karzinom (DCIS) konnte als Präkanzerose (Karzinom-Vorstufe) bei 30% der Patientinnen mit malignem Mammakarzinom diagnostiziert werden [Fonseca *et al.*, 1997]. Bei dem selteneren invasiven lobulären Karzinom konnte bisher nicht gezeigt werden, ob es aus dem lobulären *in situ* Karzinom (LCIS) oder *de novo* entsteht [Buerger *et al.*, 2000]. Eine weitere Eigenschaft der Progression des Tumors und ein wichtiger prognostischer Faktor ist die Metastasierung. Metastasierende Tumorzellen haben die Basalmembran durchdrungen (Abb. 2D), wandern aus dem Ursprungsorgan über das Blut- oder Lymphsystem in andere Organe und bilden dort Fernmetastasen (Abb. 2E). Tumorzellen mit diesen Eigenschaften exprimieren signifikant mehr Matrix-degradierende Enzyme (z.B. Metalloproteinasen oder Serinproteasen) als nicht-metastasierende Zellen [Ray und Stetler, 1994]. Das Auftreten von lokalen Metastasen in den axillären Lymphknoten und die Identifizierung von Fernmetastasen in anderen Organen weisen auf eine schlechtere Prognose hin.

## 1.2. Tumorgenese

Heute ist allgemein anerkannt, dass es eine genetische Basis für die Entstehung von Tumoren gibt. Die Tumorgenese wird als ein schrittweiser Prozess verstanden, bei dem Initiation, Promotion und Progression unterschieden werden können [Bishop, 1987; Weinberg, 1989]. Dennoch sind bisher nur wenige der beteiligten genetischen Faktoren identifiziert worden. Durch eine Folge von genetischen Veränderungen im Normalgewebe kommt es zur Tumorbildung. Die Zelle, die genetische Veränderungen erfährt, kann einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Zellen erlangen. Durch das vermehrte Wachstum entsteht eine vergrößerte Zielpopulation für weitere Mutationen. Die weitere Entwicklung kann, durch natürliche Selektion begünstigt, zur Entstehung eines malignen Tumors führen. Die genetischen Veränderungen können die unterschiedlichsten zellulären Prozesse wie Proliferation, DNA-Reparatur, Chromosomenstabilität, Zell-Zell-/Zell-Matrix-Interaktionen, Angiogenese sowie Apoptose betreffen.

Tumore können sowohl durch Aktivierung als auch durch Inaktivierung kritischer Gene verursacht werden, die an den zuvor genannten zellulären Prozessen beteiligt sind. Auf genetischer Ebene unterscheidet man bei der Tumorgenese drei Gruppen von Genen: Onkogene, Tumorsuppressorgene und Mutatorgene [Strachan und Read, 1996]. Die Onkogene fördern beispielsweise aktiv die Zellproliferation. Zu dieser Gruppe können Gene zählen, die für Proteinkinasen oder Transkriptionsfaktoren (z.B. c-Myc) kodieren. Die Gene dieser Gruppe werden als Protoonkogene bezeichnet, wenn sie noch nicht durch Mutationen verändert sind. Protoonkogene können durch Punktmutationen, aber auch durch Amplifikation oder Translokation zu Onkogenen werden.

Unter Tumorsuppressorgenen fasst man die Gene zusammen, die beispielsweise durch rezessive Mutationen mit Funktionsverlust an der Tumorgenese beteiligt sind. Die durch Tumorsuppressorgene kodierten Proteine sind häufig an der Regulation des Zell-Zyklus beteiligt (z.B. der bekannte Tumorsuppressor p53) oder sie steuern durch die Bindung an zelluläre Transkriptionsfaktoren deren Funktion (z.B. das Retinoblastom (RB)-Protein). Deletionen oder Punktmutationen können bei Tumorsuppressorgenen zum Funktionsverlust oder reduzierter Expression führen (Abb. 3A). Zunehmende Bedeutung wird der Regulation der Genexpression durch Methylierung zugesprochen; eine Promotor-Hypermethylierung kann zur Reduktion oder dem kompletten Ausfall der Expression von Tumorsuppressorgenen führen (Abb. 3C+D). Die Mechanismen, die an der Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen beteiligt sein können, sind in Abb. 3 zusammengefasst.

Neben Onkogenen und Tumorsuppressorgenen bilden die Mutatorgene eine dritte Gruppe von tumorrelevanten Genen; sie kontrollieren die korrekte Vervielfältigung der genetischen Information bei der Zellteilung. Mutatorgene werden häufig der Gruppe der Tumorsuppressorgene zugeordnet. Genetische Veränderungen in Mutatorgenen, die zu einem Ausfall der Reparaturmechanismen führen, können eine erhöhte Mutationsrate zur Folge haben („Mutator-Phänotyp“ bei Kolonkarzinomen). Die durchschnittlichen Mutationsraten des Menschen liegen zwischen  $10^{-5}$  und  $10^{-7}$  pro Gen und Generation [Strachan und Read, 1996]. Durch Beeinträchtigung der Genomstabilität wird die Zelle anfällig für weitere Veränderungen wie Doppelstrangbrüche und daraus resultierende chromosomale Veränderungen wie Translokationen.

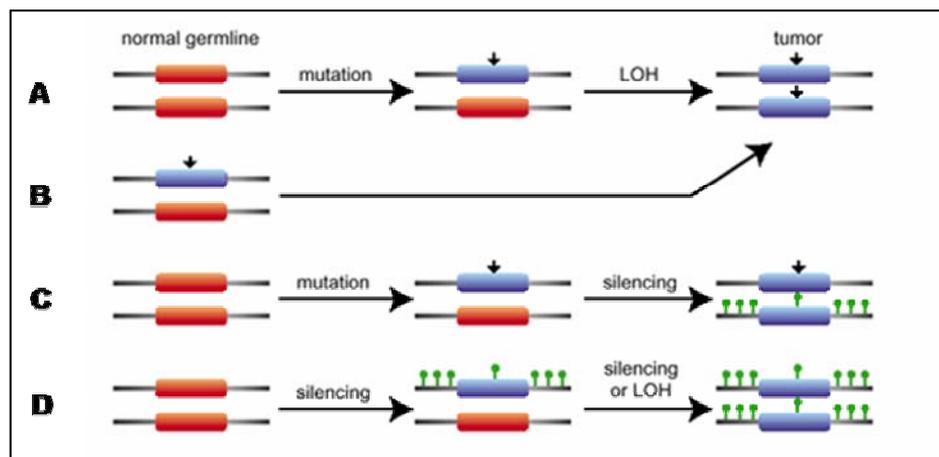


Abb. 3: Verlust der Tumorsuppressorgen-Funktion in der Tumorentstehung (verändert nach [Balmain *et al.*, 2003]). Nach dem klassischen „Two-hit“ Modell von Knudson [Knudson, 1971] führt ein initiales Mutationsereignis (senkrechter Pfeil) während der Tumorentstehung zur Gen-Inaktivierung auf einem Allel (blaue Rechtecke symbolisieren inaktivierte Gene). Diese Veränderungen betreffen nicht die Keimbahn („normal germline“), sondern somatische Zellen. Der Verlust der Heterozygotie (LoH) durch „non-disjunction“ während der Zellteilung, mitotische Rekombination oder eine Deletion bedingt die funktionelle Inaktivierung des zweiten Allels (A). Falls die erste Mutation durch die Keimbahn ererbt wurde, haben Individuen, die eine solche Mutation tragen oft eine Prädisposition für die Tumorentstehung (B). Statt durch LoH, wie in A dargestellt, kann die Inaktivierung des zweiten Allels nach einer initialen Mutation auch durch Promotor-Methylierung erfolgen (grüne senkrechte Striche, C). Ein weiterer Mechanismus ist die Gen-Inaktivierung („gene silencing“) beider Gen-Kopien durch biallelische Promotor-Methylierung ohne die Beteiligung von LoH oder Mutationen (D).

Wie in Abbildung 3B dargestellt, können genetische Veränderungen bereits in der Keimbahn vorhanden sein und somit vererbt werden. Aus einer derartigen Prädisposition entstandene Tumorerkrankungen werden unter dem Begriff „familiäre Karzinome“ zusammengefasst. Bei den Mammakarzinomen sind etwa 5% der Tumore erblich, d.h. familiären Ursprungs [Newman *et al.*, 1988]. Bei diesen Patientinnen wurden gehäuft Mutationen in den beiden Tumorsuppressorgenen *BRCA1* und *BRCA2* gefunden [Miki *et al.*, 1994; Wooster *et al.*, 1994; Blackwood und Weber, 1998]. Die Mehrheit der Brusttumore (90-95%) tritt jedoch nicht familiär sondern sporadisch auf und entsteht aus einer Vielzahl genetischer Veränderungen in somatischen Zellen, d.h. den Epithelzellen des Brustgewebes. Zu diesen Veränderungen zählen balancierte und unbalancierte Umlagerungen wie Translokationen, Inversionen, Duplikationen, Amplifikationen und Deletionen [Pandis *et al.*, 1995; Schröck *et al.*, 1996]. Die Analyse aberranter chromosomaler Regionen durch Methoden wie LoH („loss of heterozygosity“), CGH („comparative genome hybridization“) und Karyotypisierung (FISH = „fluorescence in situ hybridization“) stellen zusammen mit der positionalen Klonierung eine Strategie zur Identifizierung von tumorassoziierten Genen dar. Beim Mammakarzinom

zeigten LoH- und CGH-Studien eine Vielzahl struktureller Aberrationen auf verschiedenen Chromosomen. In den genomisch veränderten Regionen wurden Kandidatengene identifiziert, die in Brusttumoren eine verringerte Expression auf RNA- oder Proteinebene zeigten. Tumorsuppressorgene wie *TP53* zeigten neben dem Allelverlust außerdem Mutationen im zweiten Allel, die für einen Funktionsausfall des Gens und eine Beteiligung an der Tumorentwicklung sprechen [Valgardsdottir *et al.*, 1997]. Die verschiedenen Mechanismen, die zu einem Verlust der Tumorsuppressorgen-Funktion führen können, wurden bereits dargestellt (Abb. 3). In über 60% der Brustkarzinome wurden Amplifikationen von DNA-Abschnitten beschrieben [Courjal *et al.*, 1997; Hermsen *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1998]. In diesen amplifizierten Regionen liegen bekannte tumorassoziierte Gene wie *MYC*, *erbB2*, *cyclin D1*, *FGFR1* und *MDM2*. In den letzten Jahren konnte die Diagnostik und Therapie von Brustkrebs durch die Entdeckung und klinische Anwendung von diesen tumorrelevanten Genen entscheidend verbessert werden. Ein Beispiel hierfür ist das Onkogen *Her2neu/c-erbB2*. Es kodiert für einen Tyrosin-Kinase-Rezeptor [Shawver *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2003] und ist in ungefähr 30% der Brusttumore amplifiziert [Kallioniemi *et al.*, 1992]. Bei Tumoren, die eine *erbB2* Amplifikation aufweisen, hat sich ein Antikörper (Herceptin) gegen das Protein ERBB2 als effektiver Inhibitor in der Tumorthherapie erwiesen [Vogel *et al.*, 2001].

Im Folgenden soll kurz auf die Bedeutung von zwei chromosomalen Regionen (8p und 2q) für die Tumorgenese der Mamma-Karzinome eingegangen werden. Der kurze Arm von Chromosom 8 (8p) zeigt häufig LoH in Brusttumoren, aber auch in anderen soliden Tumoren wie Ovar-, Kolon- oder Lungentumoren. Der Verlust der Heterozygotie von 8p wurde als frühes Ereignis in der Brusttumorgenese beschrieben und trägt vermutlich zum invasiven Verhalten der Tumore bei [Yaremko *et al.*, 1995; Yaremko *et al.*, 1996]. Der Verlust von 8p scheint außerdem mit der De-Differenzierung von Mamma-Tumoren assoziiert zu sein und wurde wesentlich häufiger in hochgradigen Tumoren (G3) als G1-Tumoren beobachtet [Richard *et al.*, 2000]. Die Daten von Charafe-Jauffret *et al.* [Charafe-Jauffret *et al.*, 2002] deuten darauf hin, dass in dieser chromosomalen Region potentielle Tumorsuppressorgene lokalisiert sind. Die Region 2q35 ist im Zusammenhang mit Mammakarzinomen bisher selten beschrieben worden. Eine neue Studie von Narayan *et al.* [Narayan *et al.*, 2003] beschreibt die Assoziation von Deletionen im Bereich 2q35-q36.1 mit der Entstehung und Progression von Zervix-Karzinomen. Richard *et al.* [Richard *et al.*, 2000] zeigten, dass der Verlust von 2q35-q37 und 8p11-12 häufiger in ER-negativen als in ER-positiven Tumoren auftritt. Dies bedeutet möglicherweise, dass Gene in dieser Region prognostische Marker darstellen oder Bedeutung für die anti-hormonelle Therapie haben könnten. Bisher sind allerdings nur wenige

Tumorsuppressorgene, die in der Brust-Tumorgenese eine Rolle spielen, gut charakterisiert worden.

### 1.3. Identifizierung von Kandidatengen durch *in silico* Methoden

Die Auswahl von Genen für bestimmte Fragestellungen, z.B. der Suche nach neuen Zielmolekülen für Therapeutika in der Onkologie, wird durch die stark wachsende Menge an Sequenzdaten aus dem Humangenom-Projekt und damit in Zusammenhang stehenden Datenbanken zunehmend im ersten Schritt mit Hilfe von bioinformatischen Methoden durchgeführt [Sanseau, 2001]. Für die vorliegende Dissertation ermöglichte ein bei der Firma metaGen Pharmaceuticals GmbH entwickeltes *in silico* Verfahren die Analyse von EST-Datenbanken zur Identifizierung von differentiell exprimierten Genen (vgl. Abb. 4 [Schmitt *et al.*, 1999]). Als EST („expressed sequence tag“) werden kurze DNA-Sequenzen (~400bp) bezeichnet, die durch die Sequenzierung von cDNA-Klonen gewonnen wurden. Zur Zeit der Analyse standen ungefähr 4.000.000 humane ESTs aus öffentlichen (dbEST, NCBI) und kommerziellen (Incyte Genomics, Palo Alto, USA) Datenbanken zur Verfügung, die aus einer Anzahl unterschiedlicher Gewebelbibliotheken hervorgegangen sind. Im ersten Schritt der Analyse wurden redundante Datenbankeinträge entfernt. Die nicht-redundanten ESTs wurden als Startpunkte, so genannte „seeds“, benutzt und durch ein iteratives Such- und Assemblierungsprogramm (AUTEX) verlängert. Die aus überlappenden cDNA-Sequenzen entstandenen Sequenzen maximaler Länge („consensus sequence“) wurden gegen die Gesamtheit der ESTs abgeglichen. Die gefundenen Treffer wurden den Angaben ihrer Herkunftsbibliothek entsprechend nach ihrem Gewebeansprung und zusätzlich in Normal- und Tumorbibliotheken unterteilt. Die daraus resultierende Verteilung der EST-Sequenzen auf die Normal- und Tumorbibliotheken ergab, unter Berücksichtigung der jeweils unterschiedlichen Datenbankgrößen, einen Hinweis auf eine mögliche differentielle Expression des untersuchten Gens (elektronischer Northern, vgl. Abb. 4). Der Quotient der relativen Häufigkeiten aus den beiden EST-Pools (Normal und Tumor) stellt ein Maß für die differentielle Expression dar. Die Signifikanz der differentiellen Expression wurde über den Fisher-Test berechnet [Fisher, 1973]. Diese Methode wird auch als elektronische Northern-Blot-Analyse bezeichnet. Im letzten Schritt der Analyse wurden die mutmaßlichen Gene über Vergleiche mit Datenbanken, zum Beispiel mit dem Programm BLAST, charakterisiert [Altschul *et al.*, 1990]. Bei fehlender Homologie zu bekannten Genen wurde in der Sequenz nach Proteinmotiven/-domänen für eine mögliche Funktionszuweisung durch Vergleich mit der Proteinmotiv-Datenbank „Pfam“ gesucht. „Pfam“ ist eine Sammlung von multiplen

Sequenz-Alignments und „Hidden Markov Modellen“ (HMM [Krogh *et al.*, 1994]) und beinhaltet mehr als 2600 Proteindomänen-Familien, die in der überwiegenden Anzahl bekannter Proteine wieder zu finden sind [Bateman *et al.*, 1999; Bateman, 2002].

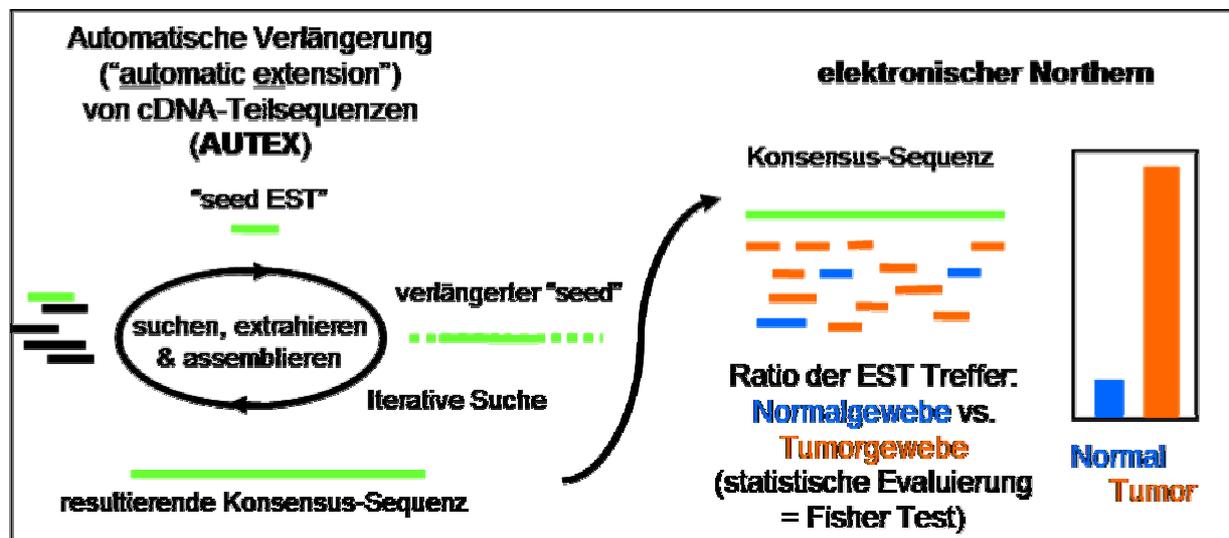


Abb. 4: Prinzip von AUTEX und elektronischem Northern (nach Schmitt *et al.*, 1999). Das bei der Firma metaGen Pharmaceuticals GmbH entwickelte *in silico* Verfahren ermöglicht die Identifizierung von differentiell exprimierten Genen, die potentielle Tumorsuppressor- bzw. Onkogene darstellen.

#### 1.4. Strategie zur Validierung von Kandidatengen

Die Auswertung der beschriebenen *in silico* Analysen ergab in den drei gynäkologischen Entitäten Brust, Ovar und Endometrium insgesamt 600 differentiell exprimierte Gene [Dahl *et al.*, 1999]. Für die weitere Validierung im Rahmen des BMBF-Projektes „*Genetische Basis Gynäkologischer Tumore – Molekulare Analyse und Validierung von 600 Kandidatengen, die mit sporadischen Tumoren von Brust, Eierstock und Endometrium assoziiert sind*“ wurden aus diesen 600 Genen 40 Kandidatengene ausgewählt und zur Bearbeitung in den beteiligten Projektgruppen aufgeteilt. Auswahlkriterien waren neben der differentiellen Expression im elektronischen Northern die chromosomale Lokalisation der Gene in Regionen, die mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht werden. Außerdem wurde die zelluläre Lokalisation (sezerniert, zytoplasmatisch, etc.) und die Funktion des Gens, so weit bekannt, bei der Auswahl berücksichtigt. Innerhalb des BMBF-Projektes wurde eine bestimmte Validierungsstrategie verfolgt. Die differentielle Expression der Kandidatengene sollte zunächst auf RNA-Ebene im Nass-Experiment bestätigt werden. Hierzu wurden zwei verschiedene Technologien eingesetzt (Northern Blot und quantitative PCR). Neben der Untersuchung der Genexpression ist der Verlust der Heterozygotie ein entscheidender Hinweis auf das Vorhandensein von potentiellen Tumorsuppressorgenen. Mit Hilfe der

Analyse von LoH-Frequenzen bei reduziert exprimierten Genen sollten genspezifische LoH-Daten gewonnen werden. Anschließende Mutations- oder Methylierungsanalysen von diesen potentiellen Tumorsuppressorgenen ermöglichen eine Aussage über die Mechanismen, die zum Expressionsverlust der Kandidatengene im Tumor führen. Potentielle Onkogene sollten auf Amplifikationen im Tumorgewebe getestet werden. Weitere Analysen auf Proteinebene und funktioneller Ebene sollten Aufschluss geben über die Tumorrelevanz der Kandidatengene. Zwei von den 40 ausgewählten Kandidatengenen wurden in der vorliegenden Dissertation, die Teil des oben genannten BMBF-Projektes war, bearbeitet. Die beiden Kandidatengene, *Tensin* und *SFRP1*, wurden nach dem beschriebenen *in silico* Verfahren als differentiell exprimiert identifiziert und die *in silico*-Ergebnisse durch weitere Methoden entsprechend der Validierungsstrategie wie oben beschrieben verifiziert. *Tensin* ist eine intrazelluläre Komponente der Fokalkontakte („focal adhesions“), die Zell-Matrix-Verbindungen darstellen und außerdem an Signaltransduktionsvorgängen beteiligt sind. *SFRP1* ist ein sezernierter Regulator des Wnt-Signalweges, der neben seinen Funktionen in der Embryonalentwicklung mit der Entstehung solider Tumore in Verbindung gebracht wird. In den folgenden Kapiteln werden die Grundlagen zu Zell-Matrix-Verbindungen, Fokalkontakten und dem Wnt-Signalweg erläutert und die bekannten Daten zu den beiden Kandidatengenen zusammengefasst.

### **1.5. Zell-Matrix-Verbindungen**

Die Architektur von Geweben wird sowohl durch Zell-Zell- als auch Zell-Matrix-Wechselwirkungen beeinflusst. Hierbei erfüllt die extrazelluläre Matrix verschiedene Aufgaben. Neben dem Zusammenhalt des Gewebes dient sie auch als Plattform für Moleküle, die an der Aktivierung von Signaltransduktionswegen beteiligt sind. An diesen Funktionen der Matrix sind Membrangebundene Zelladhäsionsmoleküle beteiligt, die direkt an bestimmte Matrixbestandteile oder an das Zytoskelett binden. Die Anheftung von Zellen an die angrenzende extrazelluläre Matrix (ECM) erfolgt durch Integrinabhängige Verbindungen, die Fokalkontakte. Fokalkontakte verbinden das Aktinzytoskelett mit den Fibronektinfasern der ECM. Die extrazelluläre Domäne des Integrins (Integrin- $\alpha$ /Integrin- $\beta$ ) bindet an Matrixproteine (Fibronectin), während die zytosolische Domäne mit Adapterproteinen Wechselwirkungen eingeht, die für die Anheftung an Aktin-Filamente benötigt werden. In Fokalkontakten findet man außerdem zahlreiche Proteine, die an der Signalübertragung, z.B. der adhäsionsabhängigen Aktivierung des Zellwachstums oder an der Zell-Motilität beteiligt sind. Der Aufbau der Fokalkontakte ist in Abb. 5 schematisch dargestellt.

Tensin ist intrazellulärer Bestandteil der Fokalkontakte. Über seine zahlreichen funktionellen Domänen kann Tensin an verschiedene Strukturproteine und Signalmoleküle binden. Tensin interagiert beispielsweise mit Aktin-Filamenten und ist an der Regulation der Zellmorphologie beteiligt [Lo *et al.*, 1994]. Die SRC-Kinase ist in der Lage Tensin zu phosphorylieren und über die SH2-Domäne von Tensin werden Protein-Protein-Interaktionen mit anderen phosphotyrosinhaltigen Proteinen ermöglicht, u.a. PI3-Kinase, CAS („CRK-associated substrate“) und FAK („focal adhesion kinase“) [Chen *et al.*, 2000]. Die Phosphotyrosin-bindende (PTB) Domäne von Tensin interagiert nicht mit tyrosin-phosphorylierten Proteinen, sondern ist verantwortlich für die Bindung an die zytoplasmatischen Enden von  $\beta$ -Integrin [Calderwood *et al.*, 2003]. Neben strukturellen Funktionen ist Tensin außerdem an Signaltransduktionsprozessen beteiligt. Die Aktivierung des JNK-Signalweges ist beispielsweise abhängig von der Adhäsion der Zelle an die ECM [Miyamoto *et al.*, 1995] und Tensin ist in der Lage JNK und p38 Signalwege direkt zu aktivieren [Katz *et al.*, 2000]. Diese Aktivierung ist möglicherweise unabhängig von FAK.

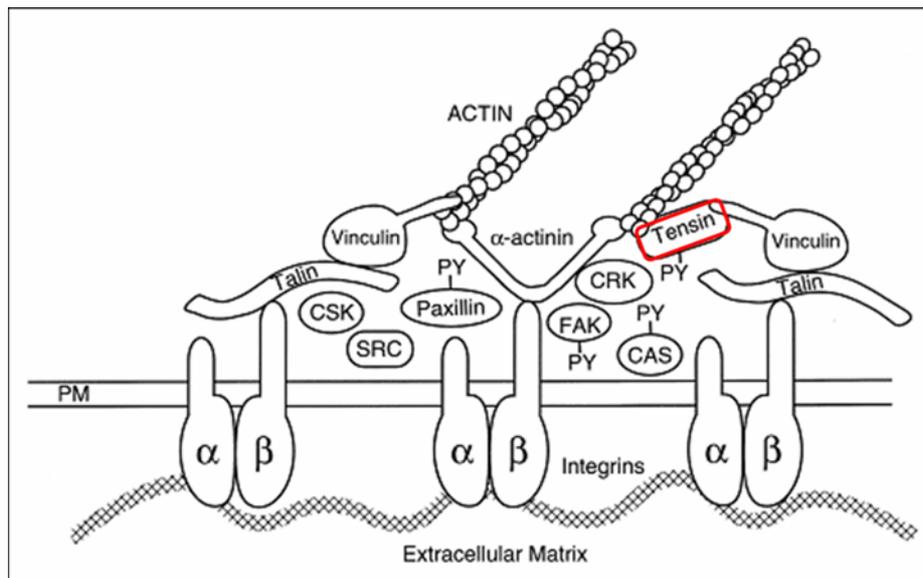


Abb. 5: Aufbau der Fokalkontakte (nach [Vuori, 1998]).  $\alpha$ ,  $\beta$  = Integrin  $\alpha\beta$ , CAS = CRK-associated substrate, CRK = Adapter-Protein, CSK = zytoplasmatische Tyrosinkinase, FAK = „focal adhesion kinase“, PM = Plasmamembran, PY = Phosphotyrosin, SRC = Homolog des Rous-Sarkoma Viral-Onkogens.

Die chromosomale Lokalisation von *Tensin* (2q35) wurde mit der Entstehung von Gliomen in Verbindung gebracht (*Progenetix* CGH online database [Baudis und Cleary, 2001]). In der Literatur gibt es zurzeit keine Hinweise auf einen Zusammenhang des *Tensin*-Gens mit der Entstehung von Brustkarzinomen. Die Analyse der *Tensin*-Expression in Zelllinien zeigte jedoch einen Verlust in allen Brust-Tumorzelllinien mit Ausnahme von MDA-MB-468 und

der aus einer benignen Veränderung gewonnenen Zelllinie MCF-10A [Chen *et al.*, 2000]. Diese Beobachtung stellt einen ersten Hinweis auf eine mögliche Bedeutung von *Tensin* in der frühen Tumorgenese dar. Funktionelle Untersuchungen zeigten eine Funktion von *Tensin* in der Regulation von Zell-Migration von Fibroblasten [Chen *et al.*, 2002; Chen und Lo, 2003]. Diese Funktion scheint vor allem über die Lokalisation an den Fokalkontakten und die Phosphotyrosin-Bindungsaktivität gesteuert zu werden.

Die Bedeutung von *Tensin* in der Embryonalentwicklung ist durch Experimente mit *Tensin*-knock-out Mäusen untersucht worden. Diese Experimente haben gezeigt, dass das Fehlen von *Tensin* keinen Einfluss auf die Embryonalentwicklung der Mäuse hat. Erst im adulten Tier wurden Nierenschädigungen und starke Zystenbildung in der Niere beobachtet [Lo *et al.*, 1997]. An den geschädigten Stellen waren die Zell-Matrix-Verbindungen unterbrochen und den Tubuli-Zellen fehlte die Polarität. Ishii und Lo [Ishii und Lo, 2001] konnten nachweisen, dass *Tensin* in knock-out Mäusen zwar keinen Einfluss auf die Muskelentwicklung (Myogenese) hat, allerdings zeigten die Experimente eine Bedeutung von *Tensin* für die Skelettmuskel-Regeneration.

## 1.6. Wnt-Signaltransduktionsweg

Es ist bekannt, dass Signaltransduktionswege, die in der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle spielen, häufig an der Tumorentwicklung beteiligt sind, wenn sie im adulten Organismus fehlerhaft aktiviert werden. Ein gut untersuchtes Beispiel hierfür ist der Wnt-Signaltransduktionsweg, ein wichtiger Signalweg in der Embryonalentwicklung mit zentraler Bedeutung in der Karzinogenese verschiedener Tumore [Smalley und Dale, 2001].

*Wnt*-Gene kodieren für eine Familie sezernierter, cysteinreicher Polypeptide. Diese Proteinfamilie ist in der Evolution stark konserviert und in Organismen von Nematoden bis zum Menschen zu finden. Die Hauptfunktion des Wnt-Signaltransduktionsweges liegt in der Steuerung der Morphogenese und der Zellproliferation. Außerdem ist dieser Signalweg an der Zell-Zell-Kommunikation und der Zelldifferenzierung beteiligt. Zentrale Bedeutung innerhalb dieses Signalweges hat die Regulation des zytosolischen  $\beta$ -Catenin-Spiegels und die Interaktion von  $\beta$ -Catenin mit Transkriptionsfaktoren [Giarre *et al.*, 1998; Eastman und Grosschedl, 1999]. Der Wnt-Signalweg und einige der beteiligten Proteine sind in Abb. 6 skizziert.

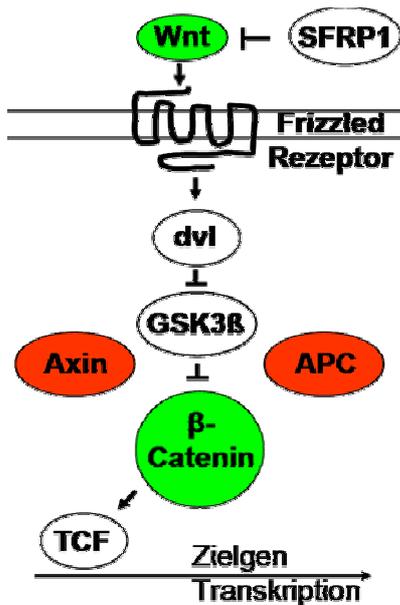


Abb. 6: Wnt-Signaltransduktion. Bekannte Onkogene sind grün gekennzeichnet; Tumorsuppressorgene sind rot markiert. Abkürzungen: APC = adenomatous polyposis coli Protein, dvl = Dishevelled, Frizzled Rezeptor = Transmembranrezeptor für Wnt-Liganden, GSK3 $\beta$  = Glycogensynthase-Kinase 3 $\beta$ , SFRP1 = secreted frizzled-related protein 1, TCF = T cell factor (Transkriptionsfaktoren), Wnt = Wingless (Ligand)

Die Wnt-Moleküle binden extrazellulär an Rezeptoren in der Zellmembran, die so genannten Frizzled-Rezeptoren [Bhanot *et al.*, 1996]. Diese Rezeptoren gehören zur Familie der 7-Transmembrandomänen- (7-TMS-) Rezeptoren [Wang *et al.*, 1996; Yang-Snyder *et al.*, 1996]. Die Signaltransduktion nach Liganden-Bindung erfolgt über die Rekrutierung oder Freisetzung von bisher noch nicht genauer charakterisierten, intrazellulären Signalmolekülen. Daraus resultiert die Aktivierung von Dishevelled (Dvl), einem zytoplasmatischen Protein. Dvl hemmt im aktiven Zustand die Glykogensynthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), eine zytoplasmatische Serin-/Threonin-Kinase. Diese Inhibition wird vermittelt durch frat, ein GSK3 $\beta$ -bindendes Protein [Li *et al.*, 1999a]. GSK3 $\beta$  kontrolliert, im Komplex mit APC und Axin, durch Phosphorylierung den zytosolischen  $\beta$ -Catenin-Spiegel [Hamada *et al.*, 1999]. Phosphoryliertes  $\beta$ -Catenin wird über den Ubiquitin-Weg abgebaut [Aberle *et al.*, 1997]. Bleibt die Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin durch GSK3 $\beta$  aus, kommt es zur Akkumulation von  $\beta$ -Catenin im Zytoplasma.  $\beta$ -Catenin dringt in den Zellkern ein und bindet an Transkriptionsfaktoren der LEF1/TCF-Familie. Dieser Komplex kann an LEF/TCF-Konsensus-Sequenzen in Promotor-Bereichen von Zielgenen binden. Offenbar wird durch die Komplexbildung eine Transkriptionsrepression durch LEF/TCF aufgehoben und LEF/TCF von einem Repressor in einen Aktivator umgewandelt [Eastman und Grosschedl, 1999]. Für eine maximale Genexpression scheinen allerdings weitere, noch nicht identifizierte Faktoren benötigt zu werden. Bekannte Zielgene des Wnt-Signaltransduktionsweges sind u.a. *c-myc* [He, 1998] und *cyclin D1* [Shtutman *et al.*, 1999; Tetsu und McCormick, 1999]. Diese Gene sind bekannte Onkogene. Der Wnt-Signalweg reguliert außerdem Tumorsuppressorgene, wie E-Cadherin, das an der Zell-Zell-Adhäsion beteiligt ist. Der Verlust von E-Cadherin wurde mit erhöhter Malignität von Tumoren und niedrigeren Überlebensraten in Verbindung

gebracht [Birchmeier und Behrens, 1994]. Die Regulation des Wnt-Signaltransduktionsweges erfolgt durch sezernierte Inhibitoren der Wnt-Moleküle. Zu diesen Regulatoren zählt die Familie der „secreted Frizzled-related proteins“ (SFRPs). Diese Proteine enthalten wie die Frizzled-Rezeptoren eine CRD-Domäne und können Wnt binden. Diese Bindung verhindert die Interaktion des Wnt-Liganden mit dem Frizzled-Rezeptor und somit die Weiterleitung des Signals.