

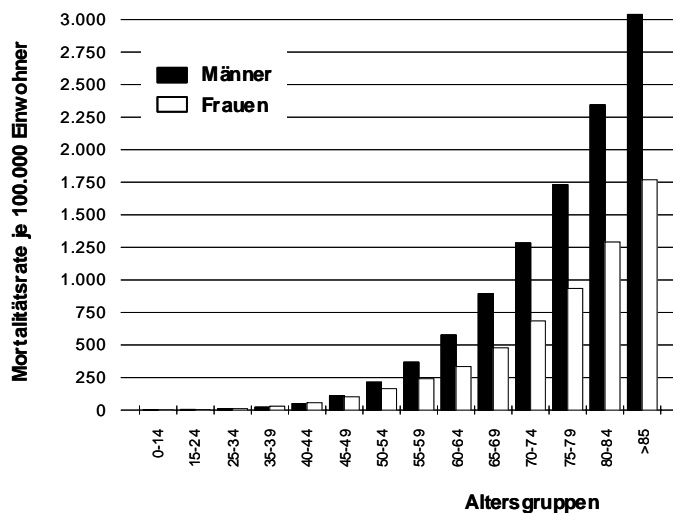
# **1. Einleitung**

## **1.1. Krebserkrankungen des Epithels – Karzinome**

Die Krebserkrankungen stellen eine Gruppe unterschiedlicher Erkrankungen dar, die aber alle durch die unkontrollierte Teilung von Zellen eines Organs oder Gewebes verursacht werden. Dadurch entsteht ein Tumor. Die bösartigen (malignen) Tumore zeichnen sich dadurch aus, dass sie sich der normalen Wachstumskontrolle des Organismus entzogen haben. Die veränderten Zellen vermehren sich ungehindert und wachsen in das umliegende Gewebe ein und zerstören es. Letztlich können sie in Blut- und Lymphgefäße eindringen und über diese in andere Körperorgane gelangen. Dort haben die Zellen dieser so genannten soliden Tumoren die Möglichkeit, sich erneut anzusiedeln und zu vermehren. Es entstehen Metastasen. Im Gegensatz zu den bösartigen Tumoren zeichnen sich die gutartigen (benigen) Tumore dadurch aus, dass sie nicht invasiv in das umliegende Gewebe einwachsen, sondern es nur verdrängen und keine Metastasen bilden. Ferner ist das erneute Auftreten der Erkrankung (Rezidiv) nach der Behandlung bei einem gutartigen Tumor seltener als bei einem bösartigen Tumor.

Nach den aktuellen Angaben der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) und dem Robert-Koch-Institut (RKI) erkranken knapp 220.000 Männer und 207.000 Frauen in der Bundesrepublik Deutschland an den bösartigen Neubildungen. Da die Neubildungen von Körpergeweben (Neoplasmen) besonders mit dem zunehmenden Alter auftreten, werden statistischen Angaben zu Neuerkrankungen (Inzidenz) und Sterblichkeit (Mortalität) häufig altersabhängig gemacht (Abb. 1). Insgesamt stellen die Tumorerkrankungen mit knapp 26 % aller Todesfälle die zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislauferkrankungen (45 %) in Deutschland dar (Statistisches Bundesamt, 2007). Unter ihnen machen die Karzinome mit etwa 80 % aller bösartigen Tumore einen Großteil der Krebserkrankungen aus. Karzinome sind Krebserkrankungen, die von den Epithelzellen im Deckgewebe der Haut oder Schleimhaut ausgehen. Je nach der Art des entarteten Epithels ergeben sich weitere Differenzierungen. Die meisten Karzinomerkrankungen leiten sich vom Plattenepithel (Plattenepithelkarzinom bzw. squamöses Karzinom) oder Drüsenepithel (Adenokarzinom) ab. Das überwiegende Auftreten von Krebserkrankungen des Epithels wird darauf zurückgeführt, dass die epithelialen Gewebe (z.B. Haut, Atem-, Verdauungs- und Urogenitaltrakt) stärker physikalischen Prozessen oder chemischen Stoffen mit karzinogenem Potential (Karzinogene) ausgesetzt sind. In diesem Zusammenhang sind die ultraviolette (UV-) Strahlung und Röntgenstrahlung, Luftpartikel

aus Industrieanlagen, Bestandteile des Zigarettenrauchs sowie Asbest am häufigsten beschrieben. Darüber hinaus können bestimmte Karzinomerkrankungen auch durch Viren hervorgerufen werden (z.B. *Epstein-Barr-Virus* beim Nasopharynxkarzinom, Hepatitisvirus beim Leberzellkarzinom, Papillomavirus beim Harnblasenkrebs).



**Abb. 1)** Altersspezifische Krebsmortalität. Darstellung aller bösartigen Neubildungen bei Männer und Frauen in der Bundesrepublik Deutschland von 1994 bis 2003 (GEKID & RKI, 2006).

Die Entstehung von Karzinomen geht mit einer veränderten Zellorganisation des Epithels einher (Eccles, 2002). Epithelzellen sind normalerweise polarisiert, d.h. dass Epithelzellen eine apikale und basolaterale Seite mit differentiellen Funktionen ausbilden. Die basolaterale Seite verbindet die Zellen untereinander durch interzelluläre Strukturen (Desmosomen, *Tight Junctions* und *Adherens Junctions*) und zur extrazellulären Matrix durch spezifische Zellmembranproteine (Integrine). Die basale Zellschicht des Epithels sekretiert dabei Proteine, welche die Basalmembran ausbilden. Die apikale Seite steht mit dem Lumen bzw. der Umwelt in Verbindung. Die Epithelzellen sind als squamöse Schichten (Deckepithel) oder sekretorische Strukturen (Drüsenepithel) angeordnet. Form und Struktur der Epithelzellen werden durch ein komplexes System aus intermediären Zytokeratinfilamenten aufrechterhalten. Ferner wird die Integrität des Epithels durch das Bindegewebe unterstützt, in dem sich die versorgenden Blutgefäße sowie vereinzelt die Fibroblasten befinden. Eines der Adhäsionsmoleküle, das bei der Aufrechterhaltung der normalen Epithelstruktur eine bedeutende Stellung einnimmt, ist das epitheliale (E-) Cadherin (Perez-Moreno *et al.*, 2003). Dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Glykoprotein ist infolge genetischer und epigenetischer Veränderungen in fast allen Karzinomen einschließlich des Bronchialkarzinoms funktionell

inaktiv (Birchmeier & Behrens, 1994; Hirohashi, 1998). Da E-Cadherin aber nicht nur eine physikalische Funktion erfüllt, sondern auch Signaltransduktionswege moduliert, ist der Verlust von E-Cadherin mit weitreichenden Veränderungen verbunden, die in ihrer Gesamtheit zum malignen Verhalten von Zellen führen (Cavallaro & Christofori, 2004).

## **1.2. Interaktion zwischen Epithel und Stroma bei der Entstehung von Karzinomen**

Es wird davon ausgegangen, dass die meisten Karzinome durch einzelne entartete Zellen (Vorläuferzellen) hervorgerufen werden. Die jeweilige Vorläuferzelle ist beispielsweise durch Karzinogene transformiert und wächst anschließend zu einem Zellklon und Tumor heran (Nowell, 1976). Genetische Defekte werden als primäre Ursache für die Entartung von Zellen und somit die Entstehung von Tumorstromazellen angesehen (Bishop, 1991; Hahn & Weinberg, 2002; Jackson & Loeb, 1998). Unabhängig davon sind zahlreiche Veränderungen in den Zellen bzw. in deren Umgebung notwendig, um das Wachstum von Tumoren und die Ausbreitung von Tumorzellen zu ermöglichen (Hanahan & Weinberg, 2000). Dazu zählen der Verlust der Wachstumskontrolle, die gesteigerte Resistenz gegenüber dem Zelltod, eine verlängerte Lebensspanne der Zellen sowie eine gute Versorgung des Tumors durch Gefäßneubildung (Neoangiogenese) und die Möglichkeiten zur Metastasierung.

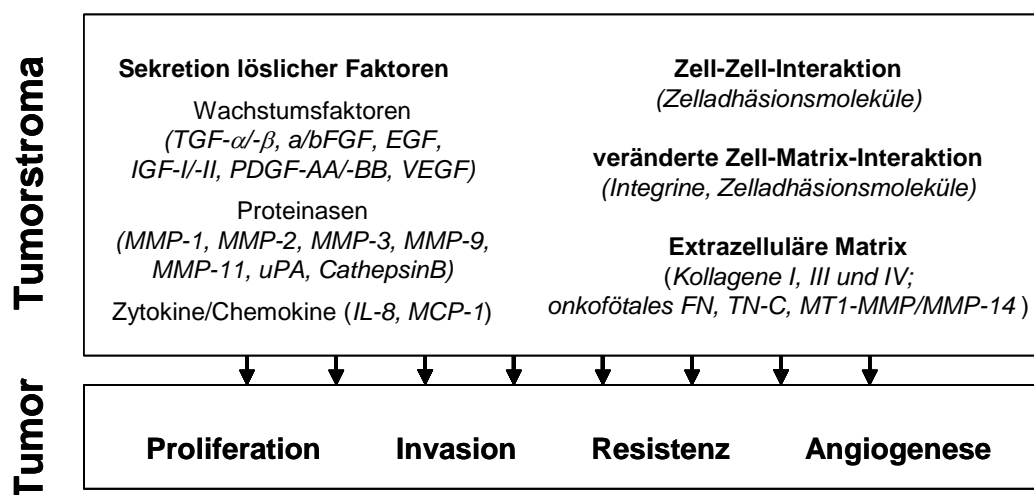
Die Gewebsumgebung ist ein ausschlaggebender Faktor für das Wachstum von Tumoren. Diese wird sowohl durch die Art der Nachbarzellen (z.B. Endothelzellen, Fibroblasten, Monozyten) als auch durch die Komponenten der extrazellulären Matrix bestimmt. Welche besondere Rolle das Gewebemilieu bei der Tumorigenese spielt, kann beispielsweise am multipotenten Verhalten von Stammzellen verdeutlicht werden. So bilden embryonale Stammzellen in einigen Geweben maligne Tumore aus, wohingegen sie in Blastozysten zur Entwicklung von normalen Geweben beitragen (Illmensee, 1978). Andere Experimente konnten zeigen, dass das onkogene Potential von *Rous Sarcoma*-Virus-transformierten Zellen in Gegenwart von embryonaler extrazellulärer Matrix inhibiert wird (Boudreau *et al.*, 1996). Da demzufolge die Gewebsumgebung das Tumorstromawachstum unterdrücken kann, könnte eine abnormale Umgebung die Tumorigenese auch steigern. In diesem Zusammenhang wurde nachgewiesen, dass erst die Gegenwart von bestrahlten aber nicht normalen Fibroblasten das Tumorstromawachstum von Epithelzellen unterstützt (Barcellos-Hoff & Ravani, 2000). Ein ähnlicher Effekt konnte auch für gealterte Fibroblasten gezeigt werden, welche das tumorfördernde Wachstum von prämaligen Epithelzellen auslösten (Krtolica *et al.*,

2001). Darüber hinaus ist seit langem die Bildung von organspezifischen Metastasen in Abhängigkeit vom Karzinomtyp bekannt. Die klinische Beobachtung, dass sich Zellen des Mammakarzinoms bevorzugt in Knochenmark, Lunge oder Leber absiedeln, führte bereits 1889 zur *Seed and Soil*-Theorie durch Stephen Paget. Diese Theorie besagt, dass die Tumorzelle (*Seed*) über den Blutstrom verteilt wird, aber nur in einem geeigneten Gewebemilieu (*Soil*) einen sekundären Tumor ausbilden kann. Faktoren dieses geeigneten Gewebemilieus werden auch als *Microenvironmental Effectors* (Park *et al.*, 2000) oder *Landscapers* (Kinzler & Vogelstein, 1998) bezeichnet.

Wie können nun stromale Faktoren die malignen Veränderungen im Epithelgewebe begünstigen? Es wird angenommen, dass unter bestimmten Bedingungen eine reversible Aktivierung von mesenchymalen Fibroblasten eintritt, wie sie auch bei der Wundheilung vorkommt. Tritt aber eine chronische Aktivierung ein, setzen die Fibroblasten vermehrt Proteinasen frei, die beim Gewebeumbau und der Erzeugung eines tumorbegünstigenden Milieus beteiligt sind. Demnach wird das Stroma von Tumoren auch als das Ergebnis einer fehlgeleiteten Wundheilung angesehen (Dvorak, 1986). Vorhandene prä maligne Epithelzellen erhalten somit die Chance zur Proliferation (Bissell & Radisky, 2001). Diese Möglichkeit der Tumorentstehung ist am Beispiel der Matrixmetalloproteinase (MMP)-3/ Stromelysin (STR)-1 für das Mammakarzinom beschrieben (Sternlicht *et al.*, 1999). Im Vergleich findet man eine ganze Reihe von reparativen Vorgängen bei der Wundheilung, die auch in der Umgebung des Tumors konstitutiv aktiv sind (Bissell & Radisky, 2001). Dazu zählen die Rekrutierung inflammatorischer Zellen, die Proliferation von Fibroblasten und Epithelzellen, die Zellmigration und Neoangiogenese.

Der Einfluss des Stromas auf das Tumorgeschehen ist vielfältig und findet sowohl auf zellulärer als auch auf extrazellulärer Ebene statt (Beacham & Cukierman, 2005; Kiaris *et al.*, 2004; Mueller & Fusenig, 2004; Wernert, 1997; vgl. Abb. 2). Es hat sich erwiesen, dass vor allem die Fibroblasten das Mikromilieu im Tumorgewebe beeinflussen. Insbesondere durch die Bildung und Freisetzung von mitogenen Faktoren (Wachstumsfaktoren, Zytokine) und Proteinasen tragen sie zum invasiven Wachstum und zur Neoangiogenese des Tumors bei (Kunz-Schughart & Knuechel, 2002b; Micke & Ostman, 2004). Die Beziehung zwischen Tumorzelle und Fibroblast konnte für viele Karzinomtypen identifiziert werden. Im Falle des Bronchialkarzinoms wurde gezeigt, dass neben den Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFs, *Fibroblast Growth Factors*) auch der TGF (*Transforming Growth Factor*)- $\alpha$  sowie das Amphiregulin der Fibroblasten die Proliferation von Tumorzellen stimuliert (Cekanova *et al.*, 2006). Des Weiteren unterstützt die mitogene

Stimulation der Tumorzellen durch die Fibroblasten bzw. deren lösliche Faktoren (*acidic* (a)FGFs und *basic* (b)FGFs) die Resistenz von Tumoren gegenüber ausgewählten Chemotherapeutika (Bartling *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2000). Die Fibroblasten haben aber nicht nur einen Effekt auf die Tumorzellen, sondern umgekehrt auch die Tumorzellen auf die Fibroblasten. So stimuliert die Gegenwart von Bronchialkarzinomzellen die Freisetzung von bFGF sowie die Sekretion von MMP-11/STR-3 in den normalen pulmonalen Fibroblasten (Mari *et al.*, 1998). Die Expression von MMP-2 in den Fibroblasten, nicht aber in den Tumorzellen, geht zudem mit der zunehmenden Dichte der tumorversorgenden Gefäße im Bronchialkarzinom einher (Ishikawa *et al.*, 2004). Zusätzlich zu den direkten mesenchymal-epithelialen Effekten tragen die Fibroblasten durch die Freisetzung von löslichen Faktoren (Abb. 2) auch zu immunologischen Prozessen (Entzündungsreaktion, Immunsuppression) in Tumoren bei (Silzle *et al.*, 2004).



**Abb. 2)** Stromale Faktoren, die zur Tumorentwicklung beitragen (Erläuterungen, siehe Abkürzungsverzeichnis).

Aufgrund charakteristischer Eigenschaften werden die Fibroblasten im Tumorgewebe zumeist als tumorassoziierte (TA) bzw. karzinomassoziierte Fibroblasten bezeichnet. Die TA-Fibroblasten sind heterogen und weisen Merkmale von Myofibroblasten und/oder onkofötale Merkmale auf (Kunz-Schughart & Knuechel, 2002a; Micke & Ostman, 2004). Obwohl die genaue Herkunft der TA-Fibroblasten unklar ist, könnte es sich hierbei um normale Fibroblasten handeln, die in der unmittelbaren Umgebung des Tumors definierten Phänotypveränderungen unterliegen. Dazu zählen auch multiple Veränderungen im Genexpressionsprofil der Fibroblasten (Fromigue *et al.*, 2003). Hinsichtlich der Herkunft von

TA-Fibroblasten gibt es aber auch andere Theorien (z.B. embryonale Herkunft, epithelial-mesenchymale Transformation). Neben dem unmittelbaren Einfluss der TA-Fibroblasten auf das Tumorwachstum spielt die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und deren Modifikation durch die TA-Fibroblasten eine wichtige Rolle (z.B. Bildung von Fibronektinfragmenten, Tenascin-C, Kollagen), da diese sowohl die Tumorzellen als auch die Immunzellen im Tumor reguliert (Silzle *et al.*, 2004). Die Fibroblasten bilden demnach zusammen mit den anderen Bestandteilen des Stromas ein Mikromilieu, welches zu Entstehung, Wachstum und Invasion sowie zur Resistenz der Tumore beiträgt.

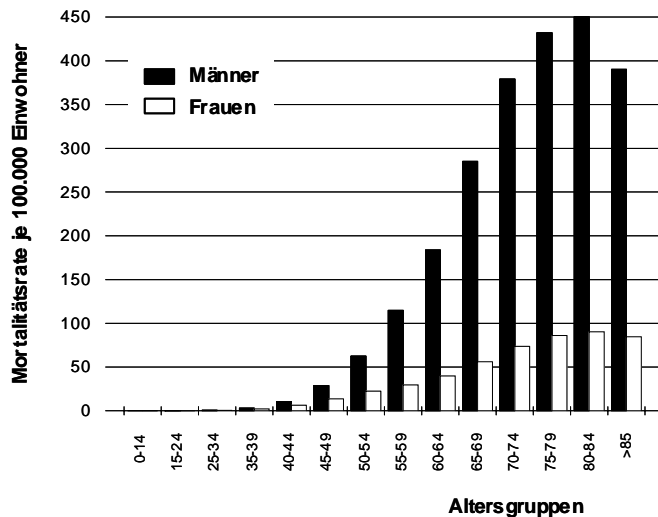
### **1.3. Lungenkrebs – Bronchialkarzinom**

#### ***Epidemiologie und Ätiologie***

Bösartige Tumore in der Lunge entstehen überwiegend aus den Zellen, welche die Atemwege (Bronchien) auskleiden. Nur diese Tumore bezeichnet man im engeren Sinn als Lungenkarzinome oder Bronchialkarzinome (Cersosimo, 2002). In der Lunge können jedoch weitere Krebserkrankungen auftreten, wie die Metastasen von Tumoren anderer Körperorgane oder Krebserkrankungen der Blutzellen (Lymphome). Nach den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und *International Association for the Study of Lung Cancer* (IASLC) zur histologischen Klassifikation der Lungentumore lassen sich mehr als 50 Tumortypen unterscheiden (Beasley *et al.*, 2005; Travis *et al.*, 1999).

Zu den Hauptrisikofaktoren für die Entstehung bösartiger Lungentumore gehört das aktive Rauchen (Sasco *et al.*, 2004). Ein erhöhtes Risiko für Lungenkrebs stellt auch das Passivrauchen (Kreutzer *et al.*, 2006) sowie eine regional erhöhte Radonbelastung in Wohnhäusern dar (Wichmann *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu ist das Lungenkrebsrisiko durch die beruflich bedingte Exposition zu diversen kanzerogenen Stoffen, wie Asbest, ionisierte Strahlung oder Quarzstäuben, relativ gering (Boffetta, 2006). Männer sind häufiger als Frauen gleichen Alters von Lungenkrebs betroffen. Daher ist auch ihr Anteil an der Lungenkrebs-bedingten Mortalität deutlich höher (Abb. 3). Dennoch ist die Anzahl der Erkrankungsfälle bei den Männern seit Ende der 1980er Jahre stagnierend (GEKID & RKI, 2006). Bei den Frauen dagegen steigt die Inzidenz und somit die Anzahl der Todesfälle weiterhin kontinuierlich an. Zwischen 1980 und 2003 hat sich in Deutschland die Anzahl der Frauen, die an Lungenkrebs verstarben, nahezu verdoppelt (GEKID & RKI, 2006). Der zunehmende Anteil von Frauen unter den Rauchern wird für diese unterschiedliche Trendentwicklung verantwortlich gemacht. Wie bei vielen Krebserkrankungen, nimmt auch

für das Bronchialkarzinom die Inzidenz und Mortalität mit dem Alter exponentiell zu und erreicht bei 80 Jahren ihr Maximum (Abb. 3). Zum Zeitpunkt der Diagnose liegt das mittlere Erkrankungsalter für Männer und Frauen bei etwa 68 Jahren, was dem mittleren Alter für Krebserkrankungen insgesamt entspricht (GEKID & RKI, 2006).



**Abb. 3)** Alters- und geschlechtsspezifische Krebsmortalität. Bösartigen Neubildungen der Bronchien und Lunge in der Bundesrepublik Deutschland von 1994 bis 2003 (GEKID & RKI, 2006).

### *Pathologie und Therapie*

Die bösartigen epithelialen Tumore der Lunge teilen sich nach WHO/IASLC-Klassifikation in die kleinzelligen Karzinome (SCLC) und vier Hauptgruppen der nichtkleinzelligen Karzinome (NSCLC) ein (Tab. 1: A-E). Daneben treten weniger häufige Grundformen (Tab. 1: F-H) und Sonderformen innerhalb der jeweiligen Hauptgruppen auf. Am häufigsten sind die Plattenepithelkarzinome und die Adenokarzinome (Tab. 1). Während die Plattenepithelkarzinome oft zentral in den Bronchien lokalisiert sind, entstehen Adenokarzinome in den kleinen Bronchien und liegen peripher in der Lunge. Das Plattenepithelkarzinom ist die Form von Lungenkrebs, die noch am häufigsten mit dem Rauchen assoziiert ist (Sasco *et al.*, 2004). In den vergangenen Jahren konnte jedoch eine zunehmende Tendenz für die pulmonalen Adenokarzinome beobachtet werden, wobei der Anstieg der Adenokarzinome bei den Frauen stärker als bei den Männern ist (Janssen-Heijnen & Coebergh, 2003). Vielfach treten auch die kleinzelligen sowie die großzelligen Karzinome auf. Einige Bronchialkarzinome besitzen neuroendokrine Eigenschaften, wie die Karzinoidtumore und ein Teil der kleinzelligen und großzelligen Karzinome. Daher werden diese auch zu den

neuroendokrinen Karzinomen gezählt (Brambilla *et al.*, 2001). Aufgrund der morphologischen Heterogenität der Lungentumore wird angenommen, dass sich die verschiedenen Typen der Bronchialkarzinome aus pluripotenten Vorläuferzellen (Typ-II-Alveolarzellen, Clarazellen) (Greenberg *et al.*, 1975; Ten Have-Opbroek *et al.*, 1997) bzw. den unlängst beschriebenen BASCs (*Bronchioalveolar Stem Cells*) entwickeln (Kim *et al.*, 2005).

**Tabelle 1)** Histologische Klassifikation und Häufigkeit der bösartigen epithelialen Tumore der Lunge nach WHO/IASLC (Travis *et al.*, 2004; Travis *et al.*, 1995).

<b>Tumorsubtypen</b>	<b>Anteil</b>
A) Plattenepithelkarzinome	30 bis 40 %
B) Kleinzellige Karzinome	15 bis 20 %
C) Großzellige Karzinome	10 %
D) Adenokarzinome	25 bis 30 %
E) Adenosquamöse Karzinome	1 bis 2 %
F) Polymorphe sarkomatoide Karzinome	
G) Karzinoidtumore	
H) Bronchialdrüsenkarzinome	
Unklassifizierte Tumore	

Makroskopisch lässt sich das Auftreten und die Ausdehnung des Primärtumors durch Röntgenanalyse und Computertomographie bestimmen. Zusätzlich wird Gewebematerial zur histologischen Klassifizierung des Tumors (*Typing*) mittels endoskopischer Verfahren oder durch transthorakale Punktion gewonnen. Neben der Feststellung von Metastasen im Brustkorbbereich muss im Rahmen von Untersuchungen zum Tumorstadium auch geprüft werden, ob Fernmetastasen in anderen Organen vorliegen. Metastasierungen der Bronchialkarzinome sind zum Zeitpunkt der Diagnose relativ häufig. Je nach Ausbreitung des Bronchialkarzinoms unterscheidet man verschiedene Stadien der Tumorentwicklung (Mountain, 1997). Für das so genannte *Staging* sind drei Gesichtspunkte maßgebend: die Größe und Ausdehnung des Tumors (T), die Beteiligung der Lymphknoten (N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (M). Daher verwendet man auch den Begriff TNM-Klassifikation. Ziffern hinter den entsprechenden Buchstaben informieren über die genaue Ausdehnung des Tumors (T1 bis T4), die Anzahl und Lokalisation der befallenen Lymphknoten (N0 bis N2) und das Fehlen oder Vorhandensein von entfernten Metastasen (M0 oder M1). Die Kombination dieser drei Gesichtspunkte bestimmt die Einstufung des Tumors in ein niedriges/frühes bis hohes/fortgeschrittenes Tumorstadium (TNM I bis TNM IV). Des Weiteren werden die Malignitätsgrade (G1 bis G4) aufgrund von histologischen



Untersuchungen des Tumorgewebes definiert. Anhand dieses *Grading*s lassen sich Rückschlüsse auf die Aggressivität des Tumorwachstums ziehen.

Das Fortschreiten der Erkrankung und die histopathologischen Eigenschaften des Tumors entscheiden dabei grundlegend über die Therapieform und die Prognose von Patienten mit Lungenkrebs. In Deutschland erfolgt die klinisch-pathologische Diagnose und Therapie von Lungenkrebserkrankungen nach den Empfehlungen der Deutschen Krebsgesellschaft e.V., 2002. Die Chemo- und Radiotherapie sowie die operative Entfernung des Primärtumors stellen die grundlegenden Behandlungsmöglichkeiten von Patienten mit Bronchialkarzinom dar. Beim Therapieentscheid ist die Differenzierung der SCLCs von den NSCLCs aufgrund des unterschiedlichen biologischen Verhaltens von wesentlicher Bedeutung. Beim SCLC wird die Kombinationschemotherapie als Ganzkörperbehandlung bevorzugt, da der Tumor schnell wächst und früh Metastasen ausbildet. Obwohl sich mit der Chemotherapie und einer anschließenden Bestrahlung des Tumors die Lebensqualität der Patienten vorübergehend verbessern lässt, ist die mittlere Überlebenszeit von 15 bis 20 Monate sehr kurz. Im Vergleich zum SCLC wächst das NSCLC langsamer und zeigt eine spätere Metastasierungstendenz, reagiert aber weniger gut auf die Chemo- und Strahlentherapie. Deshalb ist die thoraxchirurgische Resektion des betroffenen Lungenareals durch die Lobektomie, Segmentresektion oder im Extremfall durch die Pneumonektomie der bisher einzige kurative Ansatz. Die chirurgische Behandlung des NSCLC ist allerdings nur für die frühen Tumorstadien (TNM I und TNM II) möglich, wenn sich der Tumor höchstens in die regionären Lungenwurzellymphknoten ausgebreitet hat. Aus diesem Grund können nur 25 bis 30 % aller Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose noch einer operativen Behandlung unterzogen werden. Im TNM-Stadium I, in dem sich der Tumor auf die Lunge beschränkt, liegt die 5-Jahres-Überlebenszeit bei 60 bis 75 % noch relativ hoch, vermindert sich aber im Stadium II auf 30 bis 50 %. Sind bereits die mediastinalen Lymphknoten in das Tumorgeschehen einbezogen (TNM IIIa), wird zusätzlich (adjuvant) eine Chemo- oder Radiotherapie durchgeführt. In den letzten Jahren hat sich auch die chemotherapeutische Behandlung des Patienten bereits vor der chirurgischen Intervention, d.h. die neoadjuvante Chemotherapie, zunehmend etabliert (Eberhardt *et al.*, 2007). Liegt bereits der Befall von mediastinalen Lymphknoten (TNM IIIb) oder sogar eine Fernmetastasierung des Tumors (TNM IV) vor, wird nur noch in Ausnahmefällen operiert. Neben der Radiotherapie kommt die Kombinationstherapie mit verschiedenen Zytostatika zum Einsatz. Dennoch liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei den höheren Tumorstadien nur zwischen 10 und 30 % für das TNM-Stadium IIIa und zum Teil weit unter 10 % für die Stadien IIIb und IV.

#### 1.4. Genetische und molekulare Veränderungen im Bronchialkarzinom

Der Übergang einer normalen Zelle in eine Tumorzelle wird Transformation genannt. Im Gegensatz zu normalen Zellen, die alle Merkmale von ausdifferenzierten Zellen mit spezifischen Funktionen zeigen, sind die Tumorzellen häufig dedifferenziert und tragen Eigenschaften embryonaler Zellen. Darüber hinaus teilen sich Tumorzellen ungehemmt und ihre Zelloberfläche sowie intrazelluläre Strukturen (Zytoskelett, Zellkern) sind verändert. Neben den rein zellbiologischen Veränderungen können Tumorzellen ein Spektrum von chromosomalen Defekten (Umbauten, Verdopplungen, Aneuploidie) und kleineren Mutationen (*mis-/non-sense* Mutationen, Insertionen, Deletionen) tragen. Ferner steuern epigenetische Veränderungen (Promoter-DNA-Methylierung, Histondeazetylierung) zur Tumorigenese bei. Eine Vielzahl von molekularen Faktoren sind an den tumorigenen Veränderungen beteiligt, die auch in der Tumordiagnostik von Bedeutung sind und daher oft als Tumormarker bezeichnet werden. Diese Tumormarker können u.a. Faktoren sein, die direkt bei der Transformation (Initiation) und Stabilisierung der transformierten Zellen (Promotion) eine Rolle spielen und/oder nachfolgend die Entwicklung zu einem malignen Tumor (Progression: Wachstum, Invasion, Metastasierung) unterstützen.

Bei der Tumoringenese sind die Aktivierung von so genannten Protoonkogenen und der Verlust von Antionkogenen (Tumorsuppressorgenen) relevant. Unter normalen Umständen induzieren Protoonkogene aber noch keinen Tumor. Erst durch genetische Ereignisse, wie Mutationen, Deletionen oder Überexpressionen, erlangen Protoonkogene die Eigenschaft von Onkogenen. Onkogene wurden zunächst in tumorinduzierenden Viren gefunden (virale Onkogene). Ihre Homologe in eukaryotischen Zellen werden als zelluläre Onkogene bezeichnet. Onkogene kodieren für Proteine, die an der Kontrolle von Wachstums- und Differenzierungsprozessen beteiligt sind. Diese umfassen Membranrezeptoren und ihre Liganden, Proteinkinasen, GTP-bindende Proteine, nukleäre Hormonrezeptoren und DNA-bindende Proteine. Die beim Bronchialkarzinom involvierten Protoonkogene sind vor allem *myc* (*c-myc*, *N-myc*, *L-myc*), *ras* (*K-ras*, *H-ras*, *N-ras*) und *erbB* (*c-erbB1*, *c-erbB2*) (Wiethage *et al.*, 2000). Während *erbB1* und *erbB2*, die für Wachstumsfaktorrezeptoren kodieren, beim NSCLC häufig überexprimiert sind, liegt eine Überexpression von *myc*, dessen Genprodukt als Transkriptionsfaktor die Transkription anderer Gene kontrolliert, ausschließlich beim SCLC vor. Im Gegensatz dazu sind die *ras*-Protoonkogene, die für GTPasen kodieren, beim NSCLC mutiert. Infolge der Mutation ist die Inaktivierung der GTPasen durch das GTPase-aktivierende Enzym (GAP) gehemmt, und somit die Ras-vermittelte Signaltransduktion in der Zelle ständig aktiv (Schmitz *et al.*, 2000). Ferner gilt

eine konstitutiv aktive Telomerase durch die verstärkte Expression der katalytischen Untereinheit hTERT zu den frühen Ereignissen der Bronchialkarzinomentstehung (Hiyama *et al.*, 1995). Unter den Tumorsuppressorgenen sind vor allem das Retinoblastom (*Rb*)-Gen sowie das *p53*-Gen häufig defekt (Wiethege *et al.*, 2000). Die molekulargenetischen Veränderungen im menschlichen Bronchialkarzinom sind allerdings sehr heterogen, da sie nur in einem gewissen Prozentsatz der Tumore und in nicht allen histologischen Subtypen in gleicher Weise vorliegen. Darüber hinaus kann die Expression von Onkogenen, die für Faktoren mit parakriner Funktion kodieren (z.B. HGF als Genprodukt von *c-met*) nicht allein durch die Tumorzelle selbst, sondern auch durch Fibroblasten im Tumorstroma erfolgen (Siegfried, 1998). Daher sind die diagnostische und prognostische Bedeutung einzelner Protoonkogene und Tumorsuppressorgene häufig nicht ausreichend genug. Neben molekulargenetischen Veränderungen, die an der Tumorentstehung beteiligt sind, treten weitere Veränderungen auf, die zur Tumorentstehung führen. Dazu zählen eine Reihe von Prozessen, die infolge der Hypoxie im Tumorzellverband aktiviert werden (z.B. die Induktion des Transkriptionsfaktors HIF (*Hypoxia-Inducible Factor*)-1 $\alpha$  und seiner regulierten Gene) (Harris, 2002). Dazu zählt aber auch die Expression von Genen, die den apoptotischen Zelltod beeinträchtigen und somit zur gesteigerten Apoptoseresistenz von Tumorzellen beitragen (Igney & Krammer, 2002). Obwohl nicht alle genetischen Veränderungen im Tumor die Tumorentstehung primär begünstigen werden, dürften sie dennoch als Tumormarker für die Diagnose von Nutzen sein.

Die Sequenzierung des menschlichen Genoms und die technologische Revolution in der DNA-Analytik haben in den letzten Jahren die Voraussetzungen geschaffen, genetische Veränderungen in Tumoren systematisch zu analysieren. Die Entwicklung der Mikroarray-Technologien hat insbesondere ermöglicht, multiple genetische Veränderungen im Tumor nicht mehr sequentiell sondern gleichzeitig zu bestimmen (Seliger, 2006). Diese umfassen sowohl die Quantifizierung der Transkription von Genen als auch die Analyse von Genpolymorphismen (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*). Als eine neue Klasse von Genotypmarkern im Tumor gelten auch die kleinen nichtkodierenden RNA-Moleküle, die als Mikro-RNAs (miRNAs) bezeichnet werden und negative Regulatoren der Genexpression sind (Zhang *et al.*, 2007). Im Rahmen der Tumoranalytik war es vor allem von großem Interesse, die genomweite Verteilung und Regulation von Transkriptionsprodukten zu bestimmen. Dazu dienten anfangs die SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*)-Technologie (Velculescu *et al.*, 1995) sowie die cDNA-Mikroarrays (DeRisi *et al.*, 1997) und später die *high density* Oligonukleotid-Mikroarrays (Lipshutz *et al.*, 1999; Ragoussis &

Elvidge, 2006). So konnten besonders die DNA-Mikroarray-Analysen Gene identifizieren, die im Bronchialkarzinom differentiell transkribiert werden (Tab. 2). Aufgrund der verschiedenen histopathologischen Subtypen (SCLC, NSCLC und seine Unterformen) sind diese aber nicht immer gleich (Tab. 2). Diesbezüglich haben Oligonukleotid-Mikroarray-Studien an unserer Klinik die Überexpression bestimmter Gene im NSCLC definieren können, die nur im Plattenepithelkarzinom auftreten (z.B. *collagen VII*, *cytokeratin 6A*), wohingegen andere spezifisch für das Adenokarzinom sind (z.B. *tf1*, *dat1*, *tf2*) (Hofmann *et al.*, 2006). Diese Untersuchungen am Gewebehomogenat liefern jedoch keine zuverlässigen Hinweise zu Expressionsveränderungen auf Einzelzellbasis, sodass die Analysen am Gewebeschnitt nach wie vor unerlässlich sind. Darüber hinaus haben auch das Tumorstadium und andere Faktoren einen Einfluss auf die Genexpression im Tumorgewebe (vgl. Kapitel 3.1.).

**Tabelle 2)** Differentiell exprimierte Gene, die in unabhängigen DNA-Mikroarray-Studien für das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC) oder für das nichtkleinzellige Bronchialkarzinom (NSCLC) identifiziert werden konnten (Meyerson *et al.*, 2004).

SCLC	NSCLC
<i>human achaete-scute homologue 1</i>	<i>ataxia-telangiectasia group D-associated protein</i>
<i>forkhead box G1B</i>	<i>bullous pemphigoid antigen 1</i>
<i>insulinoma-associated 1</i>	<i>collagen VII</i>
<i>islet-1 transcription factor</i>	<i>galectin 7</i>
<i>KIAA 0282 protein</i>	<i>keratin 5</i>
<i>thymosin <math>\beta</math></i>	<i>keratin 17</i>
	<i>s100 calcium-binding protein A2</i>
	<i>tumour protein 63</i>

Die Bestimmung multipler Veränderungen im Tumor soll dazu beitragen, Tumormarker für eine genauere Diagnose und Subklassifizierung des Bronchialkarzinoms sowie Marker mit prognostischer Relevanz zu identifizieren. So konnten Arbeiten mit DNA-Mikroarrays verschiedene Prognosemarker für das Bronchialkarzinom definieren (Beer *et al.*, 2002; Diederichs *et al.*, 2004; Wigle *et al.*, 2002), zu denen die simultan erhöhte mRNA-Expression von MMP-12 und Urokinase-Plasminogen-Aktivator (uPA) gehörte (Hofmann *et al.*, 2005). Ferner soll der Einsatz der DNA-Mikroarray-Technologie dazu beitragen, Ansätze für eine bessere Antikrebstherapie zu entwickeln. Diese könnte so aussehen, dass nur die Chemotherapeutika Anwendung beim Patienten finden, wenn dieser das Zielprotein der Therapie auch verstärkt im Tumor bildet (Hofmann & Bartling, 2005). Neben der

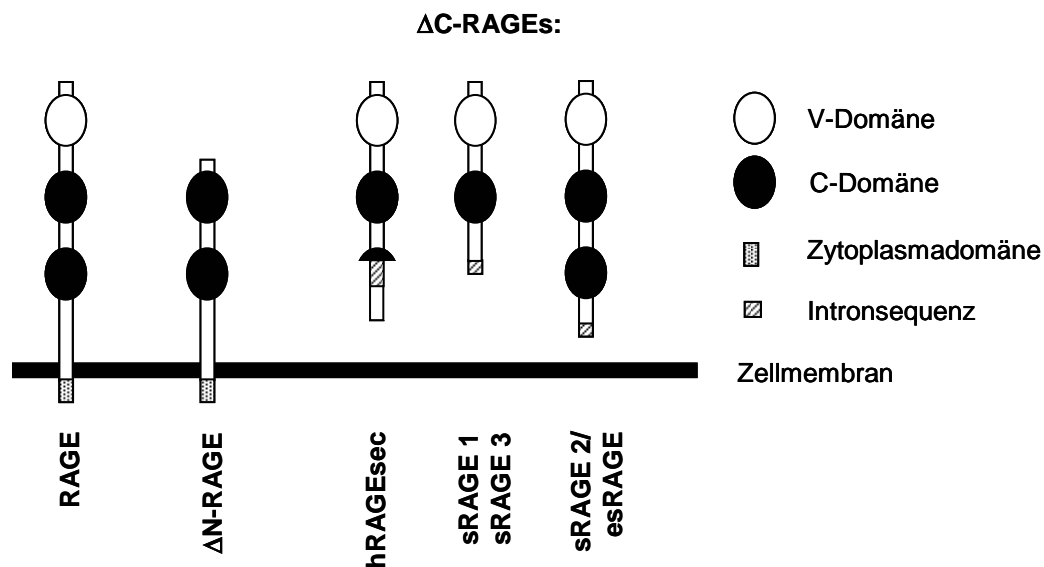
genomweiten Transkriptionsanalyse durch die DNA-Mikroarrays haben auch SNP- und miRNA-Arrays definierte Veränderungen auf der Ebene der Genpolymorphismen (Weir *et al.*, 2007) bzw. der miRNA-Expression (Volinia *et al.*, 2006; Yanaihara *et al.*, 2006) im Bronchialkarzinom kartieren können. Zur Verifizierung der auf der Array-Technologie beruhenden Ergebnisse werden aber nach wie vor konventionelle Methoden angewandt, zu denen die quantitative RT-PCR (*Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) und FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*)-Technik gehören. Darüber hinaus liefern die Array-basierenden molekulargenetischen Daten lediglich Hinweise zu tumorassoziierten Veränderungen des Genoms, nicht aber des Proteoms. Daher ist ihre Aussagekraft zur biologischen Bedeutung einzelner Veränderungen eingeschränkt. Aus diesem Grund wird derzeit an der Entwicklung und Etablierung von Array-Technologien gearbeitet, die tumorbiologische Veränderungen auf der Proteinebene analysieren (vgl. Kapitel 3.2.).

### 1.5. Der Rezeptor RAGE in Lunge und Bronchialkarzinom

Die Transformation von Zellen und Entstehung von Tumoren einschließlich der Lungentumore ist eng mit genetischen Defekten verbunden, die durch eine Vielzahl von toxischen Prozessen hervorgerufen werden können (Hanahan & Weinberg, 2000; Schwartz *et al.*, 2007). Aufgrund ihrer genotoxischen Wirkung werden auch die Glykierungsendprodukte als potentielle Karzinogene diskutiert (Stopper *et al.*, 2003). Glykierungsendprodukte, die *in vivo* gebildet werden, bezeichnet man im Allgemeinen als AGEs (*Advanced Glycation End-products*). Die AGEs stellen eine heterogene Gruppe von modifizierten Proteinen oder Lipiden dar, die nichtenzymatisch durch die Glykierung mit Zuckern (Maillard-Reaktion) im Gewebe gebildet werden (Dyer *et al.*, 1991). Ihr Auftreten ist eng mit den Altersveränderungen der inneren Organe, einer unbehandelten Diabetes sowie Niereninsuffizienz assoziiert (Brownlee, 1995; Henle & Miyata, 2003). Auch das Rauchen induziert die Akkumulation von Tabak-AGEs im Blut durch Reaktion mit dem LDL (*Low Density Lipoprotein*) (Nicholl & Bucala, 1998). AGEs treten sowohl intra- als auch extrazellulär auf. Bindungsstudien konnten ein Molekül in Proteinextrakten der Rinderlunge entdecken, das mit den AGEs interagiert und daher als RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End-products*) bezeichnet wurde (Neeper *et al.*, 1992; Schmidt *et al.*, 1992).

RAGE ist ein Zelloberflächenrezeptor der Immunglobulin-Superfamilie (Neeper *et al.*, 1992), der neben den AGEs auch andere Liganden bindet (Herold *et al.*, 2007). Dieser Multiligandenrezeptor setzt sich aus einem 322-Aminosäure-großen extrazellulären Bereich

mit zwei C-Typ- und einer V-Typ-Immunglobulin-ähnlichen Domäne zusammen (Abb. 4). Die N-terminale V-Domäne ist für die Interaktion mit den Liganden wichtig (Hofmann *et al.*, 1999; Kislinger *et al.*, 1999; Skrikrishna *et al.*, 2002). Im C-terminalen Proteinbereich schließt sich die Transmembrandomäne und ein 43-Aminosäure-großer zytoplasmatischer Bereich an (Abb. 4). Obwohl der zytoplasmatische Bereich stark negativ geladen ist und keine Homologien mit bekannten Signaltransduktionsdomänen aufweist, wurde die Stimulation bestimmter intrazellulärer Signalmoleküle durch RAGE beschrieben. So konnte die Aktivierung von kleinen GTPasen (Ras, Cdc42, Rac) (Huttunen *et al.*, 1999), Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs: p38, p44/p42, SAPK/JNK) (Taguchi *et al.*, 2000), Transkriptionsfaktoren (NF- $\kappa$ B, CREB) (Huttunen *et al.*, 1999; Huttunen *et al.*, 2002b) und anderen Faktoren gezeigt werden.



**Abb. 4)** Schematische Darstellung der Proteinstruktur des Zelloberflächenrezeptors RAGE und seiner Isoformen. Neben der N-terminal veränderten ( $\Delta$ N-) Isoform, die membrangebunden ist, treten mehrere C-terminal veränderte ( $\Delta$ C-) Isoformen auf, die löslich sind. Die löslichen RAGE-Formen resultieren aus verschiedenen Spleißvariationen, wobei die mRNAs von sRAGE 1 und 3 für das gleiche Protein kodieren.

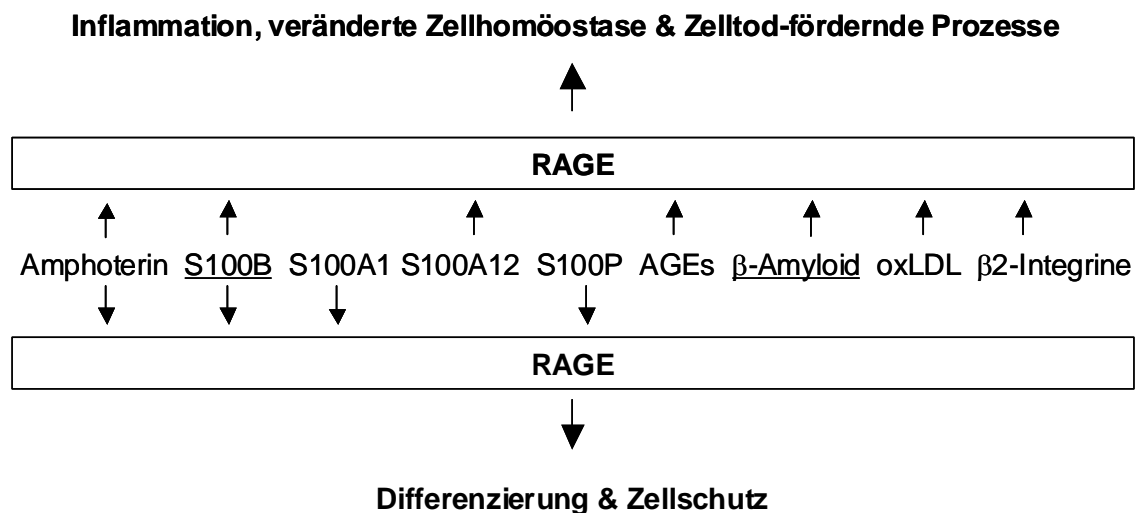
Unter physiologischen Bedingungen wird RAGE nahezu ausschließlich in der Lunge exprimiert (Brett *et al.*, 1993), und hier insbesondere in den Typ-I-Alveolarzellen (Fehrenbach *et al.*, 1998; Shirasawa *et al.*, 2004). Im Gegensatz zur Lunge ist RAGE in anderen Geweben nur geringfügig exprimiert, kann aber unter pathologischen Bedingungen induziert werden. So ist beispielsweise die induzierte Expression von RAGE in den Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Phagozyten diabetisch veränderter Gefäßbereiche

(diabetische Vaskulopathie) (Wautier *et al.*, 1996) oder nach einer mechanischen Gefäßverletzung (Ballondilatation) (Zhou *et al.*, 2003) gezeigt worden. An der Transkription des *rage*-Genes sind die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B (Huttunen *et al.*, 1999) und Sp1 (Li *et al.*, 1998) beteiligt. Da die Interaktion von RAGE mit seinen Liganden zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt (Huttunen *et al.*, 1999), scheinen die Liganden selbst die Expression von RAGE zu induzieren (positive Rückkopplung).

Das alternative Spleißen der Vorläufer-mRNA resultiert zusätzlich in der Bildung einiger Isoformen von RAGE (Abb. 4), die zell- und gewebespezifisch exprimiert werden (Cheng *et al.*, 2005; Hudson *et al.*, 2007; Malherbe *et al.*, 1999; Schlueter *et al.*, 2003; Yonekura *et al.*, 2003). Die löslichen Isoformen werden häufig nur als *s/sec* (*secretory*) RAGE bezeichnet, ohne die exakte sRAGE-Variante zu kennen. Ferner wurden auch sRAGE-Varianten beschrieben, die durch proteolytische Spaltung entstehen (Ding & Keller, 2005; Galichet *et al.*, 2008). Aufgrund ihrer Primärstruktur sowie einiger experimenteller Daten wird vom antagonistischen Effekt dieser sRAGE-Formen ausgegangen (Kislinger *et al.*, 1999; Rouhiainen *et al.*, 2004). Dennoch sind aber auch sRAGE-vermittelte Effekte gezeigt worden (z.B. Induktion von proinflammatorischen Zytokinen), die nicht auf die RAGE-Kompensation zurückzuführen sind (Pullerits *et al.*, 2006). In der Lunge sind überwiegend die löslichen Formen sRAGE 1 und 2 exprimiert (Schlueter *et al.*, 2003). Die Isoform sRAGE 2, die auch es (*endogenous secretory*) RAGE genannt wird (Yonekura *et al.*, 2003), kann zudem stabil im Zytoplasma detektiert werden (Cheng *et al.*, 2005). Neben dem potentiell kompetitiven Effekt zwischen dem membranständigen RAGE und seinen löslichen Isoformen wird die effiziente Wirkung des Rezeptors durch posttranslationale Proteinmodifikationen beeinflusst. So beeinträchtigt die N-Glykosylierung im N-terminalen Bereich von RAGE die Rezeptor-Liganden-Interaktion und somit die RAGE-vermittelte Funktion (Skrikrishna *et al.*, 2002).

Unter der Vielzahl von AGEs wurde das N- $\epsilon$ -Carboxymethyllysin, ein sehr häufiges AGE-Derivat *in vivo* (Dyer *et al.*, 1993), als Hauptbindungspartner für RAGE identifiziert (Kislinger *et al.*, 1999). Zusätzlich zu diesem AGE-Derivat sind weitere RAGE-Liganden beschrieben worden, die im Zusammenhang mit pathologischen Veränderungen stehen (Abb. 5). Dazu zählen das  $\beta$ -Amyloid-Peptid (Yan *et al.*, 1996), extrazelluläre Mitglieder der S100-Proteinfamilie (Donato, 2001) sowie  $\beta$ 2-Integrine (Mac-1, p150,95) (Chavakis *et al.*, 2003). Abhängig vom Liganden führt die Aktivierung von RAGE zur Induktion intrazellulärer Signalsysteme, die eine verstärkt proinflammatorische Antwort der Zelle

hervorrufen, die Zellhomöostase beeinflussen und das Immunsystem stimulieren (Herold *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang wurde die induzierte Expression von Wachstumsfaktoren, Interleukinen und anderen Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, Matrixmetalloproteinasen und proapoptotischen Genen sowie die Bildung von Sauerstoffradikalen beschrieben. Daher wird der Aktivierung von RAGE eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von degenerativen Erkrankungen (Diabetes, Niereninsuffizienz, Arteriosklerose, Alzheimer) zugesprochen (Bucciarelli *et al.*, 2002).



**Abb. 5)** Bindungspartner des Multiligandenrezeptors RAGE und ihre zelluläre Wirkung. Viele Liganden werden in der Lunge bzw. in den Lungenepithelzellen exprimiert oder erreichen über die Blutbahn das Lungengewebe (Bartling *et al.*, 2005 (8.1.)). Andere Liganden (unterstrichen) treten bevorzugt im Gehirn auf.

Im Gegensatz zum normalen Lungengewebe ist die Expression des Rezeptors RAGE im Lungentumor von Patienten mit einem NSCLC deutlich reduziert (Schraml *et al.*, 1997). Zudem konnten Oligonukleotid-Mikroarray-Analysen an unserer Klinik zeigen, dass der geringe RAGE-Gehalt im NSCLC eine sehr genaue Differenzierung des Tumorgewebes vom Nichttumorgewebe erlaubt (Hofmann *et al.*, 2004). Inwiefern die stark verminderte Expression dieses Rezeptors ein generelles Tumoreignis ist und ob der Verlust von RAGE auch zur Tumorentwicklung selbst beiträgt, haben diese Analysen nicht gezeigt.