

Herbert Rübgen (Hrsg.)

**Uroonkologie**

5., vollständig überarbeitete Auflage

Herbert Rübber (Hrsg.)

# Uroonkologie

5., vollständig überarbeitete Auflage

Mit 175 Abbildungen und 269 Tabellen

**Prof. Dr. med. Herbert Rübben**

Direktor der Klinik und Poliklinik für Urologie  
Universitätsklinikum Essen  
Hufelandstraße 55  
45122 Essen

ISBN 978-3-642-01381-2 Springer Medizin Verlag Heidelberg

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie;  
detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funksendung, der Mikroverfilmung oder der Vervielfältigung auf anderen Wegen und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland vom 9. September 1965 in der jeweils geltenden Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtsgesetzes.

**Springer Medizin Verlag**

springer.de

© Springer Medizin Verlag Heidelberg 1994, 1997, 2001, 2007, 2009

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutzgesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Produkthaftung: Für Angaben über Dosierungsanweisungen und Applikationsformen kann vom Verlag keine Gewähr übernommen werden. Derartige Angaben müssen vom jeweiligen Anwender im Einzelfall anhand anderer Literaturstellen auf ihre Richtigkeit überprüft werden.

Planung: Peter Bergmann, Heidelberg  
Projektmanagement: Ina Conrad, Heidelberg  
Lektorat: Ursula Illig, Stockdorf  
Einbandgestaltung: deblik Berlin  
Schemata: bitmap, Mannheim  
Zeichnungen: E. W. Hanns, Gundelfingen

SPIN: 12640249

Satz: TypoStudio Tobias Schaedla, Heidelberg

# Inhaltsverzeichnis

## I Grundlagen

### 1 Molekularbiologie und Genetik ..... 3

*M.-O. Grimm, D. Wuttig, B. Wullich, W.A. Schulz*

- 1.1 Molekulare Grundlagen der Karzinogenese ..... 3  
 1.2 Molekularbiologische Untersuchungs-  
 methoden ..... 8

### 2 Hinweise zur Studienplanung, Biometrie und klinischen Epidemiologie ..... 17

*K.-H. Jöckel, H. Hirche, M. Neuhäuser*

- 2.1 Typen und Ziele klinischer Studien ..... 17  
 2.2 Studienplanung und -organisation ..... 22  
 2.3 Dokumentation und biometrische  
 Auswertung ..... 26  
 2.4 Anhang: Hinweise zur statistischen Beurteilung  
 von Mittelwerten und Prozentangaben anhand  
 von Vertrauensbereichen ..... 29

### 3 Lebensqualität in der Uroonkologie ..... 35

*T. Küchler, B. Bestmann*

- 3.1 Einleitung ..... 35  
 3.2 Das Lebensqualitätskonzept ..... 35  
 3.3 Ausblick ..... 41

### 4 Diagnose-, Prognose- und Therapieaufklärung ..... 43

*I. Kausch, M. Hohenfellner, D. Jocham*

- 4.1 Wunsch nach Aufklärung ..... 43  
 4.2 Emotionale Verarbeitung ..... 44  
 4.3 Anwesenheit von Angehörigen ..... 44  
 4.4 Aufklärung über Therapiestudien ..... 45

### 5 Moderne Bildgebung ..... 47

*A. Bockisch, M. Forsting, L.S. Freudenberg, T. Loch,  
 H. Rübber, J. Stattaus*

- 5.1 Sonographie ..... 47  
 5.2 Radiologie ..... 57  
 5.3 Nuklearmedizinische Diagnostik und  
 Therapie ..... 66

### 6 Grundlagen der Prävention ..... 73

*Schmitz-Dräger BJ, Lümmen G, für den Arbeitskreis  
 Prävention, Umwelt und komplementäre und  
 alternative Medizin (AK KAM) von DGU und BDU*

- 6.1 Einleitung ..... 73  
 6.2 Bedeutung der Prävention ..... 73

- 6.3 Ernährung und Nahrungsergänzung ..... 74  
 6.4 Lifestyle ..... 77  
 6.5 Chemoprävention ..... 79  
 6.6 Diskussion und Schlussfolgerung ..... 81

### 7 Grundlagen der Tumorchirurgie ..... 85

*C. Börgermann, H. Rübber*

- 7.1 Geschichte der Chirurgie ..... 85  
 7.2 Die Rolle der Anästhesie ..... 86  
 7.3 Die Rolle der Operation ..... 87

### 8 Harnableitung ..... 91

*R.E. Hautmann, U.E. Studer*

- 8.1 Einleitung ..... 91  
 8.2 Allgemeine Aspekte der Harnableitung ..... 91  
 8.3 Orthotoper Blasenersatz (Neoblase) ..... 95  
 8.4 Kontinente kutane Harnableitung (Pouch) ..... 106  
 8.5 Inkontinente Harnableitung ..... 108  
 8.6 Analsphinkterkontrollierte Harnableitungen ..... 110  
 8.7 Palliative Harnableitung ..... 113

### 9 Grundlagen der Radioonkologie ..... 117

*M. Stuschke, M. Schenck*

- 9.1 Therapietechniken ..... 117  
 9.2 Planung und Durchführung der konformalen  
 Strahlentherapie ..... 118  
 9.3 Technische Hilfsmittel bei der 3D-Planung ..... 119  
 9.4 Akkurate Zielvolumendefinition ..... 119  
 9.5 Präzision der Lagerung und Positionierung ..... 120  
 9.6 Bewertung von Dosisverteilungen ..... 120

### 10 Grundlagen der systemischen Therapie ..... 123

- 10.1 Neue Konzepte der systemischen Therapie ..... 123  
 10.2 Hinweise zur Prophylaxe und Therapie von  
 Komplikationen der Chemotherapie ..... 127  
 10.3 Prophylaxe und Therapie von Komplikationen  
 der Immuntherapie ..... 152

### 11 Supportive Maßnahmen ..... 169

*M. Schenck*

- 11.1 Einleitung ..... 169  
 11.2 Antiemetische Therapie ..... 169  
 11.3 Therapie und Prophylaxe der Obstipation ..... 173  
 11.4 Ernährung während der Tumorthherapie,  
 enterale und parenterale Ernährung ..... 174  
 11.5 Tumorbedingte Anämie, Bluttransfusion  
 und Erythropoetinsubstitution ..... 176  
 11.6 Fatigue bei Tumorerkrankungen ..... 178  
 11.7 Schmerztherapie ..... 179

<b>12 Grundlagen der Palliativmedizin</b> .....	<b>189</b>	<b>17 Uroonkologie beim älteren Patienten</b> .....	<b>275</b>
<i>M. Kloke, J. Hense, M. Stahl</i>		<i>U. Wedding, C. Friedrich, S. Krege</i>	
12.1 Definition und Inhalte der Palliativmedizin .....	189	17.1 Einleitung .....	275
12.2 Diagnose und Therapie von Tumorschmerzen .....	189	17.2 Komorbidität .....	275
12.3 Diagnose und Therapie von Symptomen des Gastrointestinaltraktes .....	195	17.3 Funktionelle Kapazität .....	277
12.4 Symptome des Respirationstraktes .....	198	17.4 Operatives Vorgehen im Alter .....	279
12.5 Palliative Sedierung .....	199	17.5 Chemotherapie im Alter .....	280
		17.6 Strahlentherapie im Alter .....	281
<b>13 Betreuung des unheilbar kranken und sterbenden Patienten und seiner Angehörigen</b> .....	<b>203</b>	<b>18 Rehabilitation</b> .....	<b>283</b>
<i>I. Kausch von Schmeling, M. Hohenfellner, D. Jocham</i>		<i>O. Dombo, M. Goepel, G. Müller, U. Otto, H. Rübben, H. Sperling</i>	
13.1 Was erlebt der sterbende Patient? .....	203	18.1 Allgemeine Grundlagen .....	283
13.2 Aufgaben des medizinischen Personals .....	203	18.2 Inkontinenz .....	300
13.3 Betreuung der Angehörigen .....	204	18.3 Rehabilitation der sexuellen Dysfunktion .....	305
13.4 Soziale Hilfen .....	205		
<b>14 Psychoonkologie – ganzheitliche Betreuung von Tumorpatienten</b> .....	<b>207</b>	<b>II Tumoren des Erwachsenenalters</b>	
<i>M. Schenck, W. Senf</i>		<b>19 Nebennierenrindenzarzinom</b> .....	<b>317</b>
14.1 Diagnose Krebs .....	207	<i>S. Petersenn, A. Bockisch, H. Rübben, K. Mann</i>	
14.2 Krebs und Psyche .....	207	19.1 Epidemiologie, Ätiologie .....	317
14.3 Psychoonkologische Versorgung .....	209	19.2 Onkologische Kennzeichen .....	317
14.4 Phasen der Anpassung .....	211	19.3 Diagnostik .....	319
<b>15 Komplementäre Therapieverfahren</b> .....	<b>215</b>	19.4 Therapie des lokal begrenzten Nebennieren- rindenzarzinoms .....	320
<i>F. Saha, G. Sütffels, N. Altner, G. Dobos</i>		19.5 Therapie des fortgeschrittenen Nebennieren- rindenzarzinoms .....	320
15.1 Einleitung .....	215	19.6 Nachsorge .....	323
15.2 Ernährung und Nahrungsergänzung .....	216	<b>20 Malignes Phäochromozytom</b> .....	<b>325</b>
15.3 Mind-Body-Medizin .....	230	<i>S. Petersenn, A. Bockisch, H. Rübben, K. Mann</i>	
15.4 Immunmodulatoren .....	235	20.1 Epidemiologie, Ätiologie .....	325
15.5 Enzyme .....	239	20.2 Onkologische Kennzeichen .....	326
15.6 Phytotherapie .....	239	20.3 Diagnostik .....	326
15.7 Homöopathie .....	245	20.4 Therapie des malignen Phäochromozytoms .....	328
15.8 Neuraltherapie .....	245	20.5 Nachsorge .....	329
15.9 Akupunktur .....	246	<b>21 Nierenzellkarzinom</b> .....	<b>331</b>
15.10 Nicht empfohlene Alternativverfahren .....	247	<i>G. Jakse, A. Heidenreich, M. Schenck</i>	
15.11 Komplementäre Symptombehandlung .....	248	21.1 Epidemiologie .....	331
15.12 Zusammenfassung .....	253	21.2 Pathologie .....	334
<b>16 Notfälle in der Uroonkologie</b> .....	<b>269</b>	21.3 Diagnostik .....	337
<i>T. Otto</i>		21.4 Therapie .....	339
16.1 Harnverhalt .....	269	21.5 Lokales Tumorrezidiv nach radikaler Tumornephrektomie .....	347
16.2 Harnblasentamponade .....	269	21.6 Metastasiertes Nierenzellkarzinom .....	347
16.3 Postrenales Nierenversagen .....	270	21.7 Nachsorge .....	355
16.4 Urosepsis .....	270		
16.5 Fournier-Gangrän .....	270		
16.6 Notfälle durch lokal destruierendes Tumorwachstum .....	270		
16.7 Komplikationen im Rahmen der Chemotherapie .....	272		

<b>22 Nierenbecken- und Harnleiterkarzinom</b> .....	<b>371</b>	<b>25 Prostatakarzinom</b> .....	<b>485</b>
<i>G. Jakse</i>		<i>Ch. Börgermann, F.K.-H. Chun, P. Fornara, M. Fröhner, M. Graefen, A. Haese, P. Hammerer, K. Heine, H. Huland, J. Köllermann, H. Loertzer, J. Luboldt, K. Miller, H. Rübben, T. Schlomm, M. Schostak, M. Schrader, R. Schwarz, A. Semjonow, S. Wagner, M. Wirth, J.M. Wolff</i>	
22.1 Epidemiologie, Ätiologie .....	371	25.1 Epidemiologie, Ätiologie .....	485
22.2 Onkologische Kennzeichen .....	373	25.2 Onkologische Kennzeichen .....	500
22.3 Diagnostik .....	376	25.3 Screening und Früherkennung .....	512
22.4 Therapie .....	380	25.4 Diagnostik .....	521
22.5 Therapie des Nierenbeckentumors .....	382	25.5 Therapie des lokal begrenzten Prostatakarzinoms .....	537
22.6 Therapie des Harnleitertumors .....	383	25.6 Therapie bei isoliertem PSA-Anstieg .....	555
22.7 Therapie bei Einzelniere/Restniere .....	384	25.7 Therapie des virginell metastasierten Prostatakarzinoms .....	563
22.8 Therapie bilateraler Tumoren .....	385	25.8 Therapie des hormonrefraktären metastasierten Prostatakarzinoms .....	580
22.9 Therapie des In-situ-Karzinoms .....	385	25.9 Behandlung prostatakarzinomspezifischer Komplikationen .....	598
22.10 Therapie seltener Harnleitertumoren .....	385	25.10 Nachsorge .....	601
22.11 Prognose .....	386	<b>26 Maligne Hodentumoren</b> .....	<b>637</b>
22.12 Nachsorge .....	387	<i>P. Albers, J. Beyer, J. Cläßen, K.-P. Dieckmann, J.T. Hartmann, M. Hartmann, A. Heidenreich, S. Krege, M.A. Kuczyk, F. Mayer, A.S. Merseburger, S. Seeber, R. Souchon, M. Stöckle</i>	
<b>23 Harnblasenkarzinom</b> .....	<b>395</b>	26.1 Epidemiologie, Ätiologie .....	637
<i>F. vom Dorp, A. Eisenhardt, P.J. Goebell, J. Gschwend, T. Jäger, G. Jakse, D. Jocham, A. Karl, S. Krege, G. Lümmlen, T. Otto, A. Rettenmeier, C. Rödel, H. Rübben, M. Schenck, K.W. Schmid, C. Stief, M. Stöckle, D. Zaak</i>		26.2 Onkologische Kennzeichen .....	641
23.1 Epidemiologie und Risikofaktoren .....	395	26.3 Diagnostik .....	648
23.2 Onkologische Kennzeichen (Definition von Tumorentitäten) .....	400	26.4 Therapie des Primärtumors .....	651
23.3 Diagnostik des Harnblasenkarzinoms .....	405	26.5 Therapie der testikulären intraepithelialen Neoplasie (TIN) .....	656
23.4 Therapie des oberflächlichen Urothelkarzinoms der Harnblase (Ta/T1 N0 M0) .....	412	26.6 Adjuvante Therapie beim Seminom CS I .....	658
23.5 Therapie des Carcinoma in situ der Harnblase .....	421	26.7 Adjuvante Therapie beim Nichtseminom CS I .....	670
23.6 Therapie des muskelinvasiven Urothelkarzinoms der Harnblase (T2–4 NX M0) .....	430	26.8 Therapie des gering retroperitoneal metastasierten Seminom CS IIA/B .....	676
23.7 Therapie des metastasierten Urothelkarzinom der Harnblase .....	444	26.9 Therapie des marker negativen Nichtseminoms CS IIA .....	681
23.8 Seltene Tumoren der Harnblase .....	452	26.10 Therapie der fortgeschrittenen Hodentumoren .....	684
23.9 Nachsorge des nichtinvasiven und des muskelinvasiven Urothelkarzinoms der Harnblase .....	459	26.11 Therapie bei refraktären Tumoren und Rezidiven .....	697
<b>24 Harnröhrenkarzinom</b> .....	<b>477</b>	26.12 Nachsorge .....	703
<i>S. Madersbacher, M. Marszalek, U.E. Studer</i>		26.13 Seltene Hodentumoren .....	709
24.1 Epidemiologie, Ätiologie .....	477	<b>27 Peniskarzinom</b> .....	<b>739</b>
24.2 Onkologische Kennzeichen .....	478	<i>I. Stancik, W. Hörtl, M. De Santis, G. Jakse</i>	
24.3 Diagnostik .....	480	27.1 Epidemiologie, Ätiologie .....	739
24.4 Therapie des lokal begrenzten Harnröhrenkarzinoms .....	481	27.2 Onkologische Kennzeichen .....	740
24.5 Therapie des fortgeschrittenen Harnröhrenkarzinoms .....	483	27.3 Diagnostik .....	741
24.6 Nachsorge .....	483	27.4 Therapie des lokal begrenzten Peniskarzinoms .....	742
24.7 Palliativtherapie .....	484		

27.5	Therapie des fortgeschrittenen Peniskarzinoms .....	742	32.5	Diagnostik und operative Therapie .....	794
27.6	Nachsorge .....	744	32.6	Chemotherapie .....	795
<b>28</b>	<b>Retroperitoneale Weichteiltumoren .....</b>	<b>749</b>	32.7	Keimstrang-Stromatumoren und seltene gonadale Tumoren .....	796
	<i>A. Eisenhardt, J. Schütte, M. Stuschke, G. Taeger</i>		<b>33</b>	<b>Weichteilsarkome .....</b>	<b>799</b>
28.1	Epidemiologie, Ätiologie .....	749		<i>T. Klingebiel, E. Koscielniak</i>	
28.2	Onkologische Kennzeichen .....	750	33.1	Einleitung .....	799
28.3	Diagnostik .....	753	33.2	Epidemiologie .....	799
28.4	Therapie des lokal begrenzten Tumors .....	756	33.3	Biologie und Pathologie .....	800
28.5	Therapie bei fortgeschrittenen Tumoren .....	760	33.4	Diagnostik .....	800
28.6	Nachsorge .....	760	33.5	Therapie .....	802
			33.6	Verlaufskontrollen .....	804
			33.7	Prognose .....	805
			33.8	Rezidiv .....	805
			33.9	Spätfolgen .....	805
			<b>34</b>	<b>Selbsthilfegruppen und überregionale Verbände und Organisationen .....</b>	<b>807</b>
				<i>I. Kausch von Schmeling, M. Hohenfellner, D. Jocham</i>	
				<b>Stichwortverzeichnis .....</b>	<b>809</b>

**III Tumoren des Kindes- und Jugendalters**

<b>29</b>	<b>Grundlagen .....</b>	<b>767</b>
	<i>B. Kremens</i>	
29.1	Prognose .....	768
29.2	Lokalisation .....	769
29.3	Kooperative Therapieoptimierungsstudien .....	769
<b>30</b>	<b>Neuroblastom .....</b>	<b>771</b>
	<i>B. Kremens, A. Eggert</i>	
30.1	Epidemiologie, Ätiologie .....	771
30.2	Onkologische Kennzeichen .....	772
30.3	Diagnostik .....	774
30.4	Therapie .....	774
30.5	Nachsorge .....	777
30.6	Palliativtherapie .....	777
<b>31</b>	<b>Nephroblastom .....</b>	<b>779</b>
	<i>B. Kremens</i>	
31.1	Epidemiologie, Ätiologie .....	779
31.2	Onkologische Kennzeichen .....	780
31.3	Diagnostik .....	784
31.4	Therapie .....	785
31.5	Therapiefolgen und Nachsorge .....	787
31.6	Histologisch ungewöhnliche Nierentumoren bei Kindern .....	787
<b>32</b>	<b>Keimzelltumoren bei Kindern und Jugendlichen .....</b>	<b>791</b>
	<i>D. Schneider</i>	
32.1	Einleitung .....	791
32.2	Epidemiologie .....	791
32.3	Pathologie und Biologie .....	792
32.4	Therapiestudien und klinische Versorgungsstruktur .....	793

# Mitarbeiterverzeichnis

## Prof. Dr. med. Peter Albers

Klinik für Urologie  
Universitätsklinikum Düsseldorf  
Moorenstraße 5  
40225 Düsseldorf

## Dr. phil. Nils Altner

Kliniken Essen Mitte  
Knappschaftskrankenhaus  
Am Deimelsberg 34 a  
45276 Essen

## Dr. biol. hum. Beate Bestmann

Referenzzentrum Lebensqualität  
Klinik für Allg. Chirurgie und  
Thoraxchirurgie  
Universitätsklinikum Schleswig-  
Holstein, Campus Kiel  
Arnold-Heller-Str. 5  
24105 Kiel

## Prof. Dr. med. Jörg Beyer

Klinik für Innere Medizin – Hämatologie  
und Onkologie  
Vivantes Klinikum Am Urban  
Dieffenbachstraße 1  
10967 Berlin

## Prof. Dr. med. Dr. rer. nat.

### Andreas Bokisch

Klinik für Nuklearmedizin  
Universitätsklinikum Essen  
Hufelandstr. 55  
45122 Essen

## Dr. med. Christof Börgermann

Klinik für Urologie, Kinderurologie  
und urologische Onkologie  
Krankenhaus Düren  
Roonstr. 30  
52351 Düren

## Dr. med. Felix Chun

Urologische Klinik  
Univ.-Klinikum Hamburg-Eppendorf  
Martinistr. 52  
20246 Hamburg

## Priv. Doz. Dr. med. Johannes Claßen

Klinik für Strahlentherapie und  
Radiologische Onkologie  
St. Vincentius-Kliniken Karlsruhe  
Steinhäuserstr. 18  
76135 Karlsruhe

## Dr. med. Maria De Santis

3. Medizinische Abteilung  
Zentrum für Onkologie und  
Hämatologie  
Kaiser Franz Josef Spital  
Kundratstraße 3  
01100 Wien

## Prof. Dr. med. Klaus-Peter Dieckmann

Urologische Abteilung  
Albertinen Krankenhaus  
Süntelstraße 11  
22457 Hamburg

## Prof. Dr. med. Gustav Dobos

Klinik für Innere Medizin V,  
Naturheilkunde u. Integrative Medizin  
Kliniken Essen-Mitte / Knappschafts-  
Krankenhaus  
Am Deimelsberg 34 a  
45276 Essen

## Priv. Doz. Dr. med. Christian Doehn

Klinik und Poliklinik für Urologie  
Universitätsklinikum Schleswig-  
Holstein (UK S-H), Campus Lübeck  
Ratzeburger Allee 160  
23538 Lübeck

## Dr. med O. Dombo

Westerwaldstraße 4a  
34131 Kassel

## Prof. Dr. med. Angelika Eggert

Klinik für Pädiatrische Hämatologie /  
Onkologie u. Endokrinologie  
Universitätsklinikum Essen  
Hufelandstr. 55  
45122 Essen

## Dr. med. Andreas Eisenhardt

Urologische Klinik  
St. Franziskus Hospital Maria Hilf GmbH  
Viersener Str. 450  
41063 Mönchengladbach

## Prof. Dr. med. Paolo Fornara

Universitätsklinik und Poliklinik für  
Urologie  
Universitätsklinikum Halle  
Ernst-Grube-Straße 40  
06120 Halle

## Prof. Dr. med. Michael Forsting

Institut für Diagnostische und  
Interventionelle Radiologie und  
Neuroradiologie  
Universitätsklinikum Essen  
Hufelandstr. 55  
45122 Essen

## Priv. Doz. Dr. med. Lutz Freudenberg

Klinik für Nuklearmedizin  
Universitätsklinikum Essen  
Hufelandstr. 55  
45122 Essen

## Dr. med. Christoph Alexander David Friedrich

Klinik für Altersmedizin und  
Frührehabilitation  
Universitätsklinik der Ruhr-  
Universität Bochum  
Marienhospital Herne  
Widumer Str. 8  
44627 Herne

## Dr. med. Michael Fröhner

Klinik und Poliklinik für Urologie  
Universitätsklinik »Carl Gustav Carus«  
Technische Universität Dresden  
Fletscherstraße 74  
01307 Dresden

## Dr. med. Peter-Jürgen Goebell

Urologische Klinik  
Universitätsklinikum Erlangen  
Krankenhausstr. 12  
91054 Erlangen



**Prof. Dr. med. Mark Goepel**

Klinik für Urologie, Kinderurologie  
und Urologische Onkologie  
Klinikum Niederberg  
Robert-Koch-Str. 2  
42549 Velbert

**Priv. Doz. Dr. med.  
Markus Graefen**

Urologische Klinik  
Univ.-Krankenhaus Eppendorf  
Martinistr. 52  
20251 Hamburg

**Priv. Doz. Dr. med. Marc-Oliver  
Grimm**

Urologische Klinik und Poliklinik  
Universitätsklinikum Carl Gustav Carus  
Fetscherstrasse 74  
01307 Dresden

**Prof. Dr. med. Jürgen Gschwend**

Urologische Klinik und Poliklinik  
Klinikum rechts der Isar der  
Technischen Universität München  
Ismaninger Str. 22  
81675 München

**Priv. Doz. Dr. med.  
Alexander Haese**

Urologische Klinik  
Univ.-Krankenhaus Eppendorf  
Martinistr. 52  
20251 Hamburg

**Prof. Dr. med. Peter Hammerer**

Städt. Klinikum Braunschweig  
Urologische Klinik  
Salzdahlumer Straße 90  
38126 Braunschweig

**Dr. med. Michael Hartmann**

Horstweg 2A  
22391 Hamburg

**Prof. Dr. med. Jörg T. Hartmann**

Med. Klinik und Poliklinik II  
Universitätsklinikum Tübingen  
Otfried-Müller-Str. 10  
72076 Tübingen

**Prof. Dr. med. Richard Hautmann**

Klinik für Urologie und Kinderurologie  
Universitätsklinikum Ulm  
Prittwitzstr. 43  
89075 Ulm

**Prof. Dr. med. Axel Heidenreich**

Urologische Klinik  
Universitätsklinikum der RWTH Aachen  
Pauwelstr. 30  
52057 Aachen

**Dr. med. Karsten Heine**

Charitaskrankenhaus  
Urologische Klinik  
Uhlandstraße 7  
97980 Bad Mergentheim

**Dr. med. Jörg Hense**

Innere Klinik und Poliklinik  
(Tumorforschung)  
Universitätsklinikum Essen  
Hufelandstraße 55  
45122 Essen

**Herbert Hirche**

Viehauser Berg 147  
45239 Essen

**Univ.-Prof. Dr. med. Wolfgang Höttl**

Urologische Abteilung  
Kaiser Franz Josef Spital  
Kundratstraße 3  
A-1100 Wien

**Prof. Dr. med. Markus Hohenfellner**

Urologische Universitätsklinik  
Universitätsklinikum Heidelberg  
Im Neuenheimer Feld 110  
69120 Heidelberg

**Prof. Dr. med. Hartwig Huland**

Urologische Klinik  
Univ.-Krankenhaus Eppendorf  
Martinistr. 52  
20251 Hamburg

**Diplom-Gesundheitsökonom (Bl)**

**Dr. med. Tobias Jäger (FEBU)**  
Rüttenscheider Stern 5  
45130 Essen

**Prof. Dr. med. Gerhard Jakse**

Rue Gorhez 345  
B-4880 Aubel

**Prof. Dr. med. Dieter Jocham**

Urologische Klinik  
Universitätsklinikum Schleswig-  
Holstein, Campus Lübeck  
Ratzeburger Allee 160  
23538 Lübeck

**Priv. Doz. Dr. med. Ingo Kausch  
von Schmeling**

Klinik für Urologie  
Universitätsklinikum Schleswig-  
Holstein Campus Lübeck – Haus 13  
Ratzeburger Allee 160  
23538 Lübeck

**Prof. Dr. med. Thomas Klingebiel**

Klinik für Kinderheilkunde III  
Klinikum der Johann Wolfgang Goethe  
Universität  
Theodor-Stern-Kai 7  
60590 Frankfurt a.M.

**Dr. med. A. Karl**

Urologische Klinik und Poliklinik  
Klinikum Großhadern Ludwig-  
Maximilians-Universität  
Marchioninstr. 15  
81377 München

**Dr. med. Marianne Kloke**

Klinik für Innere Medizin IV,  
Internistische Onkologie/Hämatologie  
Kliniken Essen-Mitte Huysensstift  
Henricistr. 92  
45136 Essen

**Priv.-Doz. Dr. med J. Köllermann**

Institut für Pathologie  
Universitätsklinikum Hamburg-  
Eppendorf  
Martinistr. 52  
20246 Hamburg

**Prof. Dr. med. Ewa Koscielniak**

Pädiatrisches Zentrum, Olgahospital  
Klinikum Stuttgart  
Bismarckstraße 8  
70176 Stuttgart

**Priv. Doz. Dr. med. S. Krege**

Klinik für Urologie  
Krankenhaus Maria Hilf  
Oberdießener Str. 94  
47805 Krefeld

**Prof. Dr. med. Bernhard Kremens**

Klinik für Pädiatrische Hämatologie /  
Onkologie u. Endokrinologie  
Universitätsklinikum Essen  
Hufelandstr. 55  
45122 Essen

**Prof. Dr. med. Marcus A. Kuczyk**

Klinik für Urologie  
Eberhard Karls Universität Tübingen  
Hoppe-Seyler-Str. 3  
72076 Tübingen

**Prof. Dr. phil. Thomas Küchler**

Referenzzentrum Lebensqualität Klinik  
für Allgemein- und Thoraxchirurgie  
Universitätsklinikum Schleswig  
Holstein, Campus Kiel  
Arnold-Heller-Str. 7  
24105 Kiel

**Prof. Dr. med. Tilmann Loch**

Klinik für Urologie  
Ev. Luth. Diakonissenanstalt Flensburg  
Knuthstr. 1  
24939 Flensburg

**Dr. med. Hagen Loertzer**

Zentrum Chirurgie, Abteilung Urologie  
Universitätsmedizin Göttingen  
Robert-Koch-Str. 40  
37075 Göttingen

**Priv. Doz. Dr. med. G. Lümmen**

Abt. für Urologie, Uroonkologie  
und Kinderurologie  
St. Josef Hospital  
Hospitalstraße 46  
53840 Troisdorf

**Priv. Doz. Dr. med. Hans-Joachim Luboldt**

Wallstraße 34  
46535 Dinslaken

**Univ. Doz. Dr. Stephan Madersbacher**

Abt. für Urologie und Andrologie  
Donauspital SMZO  
Langobardenstr. 122  
A-1220 Wien

**Prof. Dr. med. Klaus Mann**

Abt. für Endokrinologie  
Universitätsklinikum Essen  
Hufelandstr. 55  
45122 Essen

**Dr. med. Martin Marszalek**

Abt. für Urologie und Andrologie  
Donauspital SMZO  
Langobardenstr. 122  
A-1220 Wien

**Priv. Doz. Dr. med. Frank Mayer**

Medizinische Klinik, Abteilung II  
Universitätsklinikum Tübingen  
Otfried-Müller-Str.10  
72076 Tübingen

**Dr. med. Axel S. Merseburger**

Klinik für Urologie und Urologische  
Onkologie  
Medizinische Hochschule Hannover  
Carl-Neuberg-Str.  
30625 Hannover

**Prof. Dr. med. Kurt Miller**

Urologische Klinik  
Charité – Campus Benjamin Franklin  
Freie Humboldt-Universität zu Berlin  
Hindenburgdamm 30  
12203 Berlin

**Dr. med. Guido Müller**

Klinik Quellental  
Wiesenweg 6  
34537 Bad Wildungen

**Prof. Dr. Markus Neuhäuser**

Rhein Ahr Campus  
Fachbereich Mathematik und Technik  
Südallee 2  
53424 Remagen

**Dr. med. Christian Niedworok**

Klinik und Poliklinik für Urologie,  
Uroonkologie und Kinderurologie,  
Universitätsklinikum Essen,  
Hufelandstr. 55  
45122 Essen

**Prof. Dr. med. Thomas Otto**

Klinik für Urologie  
Städt. Kliniken Neuss/Lukaskranken-  
haus GmbH  
Preußenstraße 84  
41646 Neuss

**Prof. Dr. med. Ullrich Otto**

Rehabilitationsabt. Urologie/Onkologie  
Klinik Quellental  
Wiesenweg 6  
34537 Bad Wildungen

**Prof. Dr. med. Stephan Petersenn**

Klinik für Endokrinologie  
Universitätsklinikum Essen  
Hufelandstraße 55  
45122 Essen

**Christian Rehme**

Klinik und Poliklinik für Urologie,  
Uroonkologie und Kinderurologie,  
Universitätsklinikum Essen,  
Hufelandstr. 55  
45122 Essen

**Prof. Dr. med. Albert Rettenmeier**

Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin  
Universitätsklinikum Essen  
Hufelandstr. 55  
45122 Essen

**Prof. Dr. med. Claus Rödel**

Strahlenklinik  
Klinikum der Johann Wolfgang Goethe  
Universität  
Theodor-Stern-Kai 7  
60590 Frankfurt a.M.

**Prof. Dr. med. Herbert Rübber**

Klinik u. Poliklinik für Urologie  
Universitätsklinikum Essen  
Hufelandstr. 55  
45122 Essen

**Dr. med. Felix Joyonto Saha**

Klinik für Innere Medizin V  
Naturheilkunde u. Integrative Medizin  
Kliniken Essen Mitte  
Evang. HuysSENS Stiftung/Knappschaft  
gGmbH  
Am Deimelsberg 34 a  
45276 Essen

**Dr. med. Marcus Schenck**

Klinik für Urologie  
Universitätsklinikum Essen  
Hufelandstraße 55  
45122 Essen

**Dr. med. Thorsten Schlomm**

Urologische Klinik  
Univ.-Krankenhaus Eppendorf  
Martinistr. 52  
20246 Hamburg

**Dr. med. Martin Schostak**

Urologische Universitätsklinik  
Klinik Steglitz der FU Berlin  
Hindenburgdamm 30  
12203 Berlin

**Prof. Dr. med. Kurt Werner Schmid**

Institut für Pathologie und  
Neuropathologie  
Universitätsklinikum Essen  
Hufelandstr. 55  
45122 Essen

**Prof. Dr. med. Bernd  
Schmitz-Dräger**

Urologische Gemeinschaftspraxis  
Euro Med. Clinic  
Europa-Allee 1  
90763 Fürth

**Priv. Doz. Dr. med. Dominik  
Schneider**

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Klinikum Dortmund GmbH  
Beurhausstraße 40  
44137 Dortmund

**Priv. Doz. Dr. med. Mark Schrader**

Urologische Universitätsklinik  
Klinik Steglitz der FU Berlin  
Hindenburgdamm 30  
12203 Berlin

**Prof. Dr. med. H. Joachim Schütte**

Chefarzt der Abt. Onkologie/  
Hämatologie  
Marienhospital Düsseldorf  
Rochusstraße 2  
40479 Düsseldorf

**Prof. Dr. med. Martin Schuler**

Klinik für Tumorforschung  
Universitätsklinikum Essen  
Hufelandstr. 55  
45122 Essen

**Prof. Dr. rer.nat. Wolfgang Arthur  
Schulz**

Laborleiter der Urologischen Klinik  
Universitätsklinikum Düsseldorf  
Moorenstraße 5  
40225 Düsseldorf

**Dr. med. Rudolf Schwarz**

Bereich Strahlentherapie  
Ambulanzzentrum GmbH des UKE  
Martinistr. 52  
20246 Hamburg

**Prof. Dr. med. Siegfried Seeber**

Klinik für Innere Medizin IV: Internisti-  
sche Onkologie und Hämatologie  
Kliniken Essen Mitte  
Evang. HuysSENS-Stiftung  
Henricistr. 92  
45136 Essen

**Priv. Doz. Dr. med. Axel Semjonow**

Urologische Klinik und Poliklinik  
Universitätsklinikum Münster  
Albert-Schweitzer Str. 33  
48149 Münster

**Prof. Dr. med. Wolfgang Senf**

Klinik für Psychosomatische Medizin  
und Psychotherapie  
LVR-Klinikum Essen  
Virchowstr. 174  
45147 Essen

**Prof. Dr. med. Rainer Souchon**

MVZ Radioonkologie/Med. Genetik  
UKT  
Hoppe-Seyler-Str. 3  
72076 Tübingen

**Priv. Doz. Dr. med. Herbert Sperling**

Klinik f. Urologie  
Kliniken Maria Hilf GmbH Krankenhaus  
St. Franziskus  
Viersener Str. 450  
41063 Mönchengladbach

**Dr. med. Michael Stahl**

Klinik für Innere Medizin IV  
Internistische Onkologie/Hämatologie  
Kliniken Essen Mitte  
Evang. HuysSENS-Stiftung  
Henricistr. 92  
45136 Essen

**Dr. med. Igor Stancik**

Klinik für Urologie  
Krankenhaus Hietzing  
Wolkersbergenstraße 1  
A-1130 Wien

**Priv.-Doz. Dr. med. Jörg Stattaus**

Radiologie  
Universitätsklinikum Essen  
Hufelandstr. 55  
45122 Essen

**Prof. Dr. med. Christian Stief**

Urologische Klinik und Poliklinik  
Klinikum Großhadern Ludwig-  
Maximilians-Universität  
Marchioninstr. 15  
81377 München

**Prof. Dr. med. Michael Stöckle**

Klinik für Urologie  
Universitätskliniken des Saarlandes  
Kirrbergerstr. 1  
66421 Homburg/Saar

**Prof. Dr. med Urs Studer**

Urologische Abteilung  
Inselspital  
CH-3010 Bern

**Prof. Dr. med. M. Stuschke**

Klinik f. Strahlentherapie  
Universitätsklinikum Essen  
Hufelandstr. 55  
45122 Essen

**Dr. Gerrit Sütfels**

Goethestraße 80  
40237 Düsseldorf

**Priv. Doz. Dr. med. Georg Täger**

Klinik für Unfallchirurgie  
Universitätsklinikum Essen  
Hufelandstr. 55  
45122 Essen

**Dr. med. Frank vom Dorp**

Klinik f. Urologie  
Universitätsklinikum Essen  
Hufelandstraße 55  
45122 Essen

**Dr. med. Sigfried Wagner**

Universitätsklinik und Poliklinik  
für Urologie  
Universitätsklinikum Halle  
Ernst-Grube-Straße 40  
06120 Halle

**Dr. med. Ulrich Wedding**

Klinik und Poliklinik für Innere  
Medizin II  
Universitätsklinikum Jena  
Erlanger Allee 101  
07747 Jena

**Prof. Dr. med. Manfred Wirth**

Klinik u. Poliklinik für Urologie  
Universitätsklinikum Carl Gustav Carus  
Dresden  
Fetscherstraße 74  
01317 Dresden

**Prof. Dr. med. Johannes M. Wolff**

Allgem. Krankenhaus Viersen  
Urologische Klinik  
Hoserkirchweg 63  
41747 Viersen

**Prof. Dr. med. Bernd Wullich**

Klinik für Urologie u. Kinderurologie  
Universitätsklinikum Erlangen  
Krankenhausstr. 12  
91054 Erlangen

**Dipl.-Chem. Daniela Wuttig**

Urologische Klinik und Poliklinik  
Universitätsklinikum Carl Gustav Carus  
an der Technischen Universität Dresden  
Fetscherstraße 74  
01307 Dresden

**Priv. Doz. Dr. med. Dirk Zaak**

Praxiszentrum Traunstein, Urologie,  
Kinderurologie, Andrologie  
Urologische Gemeinschaftspraxis  
Wasserburger Str. 1  
83278 Traunstein

# I Grundlagen

- 1 Molekularbiologie und Genetik – 3
- 2 Hinweise zur Studienplanung, Biometrie und klinischen Epidemiologie – 17
- 3 Lebensqualität in der Uroonkologie – 35
- 4 Diagnose-, Prognose- und Therapieaufklärung – 43
- 5 Moderne Bildgebung – 47
- 6 Grundlagen der Prävention – 73
- 7 Grundlagen der Tumorchirurgie – 85
- 8 Harnableitung – 91
- 9 Grundlagen der Radioonkologie – 117
- 10 Grundlagen der systemischen Therapie – 123
- 11 Supportive Maßnahmen – 169
- 12 Grundlagen der Palliativmedizin – 189
- 13 Betreuung des unheilbar kranken und sterbenden Patienten und seiner Angehörigen – 203
- 14 Psychoonkologie – ganzheitliche Betreuung von Tumorpatienten – 207
- 15 Komplementäre Therapieverfahren – 215
- 16 Notfälle in der Uroonkologie – 269
- 17 Uroonkologie beim älteren Patienten – 275
- 18 Rehabilitation – 283

# Molekularbiologie und Genetik

*M.-O. Grimm, D. Wuttig, B. Wullich, W.A. Schulz*

## 1.1 Molekulare Grundlagen der Karzinogenese – 3

## 1.2 Molekularbiologische Untersuchungsmethoden – 8

Durch die Entwicklung von »targeted drugs«, deren Wirksamkeit auf der Inhibition bedeutsamer biologischer Prozesse der Tumorzelle beruht, hat die Kenntnis molekularer Veränderungen solider Tumoren einen neuen Stellenwert im klinischen Alltag erhalten. Es ist erkennbar geworden, dass sich die »Molekulare Diagnostik« nicht nur zum Nachweis von Tumoren eignet, sondern uns darüber hinaus in die Lage versetzen wird, über den Genotyp das klinische Verhalten eines Tumors vorherzusagen. Dies kann z. B. für die Einschätzung der Prognose nach operativer Therapie, die Wahl einer Therapie (z. B. adjuvant) oder die Auswahl von »targeted drugs« genutzt werden.

Die folgenden Abschnitte geben eine Übersicht über die molekularen Grundlagen von Krebserkrankungen. Darüber hinaus werden relevante molekularbiologische Techniken dargestellt. Spezifische molekulare Veränderungen und deren klinische Bedeutung sind den einzelnen Organkapiteln zugeordnet.

### 1.1 Molekulare Grundlagen der Karzinogenese

Für die neoplastische Transformation einer normalen Zelle sind zahlreiche genetische und epigenetische Veränderungen erforderlich. Die Zahl an Veränderungen ist nicht genau bekannt und variiert von Tumor zu Tumor. Systematische Sequenzanalysen von Tumor-DNA haben Schätzungen von 100–1000 Punktmutationen in einigen

Karzinomen ergeben; in anderen finden sich überwiegend chromosomale Aberrationen, Verluste, Zugewinne und Rearrangements.

Dabei sind Tumorzellen aus molekularbiologischer Sicht durch folgende Charakteristika gekennzeichnet (Hanahan u. Weinberg 2000):

- Selbstversorgung mit Wachstumssignalen,
- Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen,
- Umgehung der Apoptose,
- Unbegrenztes replikatives Potenzial,
- Fortwährende Angiogenese,
- Gewebsinvasion und Metastasierung,

Diese Eigenschaften werden durch Veränderungen in bestimmten Genen hervorgerufen. Dazu zählen die positiv regulierenden, d. h. proliferationsfördernden Protoonkogene, und die negativ regulierenden, proliferationshemmenden Tumorsuppressorgene. Bei beiden Gruppen handelt es sich um zelleigene Gene. Sie wirken als Bestandteile bestimmter zellulärer Regulationssysteme, besonders der Zellzyklusregulation.

#### 1.1.1 Onkogene

Die sog. Protoonkogene wirken physiologisch positiv regulierend auf Wachstum, Proliferation und Differenzierung. Sie können für eine Reihe verschiedener Proteine,

■ Tab. 1.1. Beispiele für Onkogene und deren Funktion

Onkogen	Tumor	Aktivierungsmechanismus	Zelluläre Lokalisation	Biochemische Funktion
FGF1	Diverse solide Karzinome	Überexpression	Extrazellulär	Wachstumsfaktor
IGF2	Diverse Karzinome	Überexpression	Extrazellulär	Wachstumsfaktor
ERBB1	Diverse Karzinome	Überexpression, Mutation	Zellmembran	Tyrosinkinase
ERBB2	Bestimmte Karzinome	Überexpression	Zellmembran	Tyrosinkinase
KIT	Hodentumoren, Gastrointestinale Stromatumoren	Mutation	Zellmembran	Tyrosinkinase
RET	Schilddrüsen- und andere endokrine Karzinome	Mutation, Inversion	Zellmembran	Tyrosinkinase
MET	Niere und andere Karzinome	Mutation, Überexpression	Zellmembran	Tyrosinkinase
IGFRI	Leberzell- und andere Karzinome	Überexpression, Mutation (?)	Zellmembran	Tyrosinkinase
HRAS	Diverse Karzinome	Mutation	Innere Zellmembran	GTP-bindendes Protein
NRAS	Diverse Karzinome	Mutation	Innere Zellmembran	GTP-bindendes Protein
KRAS	Diverse Karzinome	Mutation	Innere Zellmembran	GTP-bindendes Protein
BRAF	Melanom, Kolon- und bestimmte andere Karzinome	Mutation	Innere Zellmembran, Zytoplasma	Tyrosinkinase
CTNNB1	Kolon- und Leberzellkarzinome, andere	Mutation	Innere Zellmembran, Zytoplasma, Zellkern	Zytoskelett, Transkriptionsaktivierung
MYC	Diverse Karzinome	Translokation, Überexpression, Mutation	Zellkern	Transkriptionsfaktor
CDK4	Bestimmte Karzinome	Überexpression, Mutation	Zellkern	Zellzyklus Regulation
BCL2	Follikuläres Lymphom und diverse Karzinome	Translokation, Überexpression	Mitochondrien	Apoptose Regulation

z. B. Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren, Signaltransduktoren (G-Proteine), Proteinkinasen oder Transkriptionsfaktoren kodieren. Somatische Mutationen der Protoonkogene führen zu ihrer Aktivierung zum Onkogen und zur unkontrollierten Proliferation. Die Mutationen können Proteine mit veränderten Eigenschaften erzeugen oder zur Überproduktion eines unveränderten Onkoproteins führen. Eine nach Funktion der zugehörigen Proteine gegliederte Auswahl von Proto-Onkogenen findet sich in ■ Tab. 1.1.

Aktivierungen bestimmter Onkogene sind für manche Tumorentitäten charakteristisch und korrelieren mit dem klinischen Verlauf (z. B. NMYC beim Neuroblastom, BCR-ABL bei chronischer myeloischer Leukämie).

### 1.1.2 Tumorsuppressorgene

Eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen erfordert in der Regel Veränderungen beider Allele. Dies kann durch eine Kombination von Punktmutationen, Genverlusten

durch Chromosomenaberrationen oder einen epigenetischen Mechanismus, die DNA-Hypermethylierung, erfolgen (Jones u. Baylin 2002). Dabei treten bei sporadischen Tumoren die Veränderungen beider Allele voneinander unabhängig auf. Bei familiären Formen wird ein mutiertes Allel von einem Elternteil ererbt. Das mutierte Allel ist dabei auf der Ebene der einzelnen Zelle in der Regel rezessiv: erst wenn das verbleibende intakte Allel durch eine zweite – somatische – Mutation inaktiviert wird, kommt es zur Tumorentstehung. Eine Übersicht familiärer Krebs syndrome und zugehöriger Tumorsuppressorgene gibt ■ Tab. 1.2.

Die Deregulation von Protoonko- und Tumorsuppressorgenen im Tumor wird durch die ungehemmte Proliferation als charakteristisches Merkmal von entarteten Zellen verdeutlicht. An der Kontrolle der Proliferation ist eine Reihe von Faktoren beteiligt. Dazu gehören extrinsische, z. B. diffundierende Wachstumsinhibitoren und Signale von anliegenden Zellen (Zell-Zell-Kontakt) sowie intrinsische Faktoren. Diese Signale müssen entlang einer Signalkette zum Zellkern übertragen werden, wo die Replikationskontrolle stattfindet.

■ Tab. 1.2. Einige vererbte Krebs syndrome beim Menschen

Syndrom	Gen	Genlokus	Tumorlokalisation	Funktion
Retinoblastom	RB1	13q14	Auge, Knochen	Gatekeeper-Tumorsuppressor
Li-Fraumeni-Syndrom	TP53	17p13.1	Viele Organe	Caretaker-Tumorsuppressor
Hereditäres Melanom und Pankreaskarzinom	CDKN2A	9p21	Haut, Pankreas, andere	Gatekeeper-Tumorsuppressor
Familiäre Adenomatosis polyposis coli	APC	5q21	Kolon, Rektum, andere	Gatekeeper-Tumorsuppressor
Cowden-Syndrom	PTEN	10q23.3	Viele Organe	Gatekeeper-Tumorsuppressor
Von-Hippel-Lindau-Syndrom	VHL	3p25	Niere, Nebenniere, andere	Gatekeeper-Tumorsuppressor
Hereditäres Mamma- und Ovarialkarzinom	BRCA1, BRCA2	17q21, 13q12	Brust, Ovar	Caretaker-Tumorsuppressor
HNPCC	MLH1, MSH2, andere	3p21, 2p15-16	Kolon, Endometrium, Magen, andere	Caretaker-Tumorsuppressor

■ Tab. 1.3. Übersicht über Signalkaskaden bei Krebs

Signalweg oder Netzwerk	Krebsarten	Onkogene im Signalweg	Tumorsuppressorgene im Signalweg	Anmerkungen
MAPK-Signalweg (kanonisch)	Viele	RAS, BRAF, (MYC)		Vermittelt die Wirkung vieler Tyrosinkinase-rezeptoren
PI3K-Signalweg	Viele	PI3K, AKT	PTEN, CTMP	Vermittelt die Wirkung vieler Tyrosinkinase-rezeptoren
TGF $\beta$ -Signalweg	Karzinome, bestimmte Sarkome und Leukämien		TGF $\beta$ RII, SMAD2, SMAD4, RUNX	z. T. hemmend, z. T. fördernd bei der Tumorbildung
JAK/STAT-Signalweg	Bestimmte Karzinome, viele Leukämien und Lymphome	STAT3, STAT5(?)	STAT1(?), SOCS1	Vermittelt die Wirkung besonders von Zytokinrezeptoren
NF $\kappa$ B-Signalweg	Bestimmte Leukämien, viele Karzinome	REL Proteine	CYLD	Wirkung stark abhängig vom zellulären Kontext
WNT-Signalweg	Besonders Karzinome im Gastrointestinaltrakt	WNT1, $\beta$ -Catenin	APC, AXIN, SFRP	Beeinflusst auch durch E-Cadherin
SHH-Signalweg	Bestimmte Haut-, Gehirn und Lungentumoren	SHH(?), SMO, GLI1(?)	PTCH1, PTCH2, SUFU	Stimuliert Gewebevorläuferzellen
NOTCH-Signalweg	T-Zelllymphome, Karzinome	NOTCH1; JAG1(?)	NOTCH1	Wirkung extrem stark abhängig vom Zelltyp

In vielen dieser Kaskaden (■ Tab. 1.3) sind Onkogene als positive, Tumorsuppressorproteine dagegen als negative Regulatoren (»gatekeeper«, »caretaker«) zu finden. »Gatekeeper« sind solche Proteine, die direkt die zelluläre Proliferation kontrollieren, während »caretaker« das Genom stabilisieren. Zu der ersten Gruppe gehören solche, die eine Rolle in der Zellteilung oder der Apoptose spielen, zu letzteren solche, die an Zellzyklus-»Checkpoints« oder DNA-Reparatur beteiligt sind (Kinzler u. Vogelstein 1997).

### 1.1.3 Modell der »Mehrschrittkarzinogenese«

Die Entwicklung eines Tumors beruht auf der Störung des komplexen Gleichgewichts von proliferationsfördernden und -hemmenden Signalen. Aktivierung von Onkogenen oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen verschiebt das Gleichgewicht in Richtung Proliferation. Da die Zellproliferation und Zelldifferenzierung durch das Zusammenwirken mehrerer Signalwege reguliert werden, ist das Ungleichgewicht in Tumorzellen in der Regel das



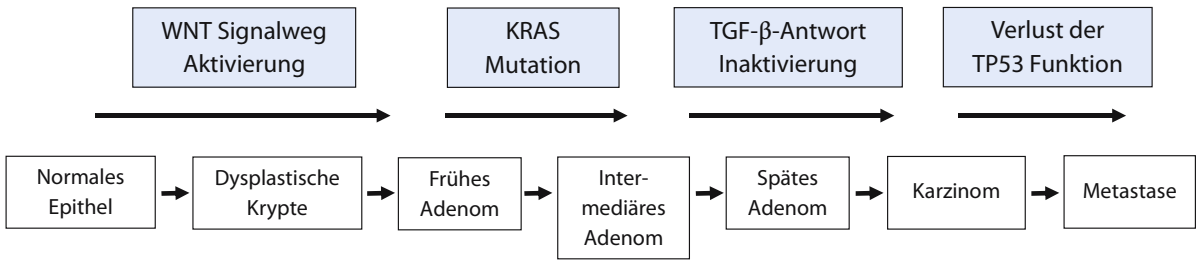


Abb. 1.1. Hypothetischer Ablauf der Karzinogenese beim kolorektalen Karzinom. (Nach Schulz 2007)

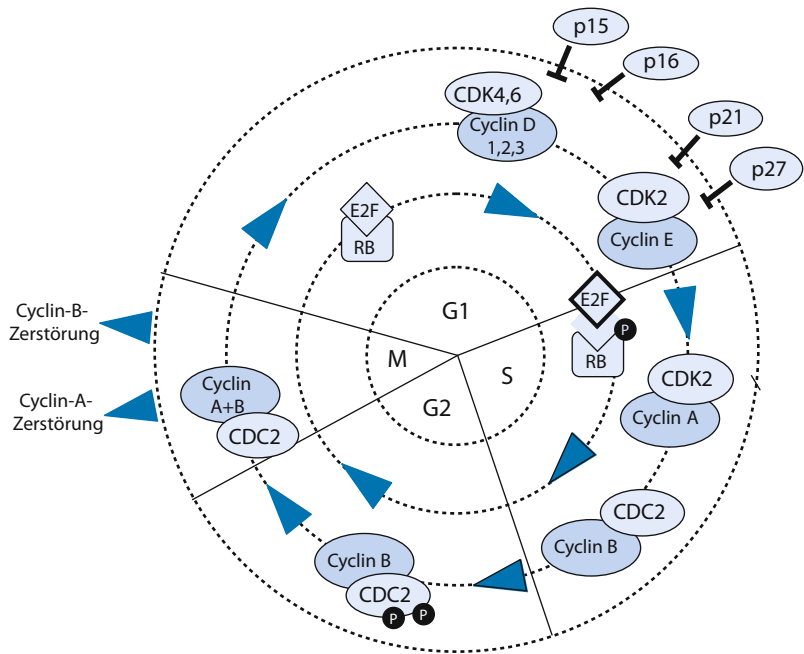


Abb. 1.2. 3 Ebenen der Zellzyklusregulation: Die Abbildung zeigt den Übergang G1→S. Die innere Schicht besteht aus dem RB1-Phosphorylierungszyklus, der die E2F-Aktivität bestimmt. Der RB1-Zyklus ist von der zweiten Ebene, dem CDK/Zyclin-Zyklus, abhängig. Dieser wird seinerseits durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung der CDK sowie die CDK-Inhibitoren reguliert (3. Ebene). (Nach Schulz 2007)

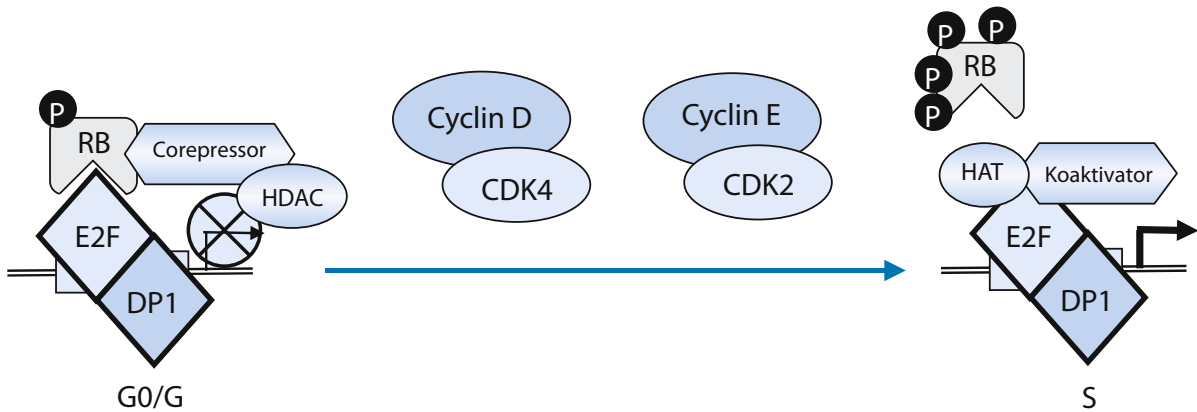
Ergebnis zahlreicher genetischer Veränderungen, die sich nacheinander entwickeln. Beim kolorektalen Karzinom lassen sich genetische und morphologische Veränderungen bei der Entwicklung von normalem Epithel über benigne Vorstufen bis hin zum metastasierenden Karzinom einander zuordnen (Abb. 1.1). Entsprechende Modelle sind auch für die Tumoren des Urogenitaltraktes vorgeschlagen worden.

### 1.1.4 Zellzyklusregulation

Die physiologische Abfolge der Zellzyklusphasen wird im Wesentlichen durch Phosphorylierung von Proteinen gesteuert. Eine Gruppe von Proteinkinasen bildet den Kern der Zellzyklusmaschinerie. Diese sog. CDK (»cyclin dependent kinases«, zyclinabhängige Proteinkinasen) stellen

Heterodimere aus einer katalytischen Kinase- und einer regulatorischen Zyclinuntereinheit dar. Für die Aktivierung der Proteinkinaseeigenschaft müssen die CDK darüber hinaus selber phosphoryliert werden. Spezifische Kombinationen zwischen verschiedenen Zyclinen und Kinasen sind charakteristisch für jede Phase des Zellzyklus. Wenn die Zellen die G<sub>0</sub>-Phase verlassen, um in die G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus einzutreten, werden D-Typ-Zycline (D1, D2 und D3) und etwas später Zyclin E synthetisiert. Dagegen sind die Zycline A und B für die Regulation der DNA-Synthese-Phase, der G<sub>2</sub>-Phase und der Mitose verantwortlich.

Die D-Zycline komplexieren mit den katalytischen Kinase-Untereinheiten CDK4 und CDK6, Zyclin E mit der CDK2. Die Zyclin-A-mRNA-Expression steigt nachdem sich die Zyclin-E-CDK2-Komplexe gebildet haben und die Aktivierung von CDK1 durch Zyclin A und B erlaubt schließlich den Übergang in die Mitose (Abb. 1.2).



■ **Abb. 1.3.** Funktion von RB1 in der Zellzyklusregulation. Das hypophosphorylierte RB1-Protein bindet Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie. Während der G1-Phase wird RB1 sukzessive durch die Cyclin-D-CDK4- und Cyclin-E-CDK2-Komplexe phosphoryliert, was zur

Freisetzung von E2F führt und damit durch Transkription von E2F-abhängigen Genen den Übergang in die S-Phase ermöglicht. DP1 ist ein Heterodimer-Partner von E2F. *HDAC* Histone Deacetylase; *HAT* Histone Acetyltransferase. (Nach Schulz 2005)

Die CDK unterliegen einer negativen Regulation durch Inhibitorproteine (zyklinabhängige Kinasen, CKI). Es können zwei Klassen von CKI unterschieden werden: Die **KIP/CIP-Familie** ist eine Gruppe strukturell verwandter Proteine (p21, p27, p57), die alle in der Lage sind, verschiedene Cyclin-CDK Komplexe zu binden und zu inhibieren. In der Zelle ist ihr hauptsächliches Ziel wohl der Cyclin-E-CDK2-Komplex. Die Rolle der verschiedenen Proteine *in vivo* liegt daher in der Vermittlung der Zellantwort auf charakteristische mitogene und antimitogene Signale. Während z. B. p21 den durch p53 regulierten Zellzyklus-Arrest nach DNA-Schädigung vermittelt, löst p27 einen Zellzyklusarrest als Folge von Serumentzug, Kontaktinhibition oder Einwirkung von TGF- $\beta$  aus.

Die zweite Klasse von CKI, die vier verwandten Moleküle p15, p16, p18 und p19, werden als **INK4-Proteine** bezeichnet. Im Gegensatz zu den Proteinen der KIP/CIP-Familie sind die INK4 Proteine spezifische Inhibitoren der Cyclin-CDK-Komplexe Cyclin D-CDK4 und Cyclin D-CDK6. Die INK4 Proteine kompetieren im Gegensatz zur KIP/CIP-Familie *in vivo* mit den Zyklinen um CDK-Monomere (■ Abb. 1.3). Das p15<sup>INK4B</sup>-Protein spielt eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der antimitogenen Wirkung von TGF- $\beta$ . Das p16<sup>INK4A</sup>-Protein besitzt eine sehr lange Lebensdauer und akkumuliert daher allmählich über viele Zellzyklen hinweg. Diese Akkumulation wird als eine Ursache der mit der Seneszenz von Zellen einhergehenden verminderten Proliferationsfähigkeit angesehen (Evan u. Vousden 2001).

Der Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus ist derzeit am besten charakterisiert: Das RB1-Protein bindet in seiner aktiven, d. h. hypophosphorylier-

ten Form Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie. Diese Transkriptionsfaktoren aktivieren Gene, die für die DNA-Replikation notwendig sind (wie DNA-Polymerase  $\alpha$ , PCNA, Dihydrofolatreduktase u. a.). Während der G1-Phase wird RB1 sukzessive durch die Cyclin D-CDK4- oder Cyclin D-CDK6- und Cyclin E-CDK2-Komplexe phosphoryliert. Die Phosphorylierung von RB1 führt zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors, was wiederum die Transkription von E2F-abhängigen Genen und den Übergang in die S-Phase ermöglicht (■ Abb. 1.3; Sherr u. McCormick 2002).

Defekte in der Regulation des Zellzyklus in Tumorzellen können unmittelbar durch Aktivierung von beteiligten Protoonkogenen wie Cyclin D1, Cyclin D2 oder CDK4 (■ Tab. 1.1) oder durch Verluste der Funktion von beteiligten Tumorsuppressoren wie RB1 oder p16<sup>INK4A</sup> (■ Tab. 1.2) entstehen. In manchen Tumoren sind sie Folge von Veränderungen in Signalkaskaden, die auf den Zellzyklus einwirken (■ Tab. 1.3).

### 1.1.5 Zellzyklus-Checkpoints und Apoptose

Im Zellzyklus werden nicht nur Proliferationssignale integriert, sondern es wird auch sichergestellt, dass das genetische Material möglichst intakt weitergegeben wird. Um eine Anhäufung genomischer Fehler während der Zellteilung zu vermeiden, existieren sog. »Checkpoints« innerhalb des Zellzyklus aus denen heraus ggf. Reparaturmechanismen aktiviert werden können. Als Beispiel sei hier der p53-abhängige G1/S-Checkpoint genannt, der nach DNA-Schädigungen durch Bestrahlung oder

Zytostatika die Zellen vermittelt durch p21<sup>CIP1</sup> am Eintritt in die S-Phase hindert. Ein zweiter wichtiger Checkpoint verhindert den Eintritt von Zellen mit unvollständig replizierter DNA in die Mitose.

In Tumorzellen führen Defekte in der Regulation des Zellzyklus nicht nur zu einer übersteigerten Zellproliferation, sondern beeinträchtigen auch die Funktion der Checkpoints. Darüber hinaus sind Proteine, die speziell an Checkpoints wirken wie z. B. p53, inaktiviert. Dies verursacht eine Anhäufung nicht-reparierter Fehler im Genom. Der Verlust von Checkpoints bietet damit eine Erklärung dafür, wie es in Tumorzellen zur Anhäufung einer Vielzahl von genetischen Veränderungen wie Punktmutationen oder Chromosomenaberrationen kommen kann. Bei der Entstehung mancher Tumoren kann diese Anhäufung jedoch auch unmittelbar durch defekte Mechanismen der DNA-Reparatur verursacht sein. Mutationen in Genen für Enzyme, die nach der DNA-Replikation fehlgepaarte Basen erkennen und den Defekt reparieren, sind besonders gut charakterisiert. Sie machen sich durch eine Veränderung der Länge von DNA-Sequenzen mit wiederholten einfachen Basenabfolgen, die als Mikrosatelliten bezeichnet werden, bemerkbar (Leach et al. 1993; Peltomaki et al. 1993). Störungen der Regulation der DNA-Methylierung, eines wichtigen epigenetischen Mechanismus der Genregulation, können ebenfalls die fehlerhafte Aktivierung oder Inaktivierung einer Vielzahl von Genen bewirken (Jones u. Baylin 2002; Schulz 1998).

Neben Zellzyklusarrest kann an Checkpoints auch Apoptose induziert werden. Die Apoptose, eine Form des programmierten Zelltods, ist ein weiterer wichtiger Mechanismus, um die Entstehung fehlerhafter und schließlich maligner Zellen zu verhindern. Sie unterscheidet sich von der pathologischen Nekrose und findet sich physiologisch bei verschiedenen Entwicklungsprozessen in mehrzelligen Organismen wie z. B. der Entwicklung, Differenzierung und Reifung hämatopoetischer und immunkompetenter Zellen.

Eine Apoptose kann über einen extrinsischen oder einen intrinsischen Signalweg initiiert werden; beide münden in eine gemeinsame »Exekutions«-Kaskade. Der intrinsische Signalweg, der z. B. durch DNA-Schäden aktiviert wird, erhöht die Permeabilität von Mitochondrien. Dies führt zur Bildung eines »Apoptosom«-Protein-Komplexes der seinerseits Exekutions-Caspasen aktiviert. Caspasen sind spezifische Proteasen. Der extrinsische Signalweg wird durch Membranrezeptoren, sogenannte »Todes-Rezeptoren« initiiert. Diese werden durch Zytokine oder Oberflächenproteine von zytotoxischen Immunzellen aktiviert. Die intrazellulären »Death-Domänen« des aktivierten Rezeptors lagern FADD-Ad-

aptorproteine in einem sog. »DISC«-Komplex an, der wiederum verschiedene Initiator-Caspasen aktiviert. Letztere initiieren proteolytisch die Exekutionskaskade. In dieser spalten die Effektor-Caspasen eine Vielfalt von Proteinen, so dass die morphologischen Kennzeichen der Apoptose eine Chromatinkondensation, Ausstülpungen der Zellmembran, eine internukleosomale DNA-Fragmentierung und eine Absonderung des Zellinhalts in Membranabschnürungen, sogenannten apoptotischen Körpern (»apoptotic bodies«) sind. Speziell spalten Caspasen Inhibitoren von intrazellulären DNasen, so dass auch die DNA fragmentiert wird. Nach dem Auftreten der apoptotischen Körper wird die sterbende Zelle schnell von ihren Nachbarzellen phagozytiert (Los et al. 2001; Castedo et al. 2004).

Die Apoptose wird in beiden Signalwegen in mehreren Stufen reguliert. BCL-2 verhindert die Wirkung der verwandten proapoptischen Proteine BAX und BAK an den Mitochondrien. Weiterhin erfolgt eine Regulation durch andere Mitglieder der BCL-2-Familie, die auf unterschiedliche Stress-Signale ansprechen. FLIP inhibiert den extrinsischen Signalweg an den Todesrezeptoren, während Inhibitoren der Apoptose (IAP), wie z. B. Survivin, Caspasen am »Apoptosom« inhibiert. IAP werden dagegen durch SMAC/Diablo antagonisiert, das bei der Permeabilitätsänderung der Mitochondrien freigesetzt wird.

In Tumoren können sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Apoptosesignalweg beeinträchtigt sein. Zu den häufigen Veränderungen zählen Verlust der Expression des Todesrezeptors TNFRSF6 (auch FAS oder Apo-1), Überexpression von BCL-2 oder Verlust der Expression von BAX sowie Überexpression von Survivin (Cory et al. 2003).

## 1.2 Molekularbiologische Untersuchungsmethoden

Molekularbiologische Untersuchungsmethoden werden im klinischen Alltag bereits in vielfältiger Weise vor allem für die Diagnostik von Infektionserkrankungen und Erbkrankheiten genutzt. Bei Krebserkrankungen wird molekulare Diagnostik bisher überwiegend bei hämatologischen Krebserkrankungen eingesetzt, doch erweitert sich der Anwendungsbereich laufend. Insbesondere im Bereich »individualisierter Medizin« gewinnen molekulare Untersuchungen zunehmend an Bedeutung, besonders erfolgreich bei der Behandlung von Mammakarzinomen. In den folgenden Abschnitten sollen deshalb wichtige Untersuchungsmethoden anhand klinisch-onkologischer Beispiele dargestellt werden.

### 1.2.1 DNA- und RNA-Untersuchungen mittels Polymerase-Kettenreaktion

Für die Untersuchung von Nukleinsäuren (DNA und RNA) war die Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch Mullis 1985 von zentraler Bedeutung. Die PCR erlaubt die millionenfache Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnittes in wenigen Stunden und ist damit Ausgangspunkt für zahlreiche qualitative und quantitative Untersuchungsverfahren (■ Abb. 1.4a). Dabei sind im Gegensatz zu den früher zumeist eingesetzten Blot-Techniken (Northern/Southern Blot) minimale Nukleinsäuremengen der zu untersuchenden Probe ausreichend. Bei DNA-Untersuchungen ist die PCR Voraussetzung für genetische Fingerprints, den Nachweis von Allelverlusten (»loss of heterozygosity«), Analysen genetischer Polymorphismen und die Detektion bekannter Mutationen (Müllhardt 2002).

Für die Bestimmung der Konzentration bestimmter Gentranskripte (mRNA) oder microRNA, kleinen regulatorischen RNA-Molekülen, und zunehmend auch für die Analyse von Mutationen, Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP) und DNA-Kopiezahlveränderungen wird heute überwiegend die quantitative PCR verwendet (Müllhardt 2002). Dabei handelt es sich um eine Weiterentwicklung der PCR-Technik (■ Abb. 1.4b), die anhand eines entsprechenden Standards und einer farbstoffmarkierten Sonde eine Quantifizierung des Zielmoleküls in der Probe erlaubt und sich durch eine hohe Präzision und Reproduzierbarkeit auszeichnet. Sogar sehr geringe Probenmengen von zehn Molekülen können noch sehr genau bestimmt werden. Die Verwendung der markierten Sonde ermöglicht durch den Einsatz verschiedener Farbstoffe weiterhin die Messung verschiedener Zielmoleküle in ein und demselben Reaktionsansatz, was z. B. für die gleichzeitige Messung verschiedener Genotypvarianten einer Mutation nützlich ist. Für die (quantitative) PCR stehen zunehmend automatisierte Verfahren zur Verfügung, die in Plattenformaten die simultane Messung von bis zu 384 Proben erlauben.

Klinisch wird die PCR beispielsweise routinemäßig für den Nachweis von Mutationen im KRAS-Gen genutzt, um die Sensitivität von Patienten mit metastasiertem Kolonkarzinom gegenüber dem EGFR-Antikörper Cetuximab zu beurteilen. Dieses Medikament ist nur für solche Patienten zugelassen, die die Wildtyp-Variante dieses Gens besitzen (Amado et al. 2008). Im Bereich der mRNA-Analyse kann z. B. durch quantitative Bestimmung des BCR-ABL-Transkripts der Anteil residueller Tumorzellen während der Behandlung einer Chronischen myeloischen Leukämie (CML) abgeschätzt werden (Schüler u. Dölken 2005). Aufgrund ihrer hohen Sensi-

vität eignet sich die quantitative PCR auch für molekulare Untersuchungen in Urinproben, die im Sinne einer nicht-invasiven Diagnostik und Prognostik bedeutsam sind.

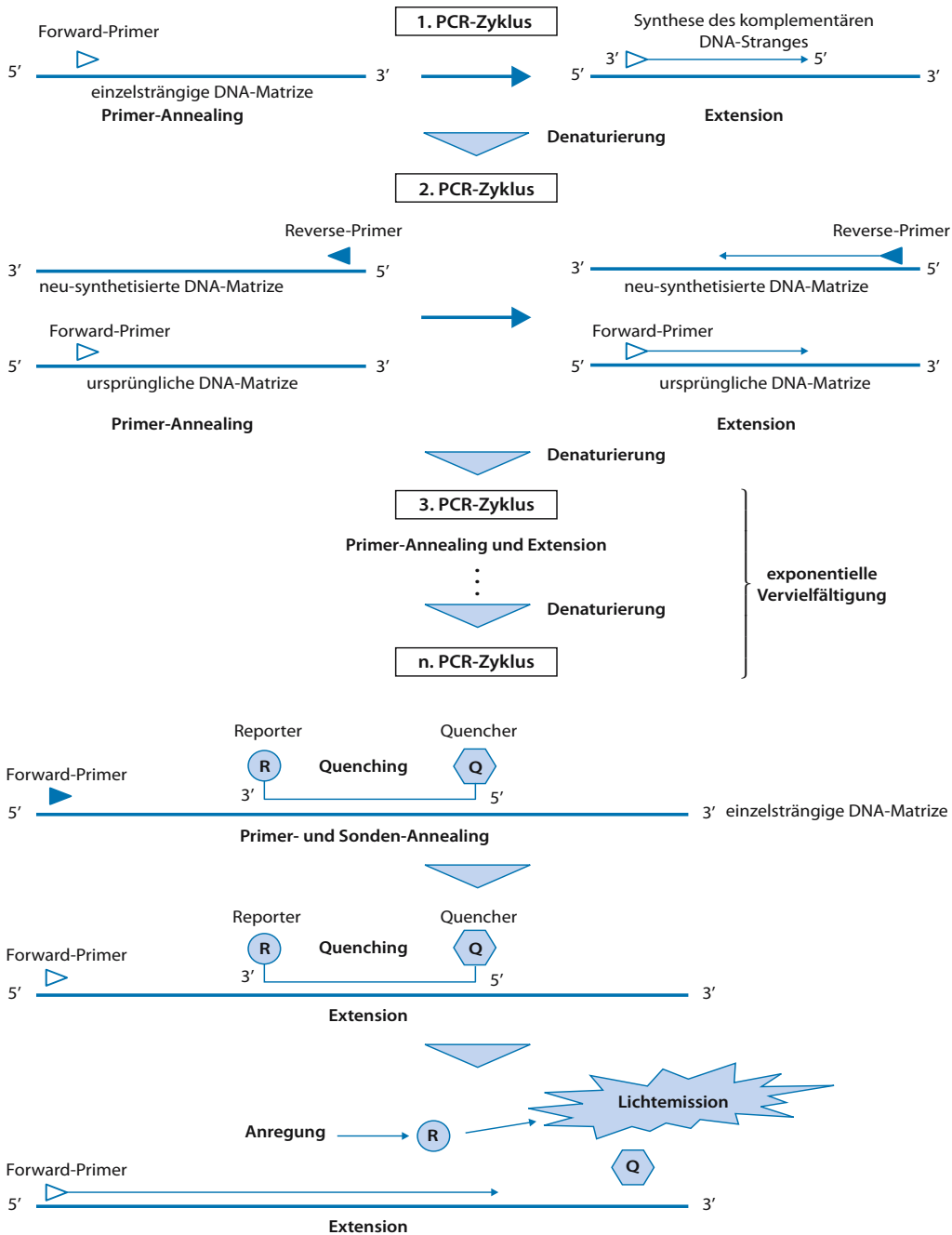
### 1.2.2 Proteinnachweisverfahren

Die aus Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen durch Translation entstehenden Proteine können strukturelle (z. B. bei Punktmutationen) oder quantitative Veränderungen (z. B. durch Genamplifikationen oder -verluste) aufweisen. Dies bedingt häufig eine Fehlfunktion dieser Proteine, wie sie beispielsweise in Tumorzellen auftreten. Strukturelle Veränderungen der Proteine können deren Metabolisierung beeinflussen und damit auch zu Veränderungen der Proteinmenge führen. Beispielsweise besitzt der Tumorsuppressor p53 – ein Zellzyklus- und Apoptoseregulator, der in vielen Tumoren dereguliert ist – in Folge von Punktmutationen im zugehörigen TP53-Gen häufig eine verlängerte Halbwertszeit, wodurch eine Proteinakkumulation bewirkt wird (Rosenblatt et al. 2008).

Proteine können mittels Western-Blot, ELISA (»enzyme linked immuno-sorbent assay«) oder Immunhisto-/Immunzytochemie nachgewiesen und (semi-)quantifiziert werden. All diese Techniken basieren auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Wechselwirkung. Dabei wird das Protein mit einem Antikörper inkubiert, der spezifisch an ein (monoklonal) oder mehrere (polyklonal) Epitope des Proteins bindet. Dieser primäre Antikörper wird anschließend mit Hilfe eines weiteren Antikörpers und z. B. einer Farbreaktion detektiert, wobei die erhaltene Signalstärke Rückschlüsse auf die Proteinmenge zulässt (Rehm 2002).

Der **Western-Blot** ermöglicht neben der (Semi-)Quantifizierung von Proteinen auch die Detektion posttranslationaler Modifikationen. Mit **ELISA-Techniken** kann die Proteinmenge sehr präzise und sensitiv bestimmt werden (Rehm 2002). ELISA-Assays werden routinemäßig zur Messung von Tumormarkern im Serum, wie dem Prostataspezifischen Antigen (PSA) beim Prostatakarzinom oder dem karzinoembryonalen Antigen (CEA) beim Kolonkarzinom verwendet (Sanchez et al. 2004).

Bei der Immunhistochemie werden Proteine in Gewebeschnitten (Zytochemie: Zellen) detektiert. Neben der semiquantitativen Bestimmung der Proteinexpression kann hiermit die Zuordnung zu bestimmten Zelltypen vorgenommen bzw. die Lokalisation des Proteins in intrazellulären Kompartimenten bzw. der extrazellulären Matrix untersucht werden (Rosenblatt et al. 2008). In der histopathologischen Routine wird die Immunhistochemie vor allem für die Bestimmung von Proliferationsmarkern (Ki67, PCNA) für die Prognostik oder die Abklärung unklarer histologischer Befunde verwendet. Beim Prostata-



**Abb. 1.4a, b.** Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR). **a** Die ersten Runden einer PCR mit einem DNA-Einzelstrang, der durch Denaturierung entsteht. Ausgehend von dem sequenzspezifischen »forward-primer« synthetisiert die DNA-Polymerase einen komplementären DNA-Strang. Bei erneuter Denaturierung, Primeranlagerung (»annealing«) und Synthese (»extension«) dient der neu synthetisierte Strang selbst als Matrize (»template«) und wird ausgehend von dem sequenzspezifischen »reverse-primer« abgelesen. Da in jedem Zyklus (Denaturierung, »annealing«, »extension«) eine Verdoppelung der DNA-Moleküle stattfindet, erfolgt eine exponentielle Vervielfältigung des zwischen den Primern liegenden DNA-Abschnittes. Bei einer doppelsträngigen DNA als Original-Template finden die gleichen Reaktionen noch einmal für

den Gegenstrang statt. **b** Am Beispiel einer TaqMan-(Hydrolyse-) Sonde ist das Prinzip der quantitativen PCR dargestellt. Die sequenzspezifische Sonde bindet während der »Annealing«-Phase an die DNA-Matrize. Hydrolysesonden besitzen am 3'-Ende einen gebundenen Fluoreszenzfarbstoff, dessen emittiertes Licht jedoch durch den »quencher« am 5'-Ende »abgefangen« wird. Bei der Extension wird die Hydrolysesonde durch die 3'-5'-Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase abgebaut, wodurch das »Quenching« aufgehoben wird und das durch den Fluoreszenzfarbstoff emittierte Licht detektiert werden kann. Je höher die Menge an Ziel-DNA, desto mehr Moleküle des Fluoreszenzfarbstoffes werden freigesetzt. Dieser Zusammenhang wird zur Quantifizierung der Menge an Ausgangs-DNA-Molekülen verwendet



karzinom dient hierzu eine Antikörper-Mischung gegen Proteine der normalen Basalzellen (Paner et al. 2008).

Beim Mammakarzinom wird ein standardisiertes immunhistochemisches Verfahren zum Nachweis des HER2-Proteins zur Therapiewahl eingesetzt. HER2 (auch: ERBB2) kodiert für einen Wachstumsfaktor-Rezeptor aus der ERBB-Familie. Seine Überexpression korreliert beim Mammakarzinom mit einer ungünstigen Prognose und dem Ansprechen auf eine Kombinationstherapie, die einen Antikörper gegen das HER2-Protein (Herceptin) und Zytostatika (z. B. Taxol und Carboplatin) beinhaltet. Die Immunhistochemie wird durch eine DNA-in-situ-Hybridisierung (FISH, s. u.) gesichert, welche die für die Überexpression verantwortliche Amplifikation des HER2-Gens nachweist (Dean-Colomb u. Estevea 2008).

Viele Proteine agieren in der Zelle als Bestandteile größerer Komplexe, die durch Protein-Protein-Interaktionen entstehen. Solche Interaktionen lassen sich z. B. durch Ko-Immunpräzipitation nachweisen. Der Proteinkomplex wird dabei mit Hilfe eines Antikörpers, der spezifisch einen bekannten Interaktionspartner in dem Komplex bindet, angereichert. Die unbekanntenen Bindungspartner können anschließend über ihr Molekulargewicht oder ihre Enzymaktivität identifiziert werden (Bernot 2004; Rehm 2002). Unter in-vivo-ähnlicheren Verhältnissen, also innerhalb einer Zelle und mit eukaryotischen posttranslationalen Modifikationen der Proteine, können Protein-Protein- oder auch Protein-RNA-Interaktionen mit Hilfe des »Yeast-two-hybrid«-Systems (**Y2H**) untersucht werden (Bernot 2004). Durch die Interaktion der Bindungspartner wird dabei im Zellkern die Funktion eines Transkriptionsfaktors rekonstruiert, der dann die Transkription eines Reportergens induziert.

Mit diesem System können sowohl in einem empirischen Ansatz mögliche Bindungspartner identifiziert als auch gezielt die Interaktion bestimmter Proteine überprüft werden. Weiterhin ermöglicht die Methode die Untersuchung von mehr als zwei Interaktionspartnern oder die Interaktion mit Membranproteinen. Die Fähigkeit isolierter Proteine (z. B. Transkriptionsfaktoren), an DNA (oder RNA) zu binden, wird in vitro im »elektrophoretic mobility shift assay« (**EMSA**, »Band-shift«-Verfahren) oder im »DNase footprinting assay« getestet. Das EMSA-Verfahren beruht auf einer verringerten Wanderungsgeschwindigkeit von Protein-DNA (bzw. RNA)-Komplexen im Vergleich zu freier DNA im elektrischen Feld. Detektiert wird der Komplex aufgrund einer vorherigen (z. B. Biotin-) Markierung des DNA- bzw. RNA-Fragments (Lottspeich u. Zorbas 1998). Auch hier kann die Interaktion mit mehr als zwei Proteinen untersucht werden, wobei die gebundenen Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert werden können (»supershift as-

say«). Im »DNase footprinting assay« wird der Schutz der DNA vor enzymatischer Spaltung ausgenutzt, der durch die Bindung des Proteins hervorgerufen wird.

Zum Nachweis einer DNA-Protein-Bindung in vivo wird die Chromatin-Immunopräzipitation (**ChIP**) verwendet. Hierbei werden die proteinbindenden DNA-Bereiche nach Chromatinfragmentierung mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers in einer Immunpräzipitation isoliert (Hampshire et al. 2007).

Zur Identifikation von Proteinen kann neben den klassischen Methoden wie Western-Blot die **MALDI-TOF MS** (»Matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry«) eingesetzt werden. Hierfür wird ein isoliertes Protein mittels Endoproteasen verdaut und Peptidfragmente werden anhand deren Masse/Ladungsverhältnis aufgetrennt. Die Identität des Proteins kann unter Verwendung geeigneter Softwareprogramme durch den Vergleich mit Datenbankeinträgen erfolgen (Bernot 2004; Rehm 2002). Häufig wird jedoch direkt die Sequenz der einzelnen Fragmente mittels **ESI** (»electrospray ionization«) **-MS/MS** bestimmt (Bernot 2004).

Eine Erweiterung der MALDI-TOF MS in Richtung funktionelle Analyse und Proteomics stellt die **SELDI** (»surface enhanced laser desorption ionization/time-of-flight«)-Technik dar. Dabei werden komplexe Proteingemische bezüglich ihrer Eigenschaften (z. B. hydrophob, anionisch, kationisch, Bindung an immobilisierte Antikörper) auf Proteinchips separiert und anschließend analog zur MALDI-TOF MS analysiert. Da die MS-Spektren, die diese Technik liefert, gut reproduzierbar sind, eignet sich SELDI auch zum qualitativen Vergleich von Proteinspektren z. B. zwischen tumorhaltigem und tumorfreiem Untersuchungsmaterial mit geeigneten Softwareprogrammen und somit zur Erstellung z. B. prognose-relevanter Proteinspektren, ohne die Proteine notwendigerweise identifizieren zu müssen (Rehm 2002).

### 1.2.3 In-situ-Hybridisierungsverfahren

In-situ-Hybridisierungsverfahren (ISH) ermöglichen den Nachweis von Chromosomenaberrationen, Genveränderungen und RNA-Expression auf Einzelzellniveau. Durch den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen (**FISH**) konnte die Empfindlichkeit und Auflösung dieser Methode deutlich erhöht werden. Das Prinzip besteht in der Hybridisierung markierter komplementärer Nukleinsäure-Stränge auf objektträgerfixierte Zellen (z. B. histologische Schnitte, Urinzytologie). Auf DNA-Ebene eignet sich die FISH besonders zum Nachweis von Genamplifikationen, numerischen Chromosomenveränderungen und Translokationen. Für den Nachweis von Translokationen wird

dabei neben der Zielgensonde eine Zentromersonde des entsprechenden Chromosoms verwendet (Holling u. Kipp 2007; Kevin et al. 2007). Anwendung findet diese Technik beispielsweise in der pränatalen Diagnostik zum Nachweis einer Chromosom 21-Trisomie (Ogilvie 2003). Neuerdings werden mittels FISH-Methodik auch chromosomale Translokationen beim Prostatakarzinom nachgewiesen (Perner et al. 2007). Auf RNA-Ebene liegt der Vorteil der ISH in der Möglichkeit, Zellen, die eine bestimmte mRNA-Expression aufweisen, in einem Gewebverband zu identifizieren. Wichtig ist dies z. B. in der Entwicklungsbiologie zur Verfolgung der Genaktivität während der Embryogenese.

Neben der klassischen Zytogenetik und der FISH-Methode bietet die Komparative Genomische Hybridisierung (CGH) eine weitere Möglichkeit zum Nachweis von numerischen chromosomalen Veränderungen. Bei dieser Methode werden z. B. normale und Tumor-DNA farblich unterschiedlich markiert. Eine automatisierte Detektion der verschiedenen (Fluoreszenz-) Signale erlaubt dann den Vergleich des gesamten Genoms von Tumor und Normalgewebe, d. h. also die Detektion von Genmaterialzugewinnen bzw. -verlusten (Pinkel u. Albertson 2004). Eine Weiterentwicklung, die Array-basierte CGH, ermöglicht eine höhere Auflösung (s. u.).

Eine spezielle Hybridisierungstechnik wird bei der Messung der mRNA-Konzentration des Prostata-Tumormarkers PCA3 (»prostate cancer antigen 3«, auch: DD3) in Urinproben angewendet. Hier wird die Target-RNA zunächst spezifisch angereichert und amplifiziert und anschließend durch Hybridisierung detektiert (»APTIMA PCA3 assay«). Dieser Test kann eine Entscheidungshilfe zur Durchführung einer Rebiopsie bei Männern mit Verdacht auf Prostatakrebs darstellen (Haese et al. 2008; Groskopf et al. 2006).

## 1.2.4 Hochdurchsatzverfahren

Chip-Technologien ermöglichen parallel die Untersuchung einer großen Anzahl von Faktoren, z. B. Gentranskripten (mRNA). Dies spielt insbesondere in der Tumorforschung eine bedeutende Rolle, da Tumoren multifaktorielle Erkrankungen darstellen.

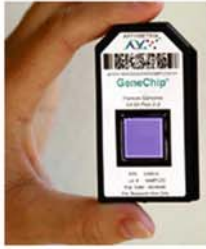
Bereits seit einigen Jahren existieren Chip-Technologien zur Untersuchung von Nukleinsäuren. Je nach Plattform können damit DNA-, mRNA- oder microRNA-Proben untersucht werden. Hierbei sind auf einem Träger Oligonukleotidmoleküle bekannter Sequenz in einem geordneten Raster (»Array«) immobilisiert. Beispielsweise ist dabei eine Sequenz spezifisch für ein bestimmtes Gentranskript. Wird eine markierte Probe (z. B. Tumor-RNA) auf einem Chip hybridisiert, erfolgt eine spezifische Bindung von RNA-Fragmenten an die jeweils komplementären Sonden. Die Position des Signals der RNA-Markierung im Raster ermöglicht eine Aussage über die Identität des Transkripts, die Signalstärke über seine Expressionshöhe (■ Abb. 1.5). Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgt mit Hilfe geeigneter Software-Programme und liefert beispielsweise Genexpressionsmuster, die mit einem spezifischen histologischen Tumorsubtyp oder dem Überleben von Tumorpatienten assoziiert sind (Grimm et al. 2003, 2004).

Für mRNA-Untersuchungen existieren sog. themenspezifische Arrays, mit denen beispielsweise alle apoptoserelevanten Gentranskripte untersucht werden. Mit anderen Arrays kann die Expression aller Gentranskripte, zum Teil auch ihrer verschiedenen Spleißvarianten, simultan bestimmt werden.

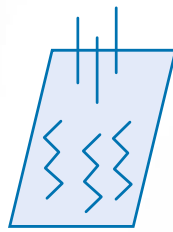
Im Bereich der Onkologie wird der Array-basierte und durch die FDA zugelassene MammaPrint-Test, der die Expression von 70 an der Proliferation beteiligten

■ **Abb. 1.5.** Prinzip der mRNA-Analyse mittels Microarrays. Aus einem Gewebe (z. B. Tumor) oder Zellen wird RNA isoliert, ggf. amplifiziert, markiert und nach Fragmentierung auf den Array hybridisiert. Die Arrays werden zur Entfernung unspezifischer Bindungen gewaschen und anschließend gefärbt, wobei in mehreren Stufen die Markierung der Probe verstärkt und mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen wird. Beim anschließenden Scannen der Chips wird die Stärke des Fluoreszenzsignals in den verschiedenen Punkten des Rasters in Graustufen wiedergegeben (umso heller, je höher Fluoreszenzsignal). Die Daten werden mit Hilfe geeigneten bioinformatischen Algorithmen ausgewertet. Die Expression der untersuchten Gene kann in einer sog. »heat map« dargestellt werden (gezeigt ist ein hypothetisches Beispiel). Die Spalten entsprechen dabei den verschiedenen Proben, die Zeilen den untersuchten Genen. Jeder Punkt der Farbmatrix repräsentiert die relative Expression eines Gens in einer Probe im Vergleich zum Mittelwert in allen Proben. Rote Punkte kennzeichnen

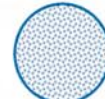
eine höhere, grüne eine niedrigere Expression als der Mittelwert. Die Proben können dann anhand der Ähnlichkeit ihrer Genexpression in verschiedene Cluster unterteilt werden (hierarchische Clusteranalyse), wobei in dem dargestellten Beispiel Patienten mit langem und solche mit kurzem Gesamtüberleben jeweils zusammen clustern. In einer weiterführende Analyse können dann die Gene identifiziert werden, die für eine Vorhersage des Gesamtüberlebens genutzt werden können. Der dargestellte Ablauf entspricht dem Prinzip der sog. Ein-Farben-Microarrays (z. B. Affymetrix). Hierbei wird jede Probe, auch die ggf. vorhandene Referenzprobe auf extra Chips hybridisiert. Daneben existieren sog. Zwei-Farben-Arrays, bei denen Probe und Referenz, nachdem sie mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden, auf ein und denselben Array hybridisiert werden. Als Scan-Ergebnis ergibt sich hier eine Farbüberlagerung der beiden Fluoreszenzfarbstoffe, die dann eine Aussage der jeweiligen Target-mRNA in der Probe im Vergleich zur Referenz zulässt



z.B.: HumanGenome U133-Plus 2.0-Array (Affymetrix)



schematisch



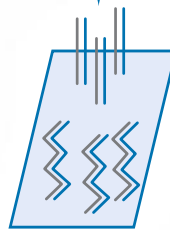
Probe, z.B. Tumorgewebe



aus der Probe isolierte, markierte und amplifizierte mRNA

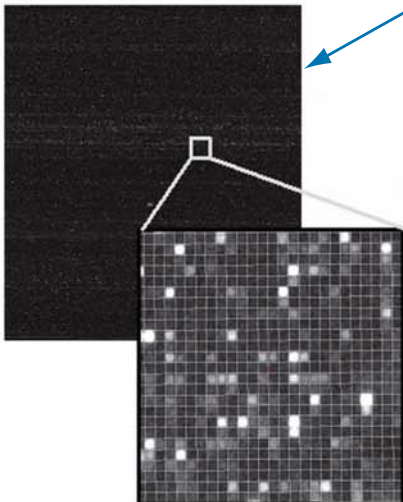
Chip mit in den Raum stehenden Oligonukleotidsonden

mRNA-Fragmentierung und -Hybridisierung



Bindung der mRNA-Fragmente an komplementären Sonden

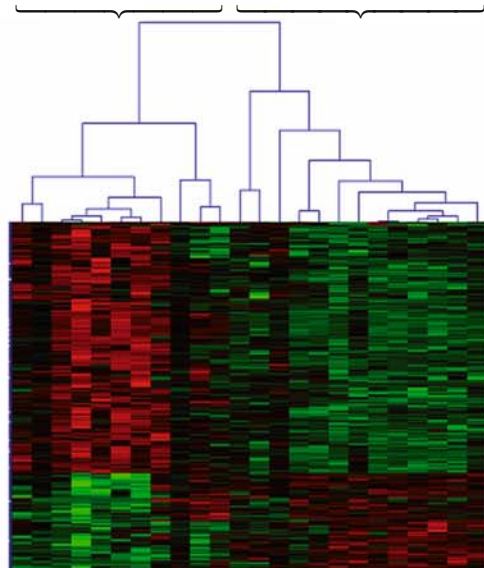
Waschen, Färben, Scannen



Scan-Bild der Fluoreszenzintensität (hell: starkes Fluoreszenzsignal)

bioinformatische Auswertung

Unterscheidung von Tumoren von Patienten mit kurzem und langem Gesamtüberleben



Heat-Map (rot: hohe Expression, grün: geringe Expression des betreffenden Gens)



Genen analysiert, zur Abschätzung des Metastasierungsrisikos von Brustkrebspatientinnen eingesetzt. Vor allem Niedrigrisiko-Patientinnen, die auch ohne adjuvante Chemotherapie eine 10-Jahres-Überlebensrate von 96% haben, können durch diese Gensignatur identifiziert werden (Simon 2007; van de Vijver et al. 2002; van't Veer et al. 2002).

Für DNA-Analysen werden u. a. sog. »single nucleotide polymorphism« (SNP)-Arrays verwendet, die sowohl eine Genotypisierung verschiedener SNPs im Genom als auch eine genomweite DNA-Kopienzahlanalyse zulassen (Beaudet u. Belmont 2008). Des Weiteren wird auch die hochauflösende CGH (s. o.), die sog. Array-CGH, zur Detektion chromosomaler und genetischer Veränderungen eingesetzt (Beaudet u. Belmont 2008; Pinkel u. Albertson 2004; Snijders et al. 2003).

Der AmpliChip-CYP450-Test ist ein SNP-Array zur Detektion von Genotypen in zwei Genen der Cytochrom P450-Familie. Da diese Gene an der Metabolisierung von etwa einem Viertel aller rezeptpflichtigen Medikamente beteiligt sind, kann mit Hilfe dieses AmpliChip-CYP450-Tests patientenspezifisch die Metabolisierung eines Wirkstoffes und damit die Dosierung des Medikamentes abgeschätzt werden (www.roche.com).

Für einige Fragestellungen bieten moderne Hochdurchsatztechniken zur Nukleinsäure-Sequenzierung eine Alternative zu Array-basierten Methoden. Diese Techniken, oft unter dem Begriff »deep sequencing« zusammengefasst, erlauben die gleichzeitige und schnelle Bestimmung der Sequenz von Hunderttausenden an kürzeren Nukleinsäuresequenzen ohne vorherige Klonierung. Dadurch wird es möglich, vollständige Genome eines Menschen (Wheeler et al. 2008) oder einer Tumorzelle (Ley et al. 2008) in kurzer Zeit und mit vertretbarem finanziellen Aufwand auf Variationen (Polymorphismen) und Mutationen zu analysieren. Auch für die Charakterisierung von RNA lässt sich diese Methode anwenden, z. B. um alle Spleißvarianten innerhalb einer Zelle oder eines Gewebes zu erfassen (Pan et al. 2008).

Auch in der Proteinanalytik hat eine Entwicklung zur simultanen Untersuchung vieler Proteine und Proteinmodifikationen eingesetzt. Neben der bereits erwähnten SELDI-Technik existieren auch Protein-Biochips. Auf einem Array immobilisierte Antikörper können z. B. ähnlich wie bei den Arrays zur Nukleinsäureanalyse, zur Identifikation der in einem Gemisch enthaltenen Proteine genutzt werden. Weiterhin kann die Wechselwirkung von »small molecules« mit Proteinen in einem Hochdurchsatzmaßstab untersucht werden, was insbesondere in der Pharmaindustrie zum Screening potenzieller Wirkstoffe eingesetzt wird. Außerdem werden solche Biochips auch zur Untersuchung von Protein-Protein-

Wechselwirkungen verwendet (Bernot 2004; Albala u. Humphrey 2002).

Eine wichtige Voraussetzung für Hochdurchsatzanalysen stellen geeignete bioinformatische Algorithmen zur Auswertung der erzeugten Datenmengen dar, so dass auch die Bioinformatik für molekularbiologische Untersuchungen zunehmend an Bedeutung gewinnt. Im Bereich der funktionellen Proteinanalyse ermöglichen bioinformatische Methoden darüber hinaus auch die Identifikation von Sequenzhomologien eines Proteins zu anderen Proteinen desselben oder anderer Organismen und lassen damit Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins sowie mögliche Protein-Protein- oder Protein-DNA-Wechselwirkungen zu (Bernot 2004; Albala u. Humphrey 2002).

Neben den genannten Chip-Technologien kann auch die Immunhistochemie (s. o.) in Form sog. »tissue microarrays« – Paraffinblöcke, die Gewebestanzten hunderter Proben enthalten – als Hochdurchsatzmethode eingesetzt werden. Dabei wird, anders als bei den oben beschriebenen Array-Verfahren, keine Vielzahl von Markern, sondern ein spezifischer Marker an einem großen Probenkollektiv untersucht (Kononen et al. 1998).

In der Regel sind Array-basierte Hochdurchsatzanalysen kostenaufwändig, so dass sie meist an einer kleinen Stichprobe angewendet werden, um potenzielle Marker für eine spezifische Fragestellung zu identifizieren. Diese Marker werden anschließend mit Hilfe anderer Techniken, wie PCR oder Immunhistochemie an »tissue microarrays«, an einem großen Kollektiv validiert.

## Literatur

- Albala JS, Humphrey-Smith I (2003) Protein arrays, biochips, and proteomics. The next phase of genomic discovery. Dekker, New York
- Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD (2008) Wild-Type KRAS Is Required for Panitumumab Efficacy in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol* 26: 1626–1634
- Beaudet AL, Belmont JW (2008) Array-Based DNA Diagnostics: Let the Revolution Begin. *Annu Rev Med*. 59:113–129
- Bernot A (2004) Genome, transcriptome and proteome analysis. John Wiley u. Sons, Hoboken Weinheim
- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G (2004) Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 23: 2825–2837
- Cory S, Huang DC, Adams JM (2003) The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22: 8590–8607
- Cottrell SE (2004) Molecular diagnostic applications of DNA methylation technology. *Clin Biochem* 37: 595–604
- Dean-Colomb W, Esteva FJ (2008) Her2-positive breast cancer: herceptin and beyond. *Eur J Cancer* 44: 2806–2812
- Evan GI, Vousden KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411: 342–348
- Grimm MO, Burchardt M, Schulz WA (2003) Perspektiven der molekularen Diagnostik dargestellt am Beispiel des Harnblasenkarzinoms. *Urologe A* 42: 650–659

- Grimm MO, Hartmann FH, Schulz WA (2004) Microarrays. Technik und Potenzial beim Prostatakarzinom. *Urologe A* 43: 653–658
- Groskopf J, Aubin SMJ, Deras IL, Blase A, Bodrug S, Clark C, Brentano S, Mathis J, Pham J, Meyer T, Cass M, Hodge P, Macairan ML, Marks LS, Rittenhouse H (2006) APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem* 52: 1089–1095
- Haese A, de la Taille A, van Poppel A, Marberger M, Stenzl A, Mulders PFA, Huland H, Abbou CC, Remzi M, Tinzl M, Feyerabend S, Stillebroer AB, van Gils MPMQ, Schalken JA (2008) Clinical Utility of the PCA3 Urine Assay in European Men Scheduled for Repeat Biopsy. *Eur Urol* 54: 1081–1088
- Halling KC, Kipp BR (2007) Fluorescence in situ hybridization in diagnostic cytology. *Hum Pathol* 38: 1137–1144
- Hamilton A, Hortobagyi G (2005) Chemotherapy: what progress in the last 5 years? *J Clin Oncol* 23: 1760–1775
- Hampshire AJ, Rusling DA, Broughton-Head VJ, Fox KR (2007) Footprinting: a method for determining the sequence selectivity, affinity and kinetics of DNA-binding ligands. *Methods* 42: 128–140
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57–70
- Harden SV, Sanderson H, Goodman SN, Partin AA, Walsh PC, Epstein JI, Sidransky D (2003) Quantitative GSTP1 methylation and the detection of prostate adenocarcinoma in sextant biopsies. *J Natl Cancer Inst* 95: 1634–1637
- Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3: 415–428
- Kinzler KW, Vogelstein B (1997) Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386: 761–763
- Kolch W, Mischak H, Pitt AR (2005) The molecular make-up of a tumour: proteomics in cancer research. *Clin Sci (London)* 108: 369–383
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4: 844–847
- Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomaki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M (1993) Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75: 1215–1225
- Ley TJ, Mardis ER, Ding L, Fulton B, McLellan MD, Chen K, Dooling D, Dunford-Shore BH, McGrath S, Hickenbotham M, Cook L, Abbott R, Larson DE, Koboldt DC, Pohl C, Smith S, Hawkins A, Abbott S, Locke D, Hillier LW, Miner T, Fulton L, Magrini V, Wylie T, Glasscock J, Conyers J, Sander N, Shi X, Osborne JR, Minx P, Gordon D, Chinwalla A, Zhao Y, Ries RE, Payton JE, Westervelt P, Tomasson MH, Watson M, Baty J, Ivanovich J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Walter MJ, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Wilson RK (2008) DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature* 456: 66–72
- Li LC, Carroll PR, Dahiya R (2005) Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment. *J Natl Cancer Inst* 97: 103–115
- Linehan WM, Walther MM, Zbar B (2003) The genetic basis of cancer of the kidney. *J Urol* 170: 2163–2172
- Los M, Stroh C, Janicke RU, Engels IH, Schulze-Osthoff K (2001) Caspases: more than just killers? *Trends Immunol* 22: 31–34
- Lottspeich F, Zorbas H (1998) *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Berlin Heidelberg
- Mülhardt C (2002) *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, 3. Auflage
- Ogilvie CM (2003) Prenatal diagnosis for chromosome abnormalities: past, present and future. *Pathol Biol (Paris)* 51: 156–160
- Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet* 40: 1413–1415
- Paner GP, Luthringer DJ, Amin MB (2008) Best practice in diagnostic immunohistochemistry: prostate carcinoma and its mimics in needle core biopsies. *Arch Pathol Lab Med* 132: 1388–1396
- Peltomaki P, Aaltonen LA, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Green JS, Jass JR, Weber JL, Leach FS (1993) Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 260: 810–812
- Perner S, Schmidt FH, Hofer MD, Kuefer R, Rubin M (2007) TMPRSS2-ETS gene fusion in prostate cancer. *Urologe A* 46: 754–760
- Pinkel D, Albertson DG (2005) Comparative genomic hybridisation. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6: 331–354
- Rehm H (2002) *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg Berlin, 4. Auflage
- Rodland KD (2004) Proteomics and cancer diagnosis: the potential of mass spectrometry. *Clin Biochem* 37: 579–583
- Rosenblatt R, Jonmarker S, Lewensohn R, Egevad L, Sherif A, Kälkner KM, Nilsson S, Valdman A, Ullén A (2008) Current status of prognostic immunohistochemical markers for urothelial bladder cancer. *Tumour Biol* 29: 311–322
- Sanchez JC, Corthalis GL, Hochstrasser DF (2004) Biomedical applications of proteomics, John Wiley u. Sons, Weinheim
- Schüler F, and Dölken G (2005) Detection and monitoring of minimal residual disease by quantitative real-time PCR. *Clin Chim Acta* 363: 147–156
- Schulz WA (1998) DNA methylation in urological malignancies. *Int J Oncol* 13: 151–167
- Schulz WA (2007) *Molecular biology of human cancers: An advanced student's textbook*. Springer, Berlin Heidelberg New York
- Sherr CJ, McCormick F (2002) The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2: 103–112
- Simon I (2007) MammaPrint®: Klassifizierung von Mamma-Tumoren durch Genexpressionsanalyse. *Laborwelt* 5: 27–29
- Snijders AM, Pinkel P, Albertson DG (2003) Current status and future prospects of array-based comparative genomic hybridisation. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2:37–45
- van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D et al. (2002) A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347: 1999–2009
- van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM et al. (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415:530–536
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319: 525–532
- Wheeler DA, Srinivasan M, Egholm M, Shen Y, Chen L, McGuire A, He W, Chen YJ, Makhijani V, Roth GT, Gomes X, Tartaro K, Niazi F, Turcotte CL, Irzyk GP, Lupski JR, Chinault C, Song XZ, Liu Y, Yuan Y, Nazareth L, Qin X, Muzny DM, Margulies M, Weinstock GM, Gibbs RA, Rothberg JM (2008) The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *452: 872–876*

# Hinweise zur Studienplanung, Biometrie und klinischen Epidemiologie

K.-H. Jöckel, H. Hirche, M. Neuhäuser

- 2.1 Typen und Ziele klinischer Studien – 17
- 2.2 Studienplanung und -organisation – 22
- 2.3 Dokumentation und biometrische Auswertung – 26
- 2.4 Anhang: Hinweise zur statistischen Beurteilung von Mittelwerten und Prozentangaben anhand von Vertrauensbereichen – 29

## 2.1 Typen und Ziele klinischer Studien

Klinische Forschung und Grundlagenforschung sind in den letzten Jahren näher aneinander gerückt. Während moderne klinische Therapiestudien ohne Begleit- und Grundlagenforschung nicht mehr auskommen, richtet sich Letztere vermehrt auf menschenrelevante Ergebnisse aus. So lässt sich durch Therapiestudien der wechselseitige Nutzen von klinischer und experimenteller Krebsforschung belegen. Aus diesen Gründen ist es nur allzugut zu verstehen, dass sich kontrollierte klinische Studien als das wichtigste Instrument der klinischen Forschung durchgesetzt haben, um eine Behandlung auf ihre Effektivität und Unbedenklichkeit zu prüfen. Das Ziel solcher Studien ist die Erfassung von

- prognostischen Faktoren,
- Pharmakokinetik,
- Verträglichkeit,
- Wirksamkeit,
- Nutzen-Risiko-Relation bzw. therapeutischem Index,
- Lebensqualität.

Daneben etablieren sich zunehmend Studienansätze aus der **klinischen Epidemiologie**, die epidemiologische Prinzipien und Methoden auf die Praxis der klinischen Medizin anwenden. Zu den Hauptaufgaben der klinischen Epidemiologie zählen (Beaglehole et al. 1993):

- Definition von Normal- und pathologischen Werten,
- Bestimmung der Genauigkeit diagnostischer Tests,

- Charakterisierung der »natürlichen« Entwicklung von Krankheitsverläufen (»natural history«) und der Bedeutung prognostischer Faktoren,
- Bestimmung der Effizienz etablierter Behandlungen,
- Integration präventiver Ansätze in die klinische Praxis.

Da sich dieses Buch primär an die in der Praxis tätigen onkologischen Urologen wendet, kann auf Fragen der Methodik der Epidemiologie nicht weiter eingegangen werden. Erwähnt werden soll aber, dass die moderne Epidemiologie, die sich als die Wissenschaft von der Verteilung der Erkrankungen und deren Determinanten in der Bevölkerung versteht, inzwischen über Methoden zur Deskription und Analytik verfügt, die einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Entstehung urologischer Tumoren und deren Prävention leisten. Ein wesentliches Instrument hierfür sind Krebsregister, in der **alle** bösartigen Neubildungen einer definierten Region **vollständig** erfasst werden, um einerseits umfassend über das Krebsgeschehen zu informieren und andererseits analytische, an ätiologischen Fragen orientierte Studien zu ermöglichen.

Grundsätzlich unterscheidet man zwischen **experimentellen** (meist randomisierten) und **Beobachtungsstudien**. Während bei einer experimentellen randomisierten Studie die Studiensubjekte (Patienten, Probanden) zufällig einem Behandlungsregime zugewiesen werden können, geht die Beobachtungsstudie

von den auf das Studiensubjekt wirkenden Einflüssen aus, sei es eine bestimmte Therapie oder eine stattgefundene Exposition (z. B. die historische Arzneimitteleinnahme).

Grundsätzlich ist die randomisierte Studie der Beobachtungsstudie überlegen (Pocock 1983): Durch die zufällige Zuteilung der Studiensubjekte zur Art der Behandlung (z. B. Placebo vs. Verum) wird sichergestellt, dass innerhalb der Grenzen des statistischen Zufalls beobachtete Unterschiede ausschließlich den Behandlungsarten, nicht aber konstituierenden Gruppenunterschieden (z. B. Prävalenz prognostischer Faktoren) zugeschrieben werden können. Andererseits sind Beobachtungsstudien vielfach kostengünstiger und stellen u. U. die einzig ethisch vertretbare Alternative dar: Interessiert man sich beispielsweise für die Auswirkung phenacetinhaltiger Medikamente auf die Entstehung von Blasen- und/oder Nierenzellkarzinomen, so verbietet sich ein prospektiv randomisierter Ansatz von vornherein.

Darüber hinaus unterscheidet man zwischen einer **retrospektiven** und einer **prospektiven Studienführung**. Beide Studienkonzepte haben ihre Vorzüge und können wertvolle Informationen liefern, wenn man ihre Aussagemöglichkeiten kennt und vor diesem Hintergrund die Ergebnisse interpretiert. Retrospektive Studien sind ihrer Natur nach Beobachtungsstudien, während prospektive Studien sowohl randomisiert als auch als Beobachtungsstudien durchgeführt werden können. Wo immer möglich, sollten klinische Studien als randomisierte Studien durchgeführt werden.

Eine Rolle zwischen randomisierten Studien und Beobachtungsstudien spielen nichtrandomisierte Studien, bei denen die Therapiewahl auf wenige Regimes eingeschränkt wird, die Wahl aber nicht dem Zufall überlassen ist. Sie werden in einigen Fällen verwendet, in denen die Randomisierung schwer durchsetzbar oder unmöglich ist, die äußeren Bedingungen aber kontrolliert dokumentiert werden sollen. Fälle, in denen die Randomisierung schwer durchsetzbar ist, sind z. B. Organtransplantationen, bei denen ein Spenderorgan nicht per Zufall zugeteilt werden kann.

Ergebnisse aus diesen Studien sind vorsichtiger zu betrachten als randomisierte Studien, da unbekannte oder fehlerhaft beobachtete Einflüsse den Therapieeffekt systematisch verzerren können. Solche Fehlbeobachtungen und deren Auswirkungen müssen im Zusammenhang mit den Ergebnissen kritisch diskutiert werden. Da diese Störgrößen im Gegensatz zu historischen Vergleichen auf standardisierte Weise erhoben werden können, sind die Fehlerquellen deutlich eingengt, und Ergebnisse können offensiver vorgetragen werden als Ergebnisse aus Studien mit historischen Kontrollen.

### 2.1.1 Retrospektive Studien

Retrospektive Studien gliedern sich in nichtvergleichende (Fallberichte, Fallserien) und vergleichende Untersuchungen. Vergleichende retrospektive Studien untersuchen Personengruppen, die sich z. B. im Erkrankungsstadium oder in der Behandlung unterscheiden; in der einfachsten Studiensituation wird nur dichotom nach Erkrankten (den Fällen) und Nichterkrankten (den Kontrollen) differenziert.

Retrospektiv, d. h. zurückschauend, wird dann festgestellt, inwieweit sich der Krankheitsverlauf beider Gruppen unterscheidet und ob sich durch gewisse (prognostische) Faktoren der beobachtete unterschiedliche Krankheitsverlauf beschreiben lässt. So kann z. B. beim Blasenkarzinom der Einfluss von Infiltrationstiefe, Differenzierungsgrad und begleitendem Carcinoma in situ, aber auch Alter und Geschlecht des Patienten untersucht werden. Da diese Faktoren jedoch untereinander in der Regel in enger Wechselbeziehung stehen (z. B. sind schlecht differenzierte Blasenkarzinome in der Regel infiltrativ, gut differenzierte wachsen meist oberflächlich), bedarf es einer biometrischen Betreuung, um mit statistischen Verfahren diese Korrelationen herauszuarbeiten. In der Regel sind hohe Fallzahlen notwendig, um zu validen Aussagen zu gelangen.

Ein weiterer Nachteil retrospektiver Studien liegt in der Unvollständigkeit der Daten: Nicht bei allen Patienten werden sämtliche – nachträglich als erforderlich erkannten – Untersuchungen in dem vereinbarten Zeitraster durchgeführt und dokumentiert (eingeschränkte Beobachtungsqualität).

Ebenfalls ein Nachteil ist die Tatsache, dass Patienten für eine bestimmte Behandlung ausgesucht wurden (Selektion) und die Kriterien sich mit der Zeit und von Klinik zu Klinik ändern. Auch ändern sich die diagnostischen Möglichkeiten (Carter 1985), so dass z. B. ein T2-Prostatakarzinom 1935 ein anderes ist als 2005 zu einer Zeit, in der mittels Sonographie, PSA und evtl. CT und MRT das Stadium besser festgelegt werden konnte.

Rückschlüsse auf die Effizienz unterschiedlicher therapeutischer Verfahren sind nur in Ausnahmefällen möglich. Die Schlüsse gehen immer von beobachteten Wirkungen aus und zielen dann auf deren mögliche Ursachen (z. B. die therapeutischen Maßnahmen).

Die Bedeutung vergleichender retrospektiver Analysen liegt in der Generierung von Hypothesen im Vorfeld kontrollierter Studien und in der Abschätzung der zu erwartenden Therapieeffekte (Rezidivhäufigkeit, Progressionsrate, Überlebensrate), aufgrund derer eine Stichprobenplanung erfolgen kann.

### 2.1.2 Prospektive Studien

Wesentlich für eine prospektive klinische Studie sind die wissenschaftliche Qualität und die praktische Durchführbarkeit. Für die Praktikabilität sind nicht nur organisatorische, sondern auch ethische Erwägungen entscheidend. Die heute dafür geltenden Normen beruhen auf den Nürnberger Militärgerichtsurteilen von 1949, der Deklaration von Helsinki 1962 und deren aktueller revidierter Fassung von Seoul 2008. Das Wohl des Patienten und die Achtung vor dem Menschen sind oberste Prinzipien. Jedoch werden neben dem Abwägen von Bedeutung, Nutzen und Risiko ausdrücklich auch das Vorgehen nach anerkannten wissenschaftlichen Grundsätzen und die wissenschaftliche Kompetenz des Ausführenden als ethische Norm postuliert (■ Tab. 2.1). Methodisch unzureichende Untersuchungen sind nicht nur wissenschaftlich wertlos, sondern auch unethisch. Eine Ethikkommission ist vor Studienbeginn einzuschalten.

Die klinische Prüfung ist in Deutschland in § 4 Abs. 23 des Arzneimittelgesetzes (AMG) definiert. Maßnahmen zum Schutz der Patienten sind im § 40–42 beschrieben..

Umfassendere Richtlinien zur **Good Clinical Practice** (GCP) wurden durch die Europäische Union (Richtlinie 2001/20/EG) und die Internationale Harmonisierungskonferenz (ICH) zur Abstimmung der Regularien zwischen Japan, den USA und der EU (ICH Guideline for Good Clinical Practice, 1997) erlassen. Diese Richtlinien der GCP beinhalten auch die Forderung nach Standardarbeitsanweisungen (SOP), die den Ablauf einer klinischen Studie regeln, nachvollziehbar machen sowie die Umsetzung von GCP im Einzelnen sicherstellen sollen.

Prospektive Studien werden üblicherweise in 4 Klassen unterteilt, die den 4 zeitlich aufeinander folgenden Phasen bei der klinischen Prüfung von Arzneimitteln entsprechen:

#### Phase-I-Studien

Mit Phase-I-Studien sollten für ein neues Medikament Fragen zur Pharmakokinetik, Bioverfügbarkeit, Toxizität und nach einem akzeptablen Dosisbereich beantwortet werden (■ Tab. 2.2). Die Untersuchungen werden an gesunden Freiwilligen oder im Rahmen der Onkologie auch bei Patienten mit weit fortgeschrittener Erkrankung durchgeführt, die mit bekannten Therapiemaßnahmen nicht mehr behandelbar sind (Leventhal et al. 1988).

#### Phase-II-Studien

Sie dienen der Bestimmung der Ansprechraten bei einer therapeutischen Dosis im angestrebten Indikationsgebiet (■ Tab. 2.2). Wirksamkeit und Verträglichkeit werden an einer kleinen Patientengruppe untersucht. Der Vergleich mit einer Kontrollgruppe (Standardtherapie oder Placebo) ist in onkologischen Phase-II-Studien selten (Leventhal et al. 1988). Das bloße Überschreiten einer minimal relevanten oder aus historischen Vergleichen bekannten

■ Tab. 2.1. Ethische Forderungen für den klinischen Versuch

Prinzipien	Normen
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Wohl des Patienten</li> <li>– Achtung vor dem Menschen</li> <li>– Gerechtigkeit/Billigkeit</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Anerkannte wissenschaftliche Grundsätze</li> <li>– Kompetenz des Ausführenden</li> <li>– Abwägung von Bedeutung, Nutzen und Risiko</li> <li>– Abbruch bei Schadensverdacht</li> <li>– Wahrung der Persönlichkeitsrechte</li> <li>– Aufklärung und Einwilligung</li> <li>– Genehmigtes Stundenprotokoll</li> </ul>

■ Tab. 2.2. Studienphasen I–IV

	Phase I	Phase II	Phase III	Phase IV
Design	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Einarmig</li> <li>– Geringe Fallzahlen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Oft noch einarmig</li> <li>– Geringe Fallzahlen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Standard ist Randomisation in Vergleichsgruppen</li> <li>– Repräsentative Fallzahlen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Breite Anwendung nach der Zulassung</li> <li>– Große Fallzahlen</li> </ul>
Zielgruppe	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Gesunde Probanden</li> <li>– Krebspatienten im Endstadium</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Patienten mit vorgesehener Indikation (eng umrissene E/A-Kriterien)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Patienten mit vorgesehener Indikation, E/A-Kriterien nahe an späterer Therapiepraxis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Unselektiertes Kollektiv der Patienten, an denen die Therapie angewandt wird</li> </ul>
Zielgrößen	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Toxizität</li> <li>– Bioverfügbarkeit</li> <li>– Pharmakokinetik</li> <li>– Dosierungsbereich</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Ansprechraten bei Patienten</li> <li>– Verträglichkeit</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Nachweis der Wirksamkeit</li> <li>– Aussagen zur Arzneimittelsicherheit</li> <li>– Nutzen/Risiko-Betrachtung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Sicherheit von Arzneimitteln und Therapie</li> <li>– Effektivität</li> </ul>



Response-Rate wird als Indiz für Wirksamkeit gewertet. Randomisierte Vergleichsgruppen sind jedoch wünschenswert, da aufgrund einer Patientenselektion (z. B.: Es werden nur Patienten mit insgesamt guter Prognose in die Phase-II-Studie aufgenommen) eine falsche Einschätzung der Wirksamkeit nicht auszuschließen ist.

### Phase-III-Studien

Hier wird ein mit neuen Therapieverfahren behandeltes Kollektiv (oder mehrere Kollektive) einer Kontrollgruppe gegenübergestellt, die eine Standardtherapie (oder ein Placebo bzw. keine Therapie) erhält. Ziel ist, Unterschiede in der Zielgröße zwischen den Vergleichsgruppen auf eine unterschiedliche Wirkung der Therapien zurückzuführen (Tab. 2.2). Diese Schlussweise ist aber nur gerechtfertigt, wenn die Patientengruppen bis auf den Behandlungsfaktor in allen übrigen bekannten und unbekanntem Einflussgrößen vergleichbar sind. Eine Vergleichbarkeit lässt sich durch drei Forderungen sicherstellen (Harms 1998, Schuhmacher, 2008):

1. **Strukturgleichheit** ist die Forderung nach einer ausgewogenen Verteilung aller bekannten und unkontrollierbaren Einflussgrößen auf die Therapiegruppen. Bei den unbekanntem Größen ist dies nur über eine streng zufällige Patientenzuteilung (Randomisation) auf die Studienarme zu erzielen. Bekannte Faktoren sollten vor der Randomisation dokumentiert sein und Patienten mit ausgewiesenen Risikofaktoren gleichmäßig auf die randomisierten Gruppen verteilt werden (Stratifikation).

Eine Sonderform der Randomisation sind Doppelblindstrategien, die jedoch in der Onkologie nur selten Anwendung finden. Dies liegt zum einen an dem technischen Problem, die oft komplizierten (oder sogar multimodalen) Therapieschemata zu verblinden, zum anderen an der raschen »De-facto-Entblindung« aufgrund der oftmals erheblichen und charakteristischen Nebenwirkungen.

Auch bei der häufigen Anlage onkologischer Studien als Langzeitprojekte mit Überleben als Endpunkt erscheint eine dauerhafte Ungewissheit über die Therapie bedenklich.

2. **Behandlungsgleichheit** bedeutet die gleiche therapeutische Versorgung beider Gruppen, abgesehen von dem Zielkriterium, das untersucht werden soll. Jede systematische Abweichung von der Behandlungsgleichheit muss im Voraus festgelegt werden und wird damit Teil des zu untersuchenden Therapieeffekts. Eine im Nachhinein festgestellte ungleich häufige Anwendung erlaubter Begleittherapien in beiden Therapiegruppen hat Auswirkungen auf die Interpretation

der Studienergebnisse, vor allem wenn anzunehmen ist, dass diese Begleittherapien das Zielkriterium beeinflussen können.

3. **Beobachtungsgleichheit** schließlich zielt auf die gleiche Untersuchung beider Therapiegruppen und standardisierte Beurteilung der Ergebnisse. Bei einem »harten Endpunkt« wie der Überlebensrate oder einem im Labor feststellbaren Zielkriterium wie der PSA-Erhöhung ist die Beobachtungsgleichheit leicht zu verwirklichen. Aber auch bei Laborbefunden droht eine Verzerrungsgefahr, wenn z. B. eine einmalige Resektion mit einer langwährenden chemotherapeutischen Behandlung anhand der entsprechenden laborotechnischen Überwachung des Verlaufs verglichen wird. Bei der Messung der Tumorresponse ist die Diagnostik so weit wie möglich zu standardisieren und idealerweise eine externe Beurteilung durch einen gegenüber der Therapie verblindeten Experten zu treffen.

Da ein positives Ergebnis einer Phase-III-Studie meist zur Zulassung des betreffenden Arzneimittels bzw. der entsprechenden Therapie führen soll, ist bei der Auswahl des Studienkollektivs bereits auf die **Repräsentationsgleichheit** zu achten: Sie zielt auf die prinzipielle Generalisierbarkeit des Studienergebnisses ab, d. h. dass die Gesamtheit der Studienpatienten einen repräsentativen Querschnitt (Zufallsstichprobe aus der Zielpopulation) darstellt, auf die das Studienergebnis verallgemeinert übertragen werden soll.

### Phase-IV-Studien

Phase-IV-Studien entsprechen den Kriterien von Phase-III-Studien und unterscheiden sich hiervon zunächst durch den Zulassungsstatus des jeweils verwendeten Arzneimittels.

Während bislang vor allem vom Gesetzgeber der Zweck von Phase-IV-Studien hauptsächlich in der Erfassung auch seltener Nebenwirkungen und einer genaueren Abgrenzung des Anwendungsbereichs gesehen wurde, gehen die eigentlichen Forschungsmöglichkeiten im Rahmen der Phase IV darüber hinaus.

Die Ergebnisse der Phase-I–III-Studien leiden noch weitgehend unter einer Einschränkung durch unvollständige Risikobeschreibung, durch mangelnde Repräsentativität und beschränkte Beobachtungsdauer, da sie in der Regel nur an einer relativ kleinen Anzahl von Patienten sowie zeitlich stark limitiert und ohne den umfassenden Vergleich mit evtl. vorhandenen Alternativtherapien durchgeführt werden.

Dieser eingeschränkte Kenntnisstand zum Zeitpunkt der Zulassung kann durch den Einsatz kontrollierter kli-