

Mit neuen molekularen Techniken
Pankreaskrebs frühzeitig erkennen:

Nur ein paar Zellen

Wenig auszurichten hat die Medizin, wenn in der Bauchspeicheldrüse durch mikroskopisch kleine Läsionen eine Tumor-Entwicklung angestoßen wird. Denn den Anfängen wehren hieße, schon ein paar Zellen von außen zu erkennen. Wie mit einer „biologischen Lupe“ will jetzt ein interdisziplinäres Team die Krebs-Vorstufen durch Molekulares Imaging sichtbar machen.

„Wir kommen immer zu spät, es gibt keine Möglichkeit der Früherkennung“, beschreibt Prof. Dr. Stephan Hahn die schlechte Prognose bei Bauchspeicheldrüsenkrebs. Wenn Patienten mit ersten Symptomen zum Arzt kommen, hat der Krebs in 80 Prozent der Fälle bereits Metastasen gebildet. Da eine wirksame Chemotherapie bei dem sog. Pankreaskarzinom fehlt, bleibt nur die Operation – und die heißt

in der Regel, den Pankreaskopf zu entfernen. Die Krankheit eindämmen kann auch das nur selten. Zudem ist die Bauchspeicheldrüse für operative Eingriffe schwer zugänglich. Die traurige Bilanz: 95 Prozent der Patienten

sterben noch im ersten Jahr nachdem der Krebs festgestellt wurde.

Große Hoffnungen setzen Mediziner darauf, den Tumor früher zu erkennen. Sie haben dabei vor allem die Risikogruppen im Blick: Das sind Menschen mit einem familiären Risiko, das auch mit anderen Krebsarten, etwa Brustkrebs, verbunden sein kann, Patienten mit chronischer Pankreatitis und auch Raucher. Doch wo sollen Forscher ansetzen, wenn die Frühstadien symptomlos verlaufen? Wonach sollen sie überhaupt suchen?

Für Stephan Hahn war die erste Überlegung, dass sich im Randgewebe operativ entfernter Tumoren hin zu den angrenzenden gesunden Zellen alle Stadien der Krebsentwicklung finden lassen müssten. Den nächsten Ansatzpunkt bildete ein sog. genetisches Tumor-Progressionsmodell, wie es erstmals 1991 für den Dickdarmkrebs entwickelt wurde. Anhand eines solchen für das Pankreaskarzinom abgeleiteten Modells, sollten sich die in der Tumor-Umgebung beobachteten Zellveränderungen hinsichtlich mög-

Mit der „molekularen Lupe“ Zellstrukturen von Krebs-Vorstufen finden

licher Krebs-Vorstufen überprüfen lassen. Ihr Nachweis wäre die Voraussetzung für ein Molekulares Imaging. „Das heißt, quasi mit einer biologischen Lupe heranzugehen“, umschreibt Prof. Hahn die Art und Weise, Zellstrukturen von Krebsvorstufen zu finden, um sie dann von außen sichtbar zu machen.

Für dieses Ziel hat der Onkologe im Laufe der Jahre – und nicht immer leichten Herzens – die Arbeit am Patienten gegen reine molekularbiologische Forschung eingetauscht. Es hieße

trotzdem, die Stecknadel im Heuhaufen zu suchen, hätte sich dem nicht gleich ein ganzes Netzwerk aus Pathologen, Molekularbiologen und Imaging-Profis verschrie-

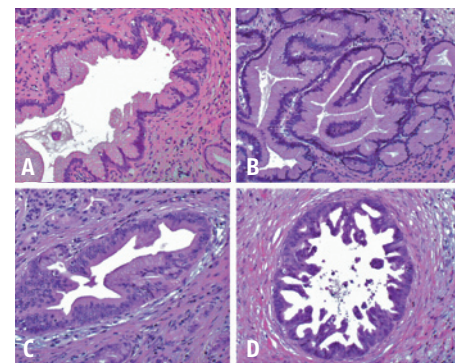


Abb. 2: Gewebeprobe aus frühen Läsionen des Pankreaskarzinoms lassen sich den sog. PanIN-Stufen des Pankreas-Progressionsmodells zuordnen: A und B für PanIN 1, C für PanIN 2, D für PanIN 3

ben – alle eingebunden in das Projekt Mol-Diag-Paca des 6. Forschungsrahmenprogramms der EU (s. Info). So haben Pathologen um Prof. Klöppel (Kiel) aus winzigen auf eine bestimmte Krebsvorstufe – eine sog. PanIN-Stufe (Pankreatische Intraepitheliale Neoplasie) – hindeutenden Pankreas-Läsionen je 100 bis 1 000 Zellen unter dem Mikroskop mit feinen Glaskapillarnadeln herauspräpariert (s. Abb. 2) und das Material zur genetischen Analyse nach Bochum geschickt.

Genetische Veränderungen in Pankreas-Tumorzellen reichen von Mutationen bis zum Verlust ganzer Chromosomenstücke. Prof. Hahn nahm sich gezielt jene Chromosomenabschnitte vor, auf denen das Zellwachstum hemmende Tumorsuppressorgene (TS) liegen: p16 auf Chromosom 9p, DPC4 auf Chromosom 18q, p53 auf Chromosom 17p. Wenn sie inaktiviert sind, kann der Tumor ungebremst wuchern. Und tatsächlich stellte der Bochumer Forscher fest, dass ab PanIN-Stufe 2 zunehmend Chromosomenstücke verloren gehen (s. Abb. 3). Auch Mutationen des K-ras Onkogens, das unkontrolliertes Zellwachs-



Abb. 1: Der Forscher und sein Objekt: Professor Hahn mit dem Modell einer Bauchspeicheldrüse (Querschnitt, rechts: Milz)

Zunahme genetischer Veränderungen

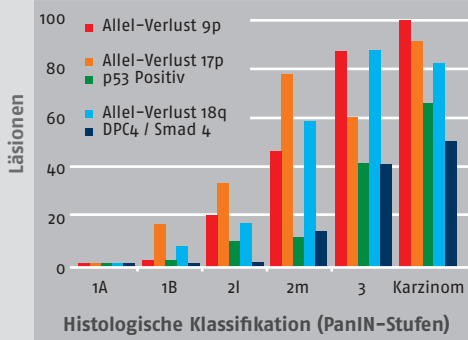


Abb. 3: Genetische Veränderungen nehmen mit steigender PanIN-Stufe von frühen Krebs-Vorstufenzellen bis zum Tumorgewebe hin zu. Dabei kommt es ab PanIN-Stufe 2m verstärkt zum Verlust von Chromosomenstücken, auf denen sich Tumorsuppressorgene (TS) befinden, die das Zellwachstum hemmen: TS p16 auf Chromosom 9p, TS DPC4 auf Chromosom 18 q, TS p53 auf Chromosom 17p.

tum aktiviert, sind mit steigender PanIN-Stufe vermehrt zu finden, treten aber häufig schon in früheren Vorstufen auf.

Die genetischen Daten bestätigten die Läsionen als Vorstufen des Pankreaskarzinoms und untermauern damit das von feinen Gewebeveränderungen abgeleitete Progressionsmodell (s. Abb. 4). Doch für Diagnostik und Therapie bieten Proteine bessere Angriffsflächen. Sie setzen die genetische Information um, sind in den Zellen nachweisbar und lassen sich therapeutisch verändern, ohne gleich in die Erbanlagen eingreifen zu müssen.

Da eine Proteinanalyse technisch schwieriger ist, griffen die Netzwerk-Forscher auf die messengerRNA (mRNA) zurück – eine Zwischenstufe zwischen DNA und Protein. Mithilfe von Gen-Chips (Prof. Gress,

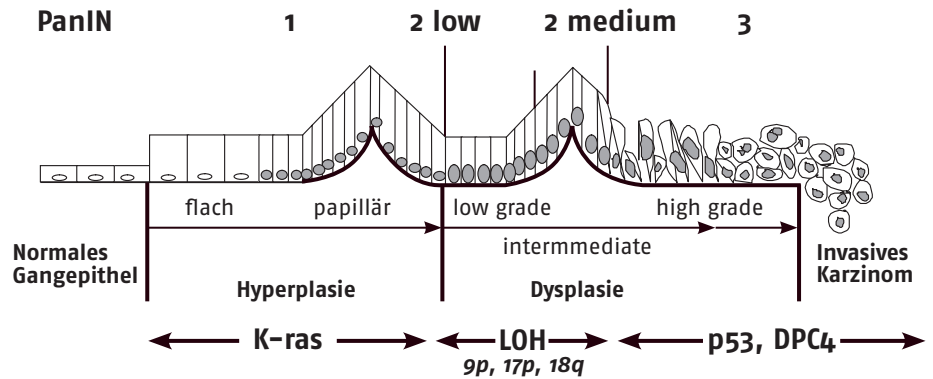


Abb. 4: Progressionsmodell für das Pankreaskarzinom: Ausgehend vom Gangepithel (Normalzellen) setzt die Tumorentwicklung zunächst mit einer Volumenzunahme (Hyperplasie) der Vorläuferzellen (PanIN 1) ein und es sind Mutationen nachweisbar (K-ras-Onkogen auf Chromosom 12p). Im weiteren Verlauf (PanIN 2) verformen sich die Zellen (Dysplasie), die Zellkerne verändern sich in Form und Größe und es gehen verstärkt Chromosomenstücke (9p, 17p, 18q) mit Tumorsuppressorgenen (p 16, p53, DPC4/Smad4) verloren. Am Ende des PanIN 3-Stadiums durchbrechen die Tumorzellen die Basalmembran – es liegt ein invasives Karzinom vor.

Marburg) und der SAGE-Technologie (Prof. Hahn, Bochum) erstellten sie zunächst eine umfangreiche Liste der in den Vorstufen im Vergleich zu Normalzellen vermehrt vorliegenden mRNA-Moleküle. In dieser „Bibliothek“ wollen sie Informationen finden, durch die sich die PanIN-Stufen deutlich von den entsprechenden Normalzellen abgrenzen lassen. Dabei konzentrieren sich die Forscher in erster Linie auf PanIN-Stufe 3, die sich unmittelbar an Stufe 2 anschließt und sich im Gegensatz zu PanIN 1 sehr wahrscheinlich zu Krebszellen weiterentwickelt (s. Abb. 4).

Ein Gen-Chip ist nichts anderes als ein Glas-Objektträger mit bis zu 50 000 immobilisierten mRNA-Zielmolekülen, an denen die zugegebene komplementäre mRNA etwa aus einer PanIN 3-Läsion

bindet. Je mehr der farbmarkierten Vorstufen-mRNA sich an einer Chip-mRNA anlagert, umso sicherer kann sie identifiziert werden (s. Abb. 5). „Aber ich muss alles vorher kennen, was ich nachweisen will“, sagt Stephan Hahn und hat sich da-

Gen-Chip-Prinzip: Nur was bekannt ist, lässt sich nachweisen

her vor Jahren, als ein Gen-Chip noch unglaublich teuer und erst ein Teil der Gene entschlüsselt war, für die SAGE-Technik entschieden. Dabei wird die gesamte mRNA aus einer Vorläufer-Zelle isoliert und solange über verschiedene enzymatische Zwischenschritte manipuliert, bis für jede mRNA ein so genanntes Tag, ein repräsentatives 21 Basenpaare langes

info

Projekt MolDiag-Paca: Von der Stecknadel im Heuhaufen ...

Mit dem Ziel, neue molekulare Techniken zu entwickeln, mit denen sich auch kleinste Mengen an Tumor- und Tumorstufen-Zellen in Gewebe und Zellflüssigkeiten nachweisen lassen, fördert die Europäische Union seit Mitte 2006 das Projekt MolDiag-Paca (Novel molecular diagnostic tools for the prevention and diagnosis of pancreatic cancer) in ihrem 6. Forschungsrahmenprogramm. An MolDiag-Paca sind neben Deutschland auch Großbritannien, Spanien, Italien, Schweden und Estland beteiligt. Eine deutsche Gruppe (Arbeitsbereich 6 „Molekulares Imaging“) wird von Prof. Dr. Stephan Hahn koordiniert:

■ Prof. Dr. Thomas Gress, Universität Marburg, Gen-Chip-Analyse ■ Prof. Dr. Jörg Hoheisel, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg,

Antikörper-Herstellung für die Immunhistologie ■ Prof. Dr. Stephan Hahn, Universität Bochum, SAGE-Technologie, Universität Heidelberg ■ Prof. Dr. Günter Klöppel, Universität Kiel, Pathologie, Mikrodisektion, Immunhistologie ■ Prof. Dr. Christoph Bremer, Universität Münster, Fluoreszenz vermittelte Tomographie ■ Prof. Dr. Sven Reske, Universität Ulm, Positronen Emissions Tomographie ■ Prof. Dr. Jörg Rademann und Dr. Jens Peter von Kries, Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie (FMP), Berlin, Compound Bibliothekscreen, Modelling ■ Bayer Schering Pharma AG, Imaging- Kandidatenselektion
► Expressionsdatenbank – Pankreaskarzinom mit Daten aller Vorläufer-Stadien unter: www.pancreasexpression.org/

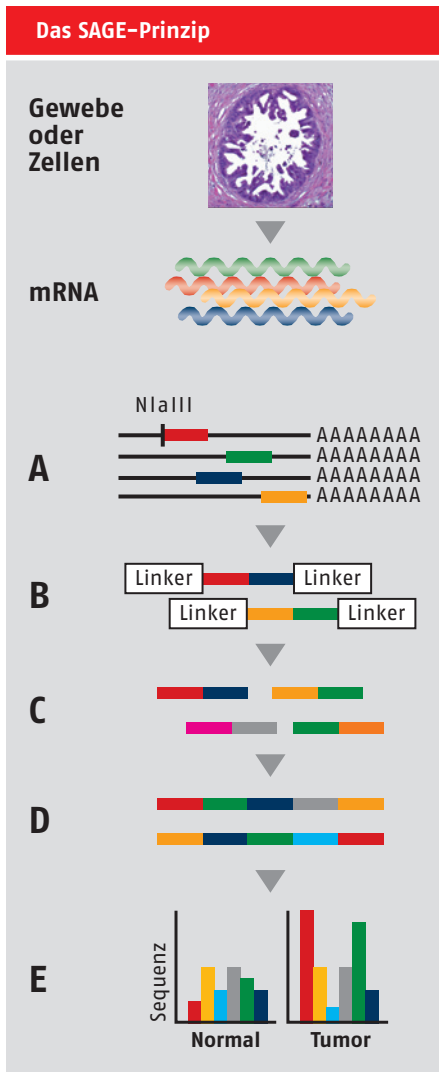


Abb. 6: Das SAGE-Prinzip: Die aus Vorläufer- und Normalzellen isolierte mRNA „schneidet“ Enzyme (A: NlaIII) in kleine Fragmente. Mit Hilfe sog. Linker und der PCR-Technologie sowie erneutem „Enzymverdau“ entsteht für jedes mRNA Molekül ein 21 Basenpaare langes Stück, das sog. Tag (B). Jeweils 20 bis 50 dieser Tags werden für die mRNA-Bestimmung – von der auf den genetischen Hintergrund geschlossen werden kann – zu Ketten aneinandergereiht (C/D). Der Tumor weist eine deutliche Zunahme an mRNA-Tags auf (E).

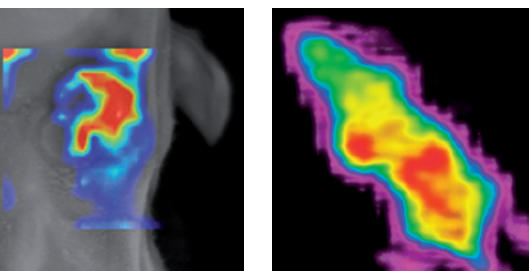
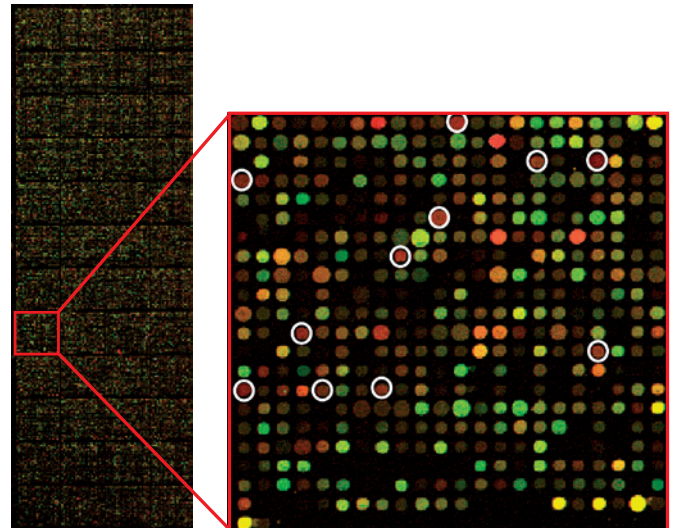


Abb. 7: Molekulares Imaging heißt, Zellen bzw. Gewebe im Körperinneren von außen sichtbar zu machen – hier mittels radioaktiver Markierung durch ein Computer-Tomogramm (rechts) oder über einen Infrarotlaser (links).

Abb. 5: Das „Gen-Chip-Prinzip“: Farbmarkierte mRNA aus der Tumor-Vorläuferzelle bindet an die korrespondierende mRNA auf dem Chip. Je mehr Moleküle sich an der jeweiligen Chip-mRNA anlagern, desto tiefer ist die Färbung und desto sicherer lässt sich die mRNA der Vorläufer-Zelle identifizieren und quantifizieren.



Stück, vorliegt. Bei dieser Sequenzlänge kann meist eindeutig auf ein bestimmtes Gen und damit auf das Protein geschlossen werden (s. Abb. 6).

Gen-Chip- und SAGE-Analyse lieferten eine „Bibliothek“ von rund 2 000 mRNA-Molekülen, die in den einzelnen PanIN-Stufen verändert vorliegen. Die Partner haben diese „mRNA-Bibliothek“ inzwischen gezielt durchsucht, etwa nach Oberflächenstrukturen oder bekannten Oberflächenrezeptoren, weil ein Diagnostikum über die Blutbahn zuerst die Zelloberfläche erreicht und Oberflächenrezeptoren Imaging-Moleküle binden können. Das Ergebnis war eine Liste von 20 Imaging-Kandidaten.

Inzwischen hat der Pathologe noch einmal am Primärgewebe überprüft, ob sich die veränderte mRNA-Situation auch wirklich auf der Proteinebene bestätigen lässt und die Auswahl noch einmal auf fünf Prote-

In der „mRNA-Bibliothek“ nach Tumor-Markern suchen

ine eingegrenzt. Mit diesen Markern entwickeln die Forscher nun Sonden für ein Molekulares Imaging: Die Berliner Gruppe generiert derzeit Bindemoleküle für die bestätigten fünf Proteine. Hahns Kollegen aus Münster (Prof. Bremer) und Ulm (Prof. Reske) entwickeln Markierungsstrategien, um das gebundene Molekül und damit das Vorläufer-Gewebe des Karzinoms von außen sichtbar zu machen. So soll etwa ein radioaktiv markiertes Diagnostikum (Prof. Reske) über die Blutbahn zum Zielgewebe gelangen, dort binden und mithilfe eines speziellen Tomographieverfahrens (z.B. Positronen Emissions Tomographie,

PET) die Krebsvorstufen sichtbar machen (s. Abb. 7). Der Nachweis einer fluoreszenzmarkierten Sonde dagegen soll endoskopisch erfolgen (Prof. Bremer). Dafür muss das Messinstrument etwa über eine Magenspiegelung in die Nähe des Pankreaskopfes gebracht werden.

Die Imaging-Moleküle testen die Forscher nun in Zellkulturen, später geht es in sog. Tiermodelle, die bereits für andere Erkrankungen Standard sind. Bei einem Pankreas-Modell werden menschliche Tumorzellen in Bauchspeicheldrüsen von Mäusen implantiert, um sie dort mit dem Imaging Molekül zu markieren. Zudem stehen Mausmodelle zur Verfügung, die durch gezielte genetische Manipulation die PanIN-Vorstufen des Pankreaskarzinoms ausbilden. Tiermodelle bieten die Möglichkeit, die menschliche Tumorentwicklung zu simulieren und damit auch ein Diagnostikum relativ wirklichkeitsnah zu testen. Ob es klappt, wird die Gruppe frühestens in drei Jahren wissen. Mit dem Mausmodell endet für die Forscher das EU-Projekt. Dann beginnt die klinische Phase.

„Wir wären sehr glücklich, wenn wir PanIN-3 sicher nachweisen könnten, wir reden hier über nicht allzu viele Zellen. Wird es uns gelingen, genug Signalstärke an eine mikroskopische Läsion zu bringen, so dass wir sie von außen erkennen können?“, fragt sich Stephan Hahn. Früherkennung jedenfalls wäre ein Riesensprung für die Pankreastherapie, auch wenn wir derzeit „nur“ – aber rechtzeitig – operieren könnten.

Kontakt: Prof. Dr. Stephan Hahn, Molekulare Gastroenterologische Onkologie, Medizinische Fakultät, Stephan.Hahn@rub.de