

1. Einleitung

Das kolorektale Karzinom ist eines der häufigsten Karzinome der westlichen Welt [Greenlee et al. 2000]. Bösartige Neubildungen des Kolons und des Rektums sind die zweithäufigste Todesursache bei Krebserkrankungen in Deutschland für Männer nach dem Karzinom der Lunge. Bei Frauen steht das kolorektale Karzinom an dritter Stelle der tödlichen Krebserkrankungen nach den Karzinomen der Mamma und der Lunge [Krebsatlas Deutsches Krebsforschungszentrum 2005]. Das Vorkommen des kolorektalen Karzinoms hat sich seit 1950 verdoppelt und stabilisiert sich seit 1980 auf einem hohen Niveau. Die geschätzten Zahlen für die jährliche Inzidenz des Kolonkarzinoms in Deutschland betragen 14.000 Erkrankungen für Männer und 19.000 Erkrankungen für Frauen und die der rektalen Karzinome 8.800 für Männer und 8.700 für Frauen. Die Inzidenz verdoppelt sich bei über 40jährigen alle 10 Jahre.

Die Erfolgsaussichten der Therapie und damit auch einer möglichen Heilung hängen entscheidend von dem Stadium ab, in dem das kolorektale Karzinom erkannt wird. Der Tumor ist bei Erstsymptomatik häufig metastasiert. Dies ist ein wesentlicher Grund für die hohen Mortalitätsraten.

Eine systematische und von den Patienten angenommene Vorsorge ist nötig, um das kolorektale Karzinom in einem seiner frühen und für den Patienten asymptomatischen Stadien zu detektieren und zu behandeln.

Der grösste Anteil kolorektaler Karzinome entsteht durch eine Serie somatischer Mutationen [Goyette et al. 1992]. Die Krebsentstehung wird unter anderem durch die sogenannte „two-hit“-Hypothese veranschaulicht, die in den frühen 70er Jahren zum ersten mal insbesondere von Alfred J. Knudson Jr. von der Universität Texas diskutiert wurde [Knudson 1971, Molatore et al. 2004]. Ein Allel ist dabei in allen Zellen des Körpers mutiert („first hit“), eine somatische Mutation tritt im zweiten Allel des Zielorgans auf („second hit“) und führt dann zu entscheidenden Veränderungen in der Zelle. Weitere somatische Mutationen in Krebs-assoziierten Genen werden dann benötigt, um die Entstehung von Krebs zu ermöglichen.

Grundsätzlich unterscheidet man hereditäre von sporadischen Krebsformen. Zu den hereditären Krebsformen des kolorektalen Karzinoms zählt man zum Beispiel die familiäre adenomatöse Polyposis und das Lynch-Syndrom als hereditäres, nichtpolypöses Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC). Im weiteren existieren noch verschiedene hereditäre Sonderformen der Polyposis wie das Cronkhite-Canada-Syndrom, die familiäre juvenile Polyposis, das Peutz-Jeghers-Syndrom

und das Cowden-Syndrom. All diese Syndrome weisen charakteristischen Symptome und Genmutationen auf.

In den letzten 15 Jahren ist durch das Bekanntwerden dieser und weiterer genetischer Mutationen sowohl in sporadischen als auch in hereditären Karzinomen nun ein neues Modell der Tumorentstehung ausgearbeitet worden. Dieses Modell benutzt die sogenannte „Adenom-Karzinom-Sequenz“. Darunter versteht man die sequentielle und spezifische Akkumulation von genetischen Veränderungen in der Zelle, die morphologisch zu einer Veränderung vom Adenom in Richtung Karzinom führt [Fearon et al. 1990]. Das kolorektale Karzinom ist somit das Resultat eines mehrstufigen Prozesses. Dabei sind die aberrierenden Kryptofoci (ACF) die früheste Manifestation der kolorektalen Neoplasie.

Bei dieser Betrachtung der Neoplasien auf genetischer Ebene haben sich beim kolorektalen Karzinom nun zwei Typen der genetischen Instabilität als wichtige Komponenten dargestellt, nämlich der CIN und der MIN Phänotyp. CIN steht für chromosomale Instabilität. Diese Untergruppe macht ungefähr 85% aller kolorektalen Karzinome aus. Der CIN-Phänotyp beinhaltet numerische und strukturelle chromosomale Abnormalitäten und wird vor allem bei sporadischen kolorektalen Karzinomen beobachtet.

Der CIN-Phänotyp wird nicht beobachtet bei einem Teil der kolorektalen Karzinome (10-15%), so zum Beispiel in Tumoren vom sogenannten „hereditary non-polyposis colorectal cancer“-Typ (HNPCC). Diese Tumoren zeigen andere molekulare Veränderungen, nämlich die sogenannte Mikrosatelliten-Instabilität, auch MIN-Phänotyp abgekürzt [Ionov et al. 1993]. Der MIN-Phänotyp wird durch eine Verkürzung beziehungsweise Verlängerung von kurzen repetitiven DNA-Sequenzen, den sogenannten Mikrosatelliten, charakterisiert, die im Genom eingestreut vorkommen. Der MIN-Phänotyp entsteht als Folge einer Inaktivierung des DNA-Mismatch-Repair-Systems [Liu B. et al. 1995]. MIN und CIN sind aber nicht 100% voneinander zu trennen, da man chromosomale Veränderungen/CIN auch bei MIN-Fällen beobachten kann, die CIN scheint hierbei nicht so stark ausgeprägt zu sein.

Ein sehr geringer Anteil der kolorektalen Tumore zeigt den sogenannten CpG Island Methylator Phenotype, der auch CIMP abgekürzt wird [Grady et al. 2002]. Dieser Typ zeigt eine funktionelle Ausschaltung des nachfolgenden Gens durch eine Hypermethylierung CpG-reicher Regionen am 5´Ende von kodierenden Sequenzen.

Zur Zeit beschäftigen sich viele Untersuchungen mit sogenannten Biomarkern, welche die individuelle Prognose des Krebspatienten oder die Wirkung der spezifischen Tumorthérapien voraussagen können. Die klassischen Parameter zur Tumoreinteilung in Form des pTNM-

Stadiums und des Tumorgradings liefern nur unzureichende Aussagen über die individuelle Prognose des Patienten. Die postoperative adjuvante Chemotherapie verbessert die Prognose der Patienten in Stadium III (Dukes Stadium C) des Kolonkarzinoms und ist als Standardtherapie in diesem Stadium weitgehend etabliert [Galanis et al. 2000, Macdonald et al. 1999]. Auch Patienten im Stadium II des Kolonkarzinoms (Dukes Stadium B) besitzen ein erhöhtes Rezidivrisiko und erhalten teilweise eine adjuvante Therapie, ohne dass der Nutzen derselben im Einzelfall gesichert ist. Neue Marker, welche eine prognostische Aussage über den Krankheitsverlauf liefern können, werden dringend benötigt [Chung et al. 1998, Galanis et al. 2000, O'Connell 1992]. Neuere Studien mittels DNA-Expressionsprofilierung können aussagekräftigere Ergebnisse bezüglich der individuellen Patientenprognose mittels einer Einteilung in „gute“ und „schlechte“ Genexpressionsprofile liefern [van de Vijver MJ et al. 2003]. Die Erstellung solcher Profile, die für den einzelnen Tumor recht charakteristisch sind, werden auch als Signatur bezeichnet.

Wir haben mit dieser Arbeit versucht, eine Signatur auf Proteinebene zu erstellen.

Bei der Suche nach neuen Markern und Signaturen ergeben sich nun verschiedene Schwierigkeiten:

Ein Problem bei der Suche neuer Marker ist einmal die hohe Fallzahl, die benötigt wird, um repräsentative Ergebnisse bezüglich einer Tumorart zeigen zu können. Zum anderen müssen potentielle Ergebnisse in anderen Laboren reproduzierbar sein.

Im besonderen ist die Durchführung gross angelegter Studien mit einem hohen Arbeitsaufwand und einem besonderen Zeitaufwand durch die vielen zu bearbeiteten Einzelproben gegeben. Ein wichtiger Schritt in der zeitlichen und technischen Optimierung in dieser Hinsicht wurde in der Entwicklung der sogenannten Tissue Microarray Technik (TMA-Technik) gemacht [Kononen et al. 1998]. Mittels der TMA-Technik ist es möglich, bis zu 1000 Gewebeprobe unterschiedlicher Herkunft mit einem Durchmesser von 0,6 mm aus routinemässig archivierten Paraffinblöcken zu entnehmen und in einen Empfängerblock einzubringen. Zahlreiche Studien zeigen, dass trotz des geringen Durchmessers des Tumorgewebes noch ein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden kann, welches auch in Grossschnitten reproduziert werden kann. Die Vorteile der TMA-Technik liegen in der massiven Zeiteinsparung bei der Durchführung von immunhistochemischen Studien, in der drastischen Einsparung des Gewebebedarfs und einer deutlichen Vergrösserung der Zahl der pro Tumorkollektiv untersuchbaren Parameter. Mit dieser Technik lassen sich sowohl Veränderungen auf DNA-Ebene (Fluoreszenz in situ Hybridisierung, FISH), auf der Ebene der m-RNA mittels in situ Hybridisierung, als auch auf der Ebene der Proteine mittels

Immunhistologie in kürzester Zeit auch in grossen Tumorkollektiven bestimmen [Torhorst et al. 2001].

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem prognostischen Aussagewert und der Bedeutung einzelner Biomarker für das kolorektale Karzinom. Ein Kollektiv von 351 Proben, die sowohl Primärtumore, Metastasen sowie Normalgewebe enthielten, wurde mittels TMA-Technik immunhistochemisch auf die Expression spezifischer Tumormarker untersucht. Ausgewählt wurden Marker, die schon auf cDNA-Ebene eine differentielle Expression zu kolorektalem Normalgewebe aufwiesen und Marker, die aufgrund ihrer Rolle in bestimmten Signaltransduktionswegen eine Rolle in der Karzinogenese und Metastasierung des kolorektalen Karzinoms haben könnten. Folgende Marker wurden für die Untersuchungen ausgewählt:

ADAM 10, Cyclin D1, Annexin II, NFκB, Casein Kinase 2 beta, YB-1, P 32, RAD51, c-fos, IGFBP-4 und Connexin 26.

Die Ziele der Untersuchung waren wie folgt definiert :

- Bestimmung der Expressionsstärke der genannten Marker auf Proteinebene in einem grossen und gut charakterisierten Tumorkollektiv.
- Evaluation der Relevanz der einzelnen Marker in Bezug auf das Überleben der Patienten und Bestimmung der Korrelation der Expressionsstärke mit den klinisch-pathologischen Daten der Patienten.
- Durchführung einer hierarchischen Clusteranalyse der immunhistochemischen Daten zur möglichen Bildung von Subgruppen.

In den folgenden Seiten wird die Funktion dieser Proteine auch hinsichtlich Ihrer Funktion innerhalb der Tumorentstehung näher erläutert:

1.2 Beschreibung der untersuchten Proteine

1.2.1 ADAM 10

ADAMs enthalten eine **Desintegrin and Metalloproteinasedomäne** und sind Zelloberflächenrezeptoren. Ein typischer ADAM besteht aus einer Prodomain, einer Metalloprotease, Disintegrin-ähnlichen und Cystin-reichen Domänen [Cao et al. 2003]. Sie spielen eine wichtige Rolle in vielen biologischen Prozessen wie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen sowie Zelloberflächenproteolyse [Wolfsberg et al. 1995, Wolfsberg et al. 1996, Schlondorff et al. 1995]. ADAMs erfüllen weiterhin zahlreiche Funktionen, so zum Beispiel in der Tumorphathogenese [Emi et al. 1993, Yavari et al. 1998], der rheumatoiden Arthritis [Tortorella et al.1998], bei Morbus Alzheimer [Buxbaum et al. 1998] und Immunantworten [Kuno et al. 1997]. Weiterhin sind ADAMs an Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen wie Fertilisation, Myogenese [Peschon et al. 1998], Neurogenese [Rooke et al. 1996, Fambrough et al. 1996] sowie im Zellzyklus beteiligt [Qi et al. 1999]. Die chromosomale Lokalisation von ADAM 10 ist auf 15q22 [NCBI genesearch]. Interessanterweise geht eine *Helicobacter pylori*-Infektion des Magens mit einer erhöhten Expression von ADAM 10 einher. Ausserdem wurde eine erhöhte Expression von ADAM 10, 17 und 20 in Magenkarzinomen beobachtet [Yoshimura et al. 2002]. In kolorektalen Karzinomen wurde eine starke Expression von MMP-10/ADAM 10 beobachtet [Bodey et al. 2000], aber noch nicht mit den klinikopathologischen Parametern verglichen.

1.2.2. Annexin II

Annexin II ist ein Calcium-und Phospholipid-bindendes Protein und ein Substrat für Protein-Tyrosinkinasen. Annexin soll an der DNA-Synthese und Zellproliferation beteiligt sein [Vishwanata et al. 1993]. In einigen Krebszelllinien und Tumorgewebe findet man eine erhöhte Expression von Annexin II. Laut Emoto et al. besteht für das kolorektale Karzinom eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von Annexin II und dem histologischen Typ, der Tumorgrosse, der Infiltrationstiefe und dem pTNM-Stadium [Emoto et al. 2001]. Weiterhin korreliert die Annexin II Expression signifikant mit der Tenascin C Expression, einem weiteren prognostischen Marker. Laut Emoto et al. 2000 sind Annexin II und Tenascin C unabhängige Marker des kolorektalen Karzinoms, die prognostisch relevant in Bezug auf Metastasierung und Tumorprogression sein könnten. Eine Expression von Annexin II und Tenascin C ist laut Emoto

et al. mit einer schlechteren Prognose von Patienten mit einem kolorektalen Karzinom assoziiert. In einer anderen Arbeit wurde die Überexpression von Annexin II in fortgeschrittenen Magenkarzinomen festgestellt [Emoto et al. 2001]. Patienten mit einer Überexpression von Annexin II hatten eine signifikant schlechtere Prognose. Die chromosomale Lokalisation ist 15q21-q22 [NCBI genesearch].

1.2.3. CK2B

Protein Kinase 2, auch bekannt als Casein Kinase 2 beta, ist eine messenger-unabhängige Protein-Serin/Threoninkinase in eukaryontischen Zellen. CK2B phosphoryliert eine grosse Anzahl zytosolischer und nukleärer Substrate und ist somit direkt an DNA/RNA-Regulation, Proteinsynthese und -differenzierung beteiligt [Gapany et al. 1995]. Es existieren zahlreiche Argumente für eine Rolle von CK2B in Neoplasien, im Zellzyklus und bei viralen Infektionen [Meggio et al 2003]. CK2B spielt eine protektive Rolle beim Zelltod durch Apoptose [Yu et al. 2001]. CK2B ist am Mitosesignalling beteiligt [Lorenz et al. 1993]. CK2B phosphoryliert Schlüsselsignalmoleküle des WNT-Pathways und des transkriptionalen Cofaktors Beta-Catenin und reguliert somit basale NFκB-Level [Landesman-Bollag et al. 2001]. Viele Krebsarten beinhalten Fehlsteuerungen innerhalb des WNT-Pathways, einerseits durch ektope Expression von WNTs wie in Mammakarzinomen beobachtet, andererseits über Mutationen von Intermediärprodukten des WNT-Pathways wie Beta-Catenin, welche in Kolonkarzinomen und anderen Krebsarten beschrieben wurde. Eine Überexpression bestimmter WNTs, zum Beispiel WNT-1, führt zu einer gesteigerten Zelltransformation und -proliferation [Song et al. 2000]. Homma et al. vermuten, dass wachstumshemmende Effekte von APC über eine Inhibition von CK2B reguliert werden. Die chromosomale Lokalisation von CK2B ist 6p21.3 [NCBI genesearch]. In dieser Lokalisation liegen noch weitere Tumorgene wie z.B. pre-B-cell leucemia transcription factor.

1.2.4. Cyclin D1

Cyclin D1 gehört zu den Zellzyklusproteinen. Die Expression von Cyclin D1 findet gewöhnlich in der G1-Phase des Zellzyklus statt und wird bei vielen Zelltypen durch mitogene Faktoren verstärkt. Die Cycline D1, D2 und D3 bilden gemeinsam mit Cdk 4 beziehungsweise mit Cdk 6 enzymatisch aktive Kinasen. Wenn das Mitogen noch vor Überschreiten des Restriktionspunktes wieder entfernt wird, akkumulieren die Proteine p27 oder p16, die nach Bindung an die Cyclin D-abhängigen Kinasen die Aktivität inhibieren und damit den Zellzyklus in der G1-Phase arretieren [Lodish et al. 2001]. Cyclin D1 spielt eine Rolle in der Onkogenese und der Zellzykluskontrolle und wird als potentieller prognostischer Marker des kolorektalen Karzinoms angesehen [Maeda et al. 1997]. Cyclin D1 ist an der Zellzyklusregulation in der G1-Progression beteiligt [Han et al. 1999]. Eine Deregulation von Cyclin D1 findet man in zahlreichen Neoplasien, so z.B. in kleinzelligen Bronchialkarzinomen [Vonlanthen et al. 2000]. Bei Blasen Tumoren fanden sich eine höhere Cyclin D1 Expression bei Ta/T1 Tumorstadien und gut differenzierten Tumoren [Tut et al. 2001]. In Barrettkarzinomen des Ösophagus fand sich eine 3 bis 10-fache Überexpression des Cyclin D1 Genes bei einem Drittel der untersuchten Tumoren. Cyclin D1 wird hier ebenfalls eine mögliche Rolle in der Tumorentstehung des Adenokarzinoms und der malignen Transformation des intestinalen Epithels zugeschrieben [Arber et al. 1996]. Laut Maeda et al. korreliert die zytoplasmatische Expression von Cyclin D1 in kolorektalen Karzinomen signifikant mit der Prognose der Patienten [Maeda et al. 1997]. Cyclin D1 wird zusammen mit p21 eine Bedeutung in der Tumorentstehung zugeschrieben [Holland et al. 2001]. Eine erhöhte nukleäre Expression von Cyclin D1 findet sich in einem Drittel der von Arber et al. untersuchten Tumore zu einem frühen Zeitpunkt in der schrittweisen Progression kolorektaler Karzinome [Arber et al. 1996]. Mutationen des APC-Gens (Adenomatosis polyposis coli-Gens) spielen eine wichtige Rolle in der Initiationsphase der meisten sporadischen kolorektalen Karzinome [Wang et al. 2002]. Das APC-Gen ist in diesen oft mutiert bzw. in seiner Funktion verlorengegangen. Diese Veränderungen des Genoms führen zu einer nukleären Akkumulation von Beta-Catenin mit anschließender Aktivierung des Beta-Catenin/Tcf-4 Transkriptionsfaktorkomplexes. Das Protoonkogen Cyclin D1 ist zusammen mit c-myc, fra-1 und c-jun ein Zielgen des APC/Beta-Catenin/Tcf-4 Signaltransduktionsweges. Akkumuliertes Beta-Catenin transloziert in den Nukleolus und bildet einen stabilen Komplex mit Tcf-4. Dies kann sowohl auf Mutationen von APC als auch von Beta-Catenin zurückgeführt werden. Diese Veränderungen bewirken eine Aktivierung der oben genannten Zielgene [Wang et al. 2002]. Cyclin D1 interagiert mit einer bestimmten Untergruppe Cyclin-abhängiger Kinasen (Cdk4 und

Cdk6), welche wiederum durch ihre Aktivierung eine Phosphorylierung des Retinoblastom (Rb) Supressorgenes bewirken. Der chromosomale Locus von Cyclin D1 ist 11q13 [NCBI genesearch]. Interessanterweise wurde bei CGH-Untersuchungen (CGH steht für chromosomale genetische Hybridisierung) ein signifikanter Gewinn in Lebermetastasen auf Chromosom 11 detektiert, auf dem auch das kodierende Gen für Cyclin D1 (11q13, NCBI gensearch) lokalisiert ist [Knösel et al. 2003].

1.2.5. NFkB

Die NFkB (nuclear factor–kappa beta) Familie der eukaryontischen Transkriptionsfaktoren spielt eine wichtige Rolle in unterschiedlichen Bereichen wie Regulation der Immunantwort, Embryonal- und Zelllinienentwicklung, Apoptose, Zellzyklusprogression, Inflammation und Onkogenesis [Chen et al. 2001]. NFkB gehört zu den Elementen der Zelle, welche direkt an der Steuerung der Genexpression beteiligt sind. NFkB wird durch zahlreiche Stimuli aktiviert, so z.B. durch Zytokine, Mitogene, Umweltpartikel, toxische Metalle, virale und bakterielle Produkte. Die Aktivierung erfolgt hauptsächlich über I-kappa-B-Kinase-abhängige Phosphorylierung und nachfolgender Ausschaltung des Inhibitors. Aktiviertes NFkB transloziert in den Nukleolus und moduliert die Genexpression zahlreicher Gene wie die von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Akute-Phase-Proteinen, Zelladhäsionsmolekülen, anderen Transkriptionsfaktoren und zahlreichen Apoptoseregulatoren. Eine Aufdeckung der Zusammenhänge zwischen NFkB-Aktivierung und Zellwachstum hat grosse Bedeutung für die Behandlung zahlreicher Krankheiten, allen voran die Neoplasien und Autoimmunkrankheiten. Eine Aktivierung von NFkB hat Einfluss auf das Überleben der Krebszelle, eine konsekutive Aktivierung von NFkB wurde in verschiedenen soliden Tumoren beschrieben. Eine Suppression von NFkB bewirkt eine Abschwächung der Tumorkachexie im Tumormodell der Maus [Zhou et al. 2003]. NFkB ist ein Mediator der Effekte von Hypoxygenie und Reoxygenierung in Tumorzellen. NFkB ist zusammen mit Cyclin D1 ein nukleäres Ziel des WNT-Pathways [Song et al. 2000]. Eine nukleäre Überexpression von NFkB ist mit einer schlechteren Prognose des hochgradigen Ovarialkarzinoms assoziiert [Lee et al. 2001]. NFkB wird weiterhin als ein Faktor in der Chemoresistenz kolorektaler Karzinome diskutiert [Lind et al. 2001]. Der chromosomale Locus von NFkB befindet sich auf Chromosom 4q24 [NCBI genesearch].

1.2.6. IGFBP-4

Insulin-like Growth Factors (IGFs) und Insulin like Growth Factor binding Proteins (IGFBPs) spielen eine wichtige Rolle bei Zellwachstum und Differenzierungsprozessen. In epidemiologischen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen IGF- und IGFBP-Blutspiegeln und damit verbundenen Abnormitäten in der Proliferation und erhöhten Krebsrisiken festgestellt [Yu et al. 1999]. IGFBPs modulieren die IGF-II Funktion, welche fetales Wachstum und Entwicklung kontrollieren. Die IGFBPs 1-6 werden in unterschiedlicher Intensität in adrenalen Tumoren und Hyperplasien exprimiert. Der chromosomale Lokus für IGFBP-4 befindet sich auf 17q12-21.1 und ist nah am Gen für BRCA1 [NCBI genesearch].

1.2.7. C-fos

Das c-fos Protoonkogen fungiert auch als Transkriptionsfaktor und ist an Zellwachstum, Zelldifferenzierung und -entwicklung beteiligt. Fos, ein unmittelbar aktiviertes Gen, wird durch eine grosse Anzahl unterschiedlicher Stimuli induziert, so zum Beispiel durch Mitogene und pharmakologische Substanzen. Die c-fos Expression ist Teil einer allgemeinen transkriptionellen Antwort auf Wachstumsfaktoren. Die Transkription von c-myc und anderen Protoonkogenen stimuliert die c-fos Expression. Aberrierende Foci in den Krypten des Kolons sind die ersten feststellbaren Läsionen in der Entwicklung des kolorektalen Karzinoms. In diesen aberrierenden Kryptfoci werden unter anderem deutlich erhöhte Expressionslevel von c-fos festgestellt. Übereinstimmend mit Zellwachstumsfraktionen in Kolonkrypten exprimieren tiefer gelegene Anteile der Krypten mehr c-fos [Stopera et al. 1992]. Im Vergleich zu normalem Kolongewebe findet sich in grösseren adenomatösen Läsionen über 1cm Durchmesser eine erhöhte Expression der Protoonkogene ras, jun und fos [Magrisso et al. 1993]. Diese Veränderungen könnten eine Tumorprogression im Sinne der Adenom-Karzinom-Sequenz unterstützen. Der chromosomale Lokus von c-fos ist 1q22 [NCBI genesearch]. Bei CGH-Analysen von Leber- und Lymphknotenmetastasen des kolorektalen Karzinoms wurden häufig Gewinne auf Chromosom 1q beobachtet [Knösel et al. 2004].

1.2.8. RAD51

RAD51 katalysiert die Reparatur von Doppelstrangbrüchen in der DNA höherer Organismen. Die Expression erfolgt als direkte Antwort auf Doppelstrangbrüche in der DNA. Eine Überexpression von RAD51 ist besonders in transformierten Zellen sowie Krebszelllinien zu beobachten [Raderschall et al. 2000]. Aus diesem Grund könnte RAD51 eine Bedeutung für das Auftreten und die Progression von Neoplasien haben. Eine erhöhte Expression von RAD51 und erhöhte Zellzahlen mit nukleärem Rad51 Focus wurden in verschiedenen Tumoren beobachtet. Bei humanen Adenokarzinomen des Pankreas bewirkt eine Überexpression von RAD51 das verlängerte Überleben der Zelle nach Doppelstrangbrüchen [Maacke et al. 2000]. Bei duktalem Karzinomen der Mamma korreliert eine Überexpression von Wild-Typ RAD51 signifikant mit dem histologischen Grading [Maacke et al. 2000]. Eine konsekutive Überexpression könnte die Balance zwischen den einzelnen DNA-Reparaturkomponenten stören. Tumorsuppressoren wie p53 und BRCA 2 können direkt mit RAD51 interagieren und halten RAD51 vermutlich in einem inaktiven monomeren Stadium [Sturzbecher et al. 1996, Sharan et al. 1997]. Ein erhöhter Level von RAD51 könnte die Tumorzelle vor DNA-Schaden induzierter Apoptose schützen. Der chromosomale Locus ist 15q15.1 [NCBI genesearch].

1.2.9. YB-1

Transkriptionsfaktor Y-Box Bindungsprotein 1 (YB-1) ist an der Transkription zahlreicher Gene beteiligt sowie an Zellproliferation und Zellreparation. YB-1 gehört zu der Familie der DNA-bindenden Proteinen, die mit invertierten CCAAT Boxen interagiert. Viele humane Gene wie MHC II Antigene, PCNA, epidermale Wachstumsfaktoren, DNA Topoisomerase II alpha und MDR1 enthalten eine CCAAT Box in ihren regulatorischen Regionen. Eine nukleäre Überexpression von YB-1 ist mit einer schlechteren Prognose des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms assoziiert [Shibahara et al. 2001]. Die nukleäre YB-1 Expression korreliert signifikant mit Lymphknotenmetastasierung und Staging der von Shibahara et al. untersuchten Bronchialkarzinome. YB-1 befindet sich hauptsächlich im Zytoplasma, wird aber unter UV-Strahlung und Einfluss von Anti-Tumorregenzien in den Nukleolus transloziert. Eine Assoziation zwischen einer YB-1 Überexpression und Cisplatin-resistenten Krebszelllinien wurde beobachtet. YB-1 interagiert mit p53 und PCNA, was eine Funktion in der DNA-Reparatur nahe legt. Eine nukleäre Expression von YB-1 korreliert stark mit einer intrinsischen

Multidrug-Resistenz in Karzinomen der Mamma [Bargou et al. 1997]. Bargou et al. fanden ebenfalls eine erhöhte zytoplasmatische Expression von YB-1 bei Karzinomen der Mamma. In normalem, d.h. nicht karzinomatös entartetem Gewebe der Mamma fand sich keine Expression von YB-1 [Bargou et al. 1997]. YB-1 positive Karzinome sind mit einer schlechteren Prognose des Ovarialkarzinoms assoziiert [Kamura et al. 1999]. YB-1 ist ein wichtiger Marker in Bezug auf die Tumorprogression des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms [Shibahara et al. 2001]. Die chromosomale Lokalisation von YB-1 ist 1p36.12-1p32.1 [NCBI genesearch].

1.2.10. P32

P32 wird auch als complement component 1, q subcomponent binding protein bezeichnet. Der chromosomale Locus ist 17p13.3. Andere Bezeichnungen nach ihrer Funktion sind C1q globular domain-binding protein, hyaluronan-binding protein 1 und splicing factor SF2-associated protein [NCBI genesearch]. Es wird vermutet, dass P32 bzw. gC1qR in transientser Interaktion mit dem zytoplasmatischen Ende der Membran type-1 Matrix Metalloproteinase steht. Obwohl eine direkte funktionelle Interaktion bisher nicht geklärt ist, wird vermutet, dass diese Interaktion für die Präsentation der Matrixmetalloproteinase auf der Tumorzelloberfläche eine Rolle spielt [Rozanov et al. 2002]. Humanes P32 interagiert mit der B-Subunit des CCAAT-Bindungsfaktors, dem CBF/NF-Y Bindungskomplexes. P32 wird als spezifischer Corepressor der CBF vermittelten Transkriptionsaktivierung in vitro gesehen [Chattopadhyay et al. 2004]. Der CCAAT-Bindungsfaktor (CBF), auch Nuclear Factor Y (NF-Y) genannt, besteht aus 3 verschiedenen Untereinheiten, CBF-A, CBF-B und CBF-C, die zusammen einen DNA-Promoterkomplex bilden. Dieser enthält das CCAAT-Motiv. Mutationen im CCAAT-Motiv verhindern eine Bindung von CBF an diese, was zu einer Verminderung der Transkriptionsaktivität führt. Die CBF-Bindungsstelle ist eine häufig auftretende Sequenz bei Säugetieren. Sie findet sich sowohl bei Zellzyklus-regulierenden Promotoren, Stress-responsiven Promotoren im endoplasmatischen Retikulum und in gewebespezifischen Promotoren wie dem Major Histocompatibility Complex Class II und dem Typ 1 Kollagenpromotor [Maity et al. 1998, Mantovani et al. 1999]. P32 interagiert mit verschiedenen zellulären und viralen Proteinen, wie zum Beispiel dem Laminin B Rezeptor, HIV-1 Tat und Rev, EBNA-1 des Epstein-Barr-Virus, ORF P des Herpes-Simplex-Virus und dem Core-Protein V des Adenovirus [Matthews et al. 1998, Wang et al. 1997, Simos et al. 1994, Yu et al. 1995, Tange et al. 1996, Bruni et al. 1996]. P32 interagiert mit Hyaluronsäure [Gupta et al.1999] und agiert als Inhibitor des mRNA

splicing [Petersen-Mahrt et al. 1999]. P32 wird als Shuttle-Protein zwischen Mitochondrium und Nukleolus angesehen [Matthews et al. 1998].

1.2.11. Connexin 26

Connexine sind Transmembranproteine, die eine wichtige Rolle für die Zell-Zell-Interaktion spielen. Die interzelluläre Kommunikation findet hauptsächlich über die sogenannte „gap junctional intercellular communication“, auch GJIC, statt. Diese wird über die Connexine in Form von spezifisch aufgebauten Transmembranproteinen vermittelt. Ein Connexon einer Zelle verknüpft sich mit einem Connexon einer anliegenden Zelle und verbindet so das Zytoplasma beider Zellen [Duan et al. 2004]. Durch diese Interzellularbrücken können ganze Gewebeverbände miteinander kommunizieren. Über die Gap junctions findet ein Austausch von Ionen, Nukleotiden, Metaboliten und anderen kleinen Molekülen statt, bedeutsam ist auch der Austausch von second messenger-Molekülen [Kumar et al. 1996, Bruzzone et al. 1996]. Bisher wurden 20 verschiedene humane Connexine identifiziert [Willecke et al. 2002]. GJIC ist für die Homöostasis ebenso bedeutsam für Zellverlust oder Gewebeaufbau [Krutovskikh et al. 2002]. Bei der Entstehung und Entwicklung von Krebs besteht die gestörte Homöostase unter anderem aus der gestörten Funktion der Zelle, auf extrazelluläre Signale mit den „richtigen“ intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen zu reagieren. Die Dysregulation der Apoptose ist ein wichtiger Mechanismus bei der Entstehung von Karzinomen [Gryfe et al. 1997, Watson et al. 1999].

Connexine fungieren vermutlich als Tumorsuppressoren, in dem sie das Differenzierungspotential der Zelle mitbeeinflussen und vor allem die Gewebekomplexität aufrechterhalten [Locke et al. 1998, Hirschi et al. 1996, Mehta et al. 1999]. In normalem, d.h. nicht karzinomatös entartetem humanem Kolonepithel findet man eine Expression von Cx32 und Cx43 [Dubina et al. 2002]. Eine Connexin 26 Expression wurde sowohl in normalem als auch in karzinomatös entartetem Kolonepithel gefunden [Kanczuga-Koda et al. 2004, Kanczuga-Koda et al. 2005].

Die chromosomale Lokalisation von Connexin 26 ist 13q11-q12 [NCBI genesearch]. Kanczuga-Koda et al. fanden in einer anderen Arbeit in besser differenzierten kolorektalen Karzinomen eine höhere Expression von Connexin 26 als in schlechter differenzierten kolorektalen Karzinomen. In Synopsis mit diesen und anderen Ergebnissen ihrer Untersuchungen könnte Connexin 26 auch eine Rolle in Zellzyklus und Apoptose spielen. Es fand sich eine zytoplasmatische Lokalisation

von Connexin 26 in kolorektalen Karzinomzellen und eine Assoziation von Connexin 26 mit den Apoptosemarkern Bcl-xL und Bax [Kanczuga-Koda et al. 2005].