

SKRIPTUM KREBSENTSTEHUNG

[Arno Helmberg](#)

Dieses Skriptum ist eine Lernhilfe zu meinen Vorlesungen an der Medizinischen Universität Innsbruck im Modul "Tumoren" sowie der Spezialvorlesung "Onkogene und Antionkogene". Eine darauf basierende, vollständigere Version findet sich als Kapitel 13, Maligne Neoplasien, im Lehrbuch "Pathophysiologie" von S. Schwarz et al., Maudrich, Wien 2007. Ich möchte alle Studierenden ermutigen, sich eine gute Basis an medizinischem Englisch zu erarbeiten und stelle das Skriptum daher auch in einer [Englischen Version](#) zur Verfügung.

Version 4.1

©Arno Helmberg 2000-2017

Pdf- Version von <http://www.helmberg.at/krebsentstehung.htm>

Der menschliche Organismus stellt eine Gesellschaft von Zellen dar. Mitglieder haben Aufgaben, wie in jeder funktionierenden Gesellschaft, und müssen sich an Regeln halten. Die Erledigung von Aufgaben und das Befolgen von Regeln werden durch Genexpression implementiert. Maligne Neoplasien entstehen durch Verlust dieser Regeln durch genetische und epigenetische Veränderungen in individuellen somatischen Zellen. Die typische maligne Zelle entsteht schrittweise in einem "Mikroevolutionsprozess", der über Jahre zu einer Akkumulation von 5 bis 10 kritischen Veränderungen in einer spezifischen Zelle führt. Jede dieser Veränderungen, die hauptsächlich Gene für Zellteilungsregulation, Apoptoseregulation und DNA-Reparatur betreffen, führt zu einem Verlust weiterer Regeln und damit zu einem weiteren Selektionsvorteil der betroffenen Zelle gegenüber den Nachbarzellen, bis ein "gesetzloser" Zellklon entsteht, der den Gesamtorganismus gefährdet.

1. NORMALE WACHSTUMSREGULATION: PROTOONKOGENE

Unter welchen Bedingungen proliferieren Zellen?

Betrachten wir zunächst einen einfachen, einzelligen Organismus, z. B. eine Hefezelle, die wir in eine Umgebung mit optimalen Umweltbedingungen setzen und mit reichlich Nährstoffen, Sauerstoff, kurz allem, was die Zelle benötigt, versorgen. Was geschieht? Die Zelle wird sich selbst so lange replizieren, wie die Umweltbedingungen das zulassen.

Mit der Evolution der Vielzeller ergab sich daher ein Dilemma: Einerseits ist es für die Funktion des vielzelligen Organismus notwendig, dauernd für die Zellen günstige Bedingungen aufrecht zu erhalten; z. B. ein ausreichendes Zucker- und Sauerstoffangebot. Andererseits müssen die Zellen jedoch daran gehindert werden, durch unkontrollierte Proliferation die Organisation des Gesamtorganismus zu sprengen. Die Vielzelligkeit bedingte daher völlig neue Mechanismen, um die bis dahin im Wesentlichen von der Nährstoffsituation abhängige Zellteilung zu regulieren. Ein aus Zellen mit begrenzter Lebenszeit bestehendes Gewebe konstant zu erhalten, ist bereits eine komplexe Aufgabe. Doch das statische Aufrechterhalten genügt noch nicht: die Gesamtmasse der die Funktion erfüllenden Zellen muss zusätzlich den wechselnden physiologischen Erfordernissen angepasst werden. Die Gesamtmenge der Erythrozyten z. B. sollte unter gleich bleibenden

Lebensumständen —berufliche Tätigkeit in Mitteleuropa— konstant bleiben, bei einem Aufenthalt in größeren Höhen aber gesteigert werden können. Wie ist ein solches Problem zu lösen?

Während analoge Fragen für die meisten Gewebe noch nicht beantwortbar sind, sind für Erythrozyten die Grundzüge der Regulation erforscht. Die elegante Lösung besteht in einem Regelkreis, in dem ein Absinken des Sauerstoffpartialdrucks (pO_2) in der Niere die Neubildung der Erythrozyten im Knochenmark stimuliert. Nierenzellen exprimieren, wie die meisten Zellen, einen Transkriptionsfaktor, HIF-1 (*hypoxia inducible factor*), der normalerweise so rasch abgebaut wird, dass das Protein kaum nachweisbar ist. Voraussetzung für diesen raschen Abbau durch den Ubiquitin-Proteasom-Weg (siehe unten) ist die Hydroxylierung von HIF-1 durch eine Prolyl-Hydroxylase. Diese Oxidierung benötigt Sauerstoff, und das Enzym ist so ausgelegt, dass es bei normalem pO_2 gerade noch funktioniert. Sobald der pO_2 in der außerordentlich stark durchbluteten Niere unter den Normalwert sinkt, funktioniert die Prolyl-Hydroxylase nicht mehr. HIF-1 wird nicht hydroxyliert und damit auch nicht mehr abgebaut; es akkumuliert im Kern und bindet an seine Erkennungssequenz in den Promotoren mehrerer Gene, darunter das Gen für [Erythropoetin](#) (EPO). Der Mechanismus setzt also einen geringen Abfall der Sauerstoffkonzentration in die Ausschüttung des Signalmoleküls Erythropoetin um.

Erythropoetin erhöht die Proliferationsrate von erythropoetischen Vorläuferzellen (*colony forming units CFU_E* und *burst forming units BFU_E*) der erythrozytären Entwicklungsreihe im Knochenmark. Damit das extrazelluläre Signalmolekül den Prozess der Zellteilung beeinflussen kann, sind eine Reihe von charakteristischen Schritten nötig, die zu einer Veränderung der Genregulation und zu einer Veränderung der Zusammensetzung und der Aktivität der Zellzyklus-regulierenden Proteine führen. Das Prinzip dieser Signalumsetzung ist für alle proliferationsfördernden Signalproteine (Wachstumsfaktoren) gleich; die daran beteiligten Proteine und Gene sind kritisch für die Krebsentstehung.

Im spezifischen Fall der erythrozytären Stammzellen führt die Bindung von Erythropoetin zur Dimerisierung zweier Erythropoetinrezeptoren, deren intrazelluläre Domäne jeweils mit einer Janus-Kinase, JAK2, assoziiert ist. Die beiden JAK2-Moleküle phosphorylieren zunächst einander, dann mehrere Tyrosin-Seitenketten des EPO-Rezeptors als auch neu hinzukommende Proteine, die diese phosphorylierten Tyrosine binden. Eines dieser Proteine ist ein Mitglied der STAT-Familie (*signal transducer and activator of transcription*), STAT5. Phosphorylierte STAT5-Moleküle bilden ihrerseits Dimere und wandern in den Kern, wo sie direkt an DNA binden und die Transkription von Genen aktivieren, die die Proliferation fördern, z. B. die Gene für den Transkriptionsfaktor c-Myc sowie ein Molekül namens "Cyclin D". Durch die Steigerung der Erythrozytenproduktion steigt schließlich der Hämatokrit, bis der pO_2 wieder ausreicht, um HIF-1 effizient abzubauen. Der Regelkreis ist damit geschlossen.

An diesem Beispiel wird ein allgemein gültiges Prinzip klar: Proliferation erfolgt nicht einfach aufs Geratewohl, sondern genau geregelt und erst, wenn Bedarf nach neuen Zellen besteht. Dieser Bedarf wird meist von anderen Zellen gemessen und durch ein Signalmolekül denjenigen Zellen mitgeteilt, die durch Proliferation den Bedarf decken können.

Teilung versus Differenzierung

Am Beispiel der Erythropoese ist die Aufteilung der Zellen eines Gewebes in zur Proliferation befähigte Zellen –Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark-- und nicht mehr zur Proliferation befähigte "Arbeitszellen" –Erythrozyten-- leicht ersichtlich. Dasselbe Prinzip gilt für die meisten Gewebe des Körpers. Im Darmepithel sitzen die Stammzellen beispielsweise am Boden der Krypten; die *transit amplifying cells* schließen nach oben hin an. Nur ein geringer Anteil an Zellen eines Gewebe sind zur Proliferation fähig: die Stammzellen und wenige nachfolgende Zellgenerationen. Wird Proliferationsbedarf durch entsprechende Signalmoleküle angezeigt, teilen sich Stammzellen "asymmetrisch": eine der beiden Tochterzellen ist ein wenig differenzierter, während die andere Tochterzelle ein genaues Abbild der Mutterzelle ist. Damit bleibt der Stammzellpool erhalten. Stammzellen teilen sich so selten wie möglich; die nachfolgenden Zellgenerationen, als *transit amplifying cells* bezeichnet, teilen sich wesentlich rascher.

Im Knochenmark bilden sich aus diesen differenzierteren Tochterzellen unter Einfluss des Musters an vorhandenen Signalmolekülen determinierte *colony forming units*, die sich nur mehr in eine der hämatologischen Zellarten entwickeln können. Auch die Teilungsaktivität dieser Vorläuferzellen wird wesentlich von Wachstumsfaktoren beeinflusst. Erythropoetin beispielsweise entfaltet seine Wirkungen auf dieser Ebene. Von der Gesamtheit der teilungsfähigen Zellen spricht man als Proliferationsspeicher. Nach mehreren, doch strikt limitierten (10-15) Generationen von expandierenden Vorläuferzellen zunehmender Differenzierung erreichen die Zellen das Stadium der "terminalen Differenzierung" und verlieren die Fähigkeit, zu proliferieren. Die Zellen reifen von da an nur mehr aus und werden in ihrer Gesamtheit als Reifungsspeicher bezeichnet. Aus einer durch die Teilung einer Stammzelle hervorgegangenen *transit amplifying cell* entsteht also ein großer, aber kurzlebiger Zellklon, der zur Ausbildung von teilungsunfähigen "Arbeiterzellen" führt. In diesem Zellklon neu auftretende Mutationen haben geringe Bedeutung, da diese Zellen nur beschränktes Teilungspotential und beschränkte Überlebenszeit haben. Erythrozyten überleben etwa drei Monate, Darmepithelzellen nur wenige Tage.

(Krebs-) Stammzellen

Aufgrund der Notwendigkeit der Akkumulation von mehreren Mutationen zur Ausbildung einer malignen Zelle, ein Prozess, für den eine lange Reihe von Zellteilungen notwendig erscheint, nimmt man an, dass das initiale Mutationsereignis für die meisten, wenn nicht für alle Neoplasien auf Stammzellniveau zu suchen sein muss. Das Tumorgewebe behält dabei meist durchaus die Aufgabenteilung in Stammzellen, *transit amplifying cells* und mehr oder weniger differenzierte Zellen bei.

Mehrere Mechanismen schützen Stammzellen so gut es geht, sodass sie so wenig wie möglich Mutationen ansammeln:

1. Stammzellen teilen sich so selten wie möglich. Es werden also so wenige DNA-Replikationen wie möglich in Serie geschaltet, da DNA-Replikation unweigerlich Kopierfehler mit sich bringt. Viele Stammzellen verbringen den Großteil ihrer Zeit daher in einem Ruhezustand, einem Dornröschenschlaf, aus dem sie nur geweckt werden, wenn Bedarf nach neuen Zellen gemeldet wird. Das macht es außerordentlich schwierig, Tumorstammzellen zu vernichten, da die klassische Chemotherapie nur in aktiv proliferierenden Zellen gut wirkt. Außerdem ist eine Stammzelle nach außen hin eine

"Zelle ohne Eigenschaften": sämtliche Transmembranproteine oder Signaltransduktionswege, die mit irgendeiner Differenzierung verbunden wären, bleiben durch epigenetische Mechanismen stillgelegt. Daher bleiben auch unsere neueren, gezielten Therapiemöglichkeiten, wie Antikörper oder Kinasehemmer, wirkungslos.

2. Um den Kontakt mit Mutagenen zu minimieren, sitzen Stammzellen in anatomisch geschützten Nischen: hämatopoetische Stammzellen im Knochen, wo ionisierende Strahlung am schwersten hingelangt; Stammzellen der Haut am Schaft des Haarfollikels, so weit wie möglich vom Hauptmutagen der Haut, den UV-Strahlen, geschützt; Darmepithel-Stammzellen am Boden von Krypten, so weit wie möglich und durch ein gegenläufiges "Schleimförderband" von Mutagenen im Darmlumen geschützt.
3. Stammzellen verfügen auch über eine erhöhte Pumpleistung, um fragwürdige Alkaloide, potentielle Mutagene, besonders effizient wieder aus der Zelle hinauszupumpen: das MDR1 (*multi-drug-resistance*)-Gen, das die Membranpumpe P-Glykoprotein kodiert, wird in Stammzellen besonders stark exprimiert. Während dieser Mechanismus in gesunden Stammzellen außerordentlich nützlich ist, macht er Tumorstammzellen beinahe unverwundbar: viele Chemotherapeutika werden ebenfalls durch diese Pumpe gepumpt und erreichen dadurch keine ausreichenden intrazellulären Konzentrationen.
4. Manche Stammzellen, z. B. jene des Darmepithels, haben eine gesenkte Apoptoseschwelle. Eine DNA-Schädigung in einer Darm-Stammzelle führt dazu, dass diese sofort in Apoptose geht. Die Logik ist offenbar: lieber eine Stammzelle weniger, als das Risiko einer mutierten Stammzelle einzugehen. Diese Besonderheit führt zu Problemen bei einer Strahlentherapie: wird eine Darmschlinge bestrahlt, gehen alle Stammzellen in diesem Bereich gleichzeitig in Apoptose, und wenige Tage später entsteht eine Nekrose mit Durchwanderungsperitonitis.
5. Schließlich gibt es Hinweise, dass über einen noch unverstandenen Mechanismus der Original-DNA-Strang wie ein Erbstück in der Stammzelllinie weitergegeben wird. Die Semikonservative Replikation der DNA bedeutet, dass Mutationen eher im neuen Strang durch Fehleinbauten auftreten. Wenn die neuen Stränge systematisch an die *transit amplifying* Töchter weitergegeben werden und die Originalstränge systematisch an die Stammzell-Töchter, bedeutet das eine Minimierung des Mutationsrisikos in der Stammzelllinie.

Um zusammenzufassen: Trotz all dieser Sicherheitsmaßnahmen, um Stammzellen vor Mutationen zu schützen, kommen Mutationen auch in Stammzellen vor und können zur Bildung von **Tumorstammzellen** führen. Versuchen wir, einen Krebspatienten zu therapieren, mag es uns gelingen, 99,9% aller Krebszellen zu töten, aber in vielen Fällen werden einige Krebsstammzellen überleben. Ausgehend von diesen wenigen Zellen, welche die Therapie überlebt haben, kann der Tumor wieder nachwachsen ("Rezidiv").

Zellteilung ist ein Programm, das das An- und Abschalten vieler Gene beinhaltet

Wenn sich eine zur Proliferation fähige Zelle dazu "entschlossen" hat, sich zu teilen, bedeutet das, dass der innere Zustand der Zelle ziemlich umgekrempelt wird. Viele Gene, die in der G0/G1-Phase aktiv waren, müssen abgeschaltet, andere dafür angeschaltet werden. Beispiele für Gene, die angeschaltet werden müssen, sind alle jene, die speziell für DNA-Replikation und Mitose gebraucht werden.

Vom Signalmolekül zur Änderung der Genexpression: Protoonkogen-Klassen

Die Information, die in Form eines Signalmoleküls von außen kommt, kann nur über mehrere Molekül-Stationen in eine geänderte Genexpression und Entscheidungen über Proliferationsverhalten umgesetzt werden. Moleküle, die diese Funktionen wahrnehmen, sind anfällig dafür, durch Mutationen zu aktiven Onkogenen verändert zu werden. In ihrem normalen, physiologischen Zustand werden sie als Protoonkogene ("Vor-Onkogene") bezeichnet und funktionieren als:

Klasse I: Wachstumsfaktoren

Klasse II: Rezeptoren für Wachstumsfaktoren

Klasse III: Signaltransduktionsmoleküle

Klasse IV: Transkriptionsfaktoren

Klasse V: Bestandteile der Zellzykluskontrollmaschinerie

Prinzip der Protoonkogen-Aktivierung: eine Mutation täuscht das Vorhandensein eines Wachstumssignals vor

An einer Signal-Transduktionskette für einen Wachstumsfaktor kann das Prinzip der Onkogenaktivierung durch eine Mutation besonders gut demonstriert werden. Physiologischerweise werden die Moleküle dieser Kette an- oder abgeschaltet: in Abwesenheit des Wachstumsfaktors bleiben sie inaktiv; erst durch den Wachstumsfaktor werden sie aktiviert. Das Wesen der Onkogenaktivierung liegt darin, dass eine Mutation eines dieser Moleküle so verändert, dass es immer im angeschalteten Zustand vorliegt, also nicht mehr abgeschaltet werden kann. Für die Zelle wird durch die Mutation das Vorhandensein eines Wachstumssignals vorgetäuscht. Die Zelle reagiert auf die einzige Art, wie sie reagieren kann: sie proliferiert.

Für die Erythropoetin-Signaltransduktionskette gibt es ein reales Beispiel: die Mutation Val617Phe im JAK2-Molekül führt zu einer Daueraktivierung dieser Rezeptor-assoziierten Janus-Kinase. Diese Mutation findet man häufig bei *Polycythaemia vera*.

Bei weitem nicht alle Mutationen in einem Protoonkogen haben diesen Effekt: die meisten Mutationen führen dazu, dass das kodierte Protein nicht mehr funktioniert (*loss of function*). *Loss of function*-Mutationen in Protoonkogenen haben für die Krebsentstehung keine Bedeutung. Für die Aktivierung eines Protoonkogens zu einem Onkogen sind nur die selteneren aktivierenden Mutationen (*gain of function*) relevant.

Man könnte versuchen, eine automobiler Parallele zu konstruieren: die meisten Defekte werden zur Folge haben, dass das Auto nicht mehr fährt (*loss of function*). Das ist bedauerlich, aber nicht unmittelbar gefährlich. Ein aktivierender Effekt wird wesentlich seltener auftreten und könnte zum Beispiel ein festgeklemmtes Gaspedal darstellen (*gain of function*; schon vorgekommen!): diese Situation ist wesentlich kritischer.

2. MUTATIONEN

Karzinogene

Am Beginn des 20. Jahrhunderts wurde klar, dass Stoffe aus der Umwelt in Zusammenhang mit Krebs gebracht werden können. Zum Beispiel bekamen Männer, die mit der Destillation der bi-zyklischen aromatischen Substanz 2-Naphthylamin befasst waren, gehäuft Blasenkrebs. Diese Verbindung ist also krebserzeugend, oder ein "Karzinogen".

Die Befürchtung vieler Menschen, dass karzinogene "Chemie" der wesentlichste Auslöser von malignen Neoplasien beim Menschen ist, trifft jedoch nicht zu. Eines der weltweit relevantesten Karzinogene ist ein reines Naturprodukt: **Aflatoxin B1**. Es wird vom Pilz *Aspergillus flavus* gebildet, der gute Wachstumsbedingungen vorfindet, wenn Erdnüsse, Mais, Getreide oder Pistazien warm und feucht gelagert werden, wie das in vielen tropischen und subtropischen Regionen der Welt unvermeidbar ist. Aflatoxin ist primär nicht mutagen. Nach seiner Aufnahme über den Darm gelangt es in die Leber, wo es durch das [Cytochrom P450-System](#), das Teil der Biotransformation ist, in ein hochreaktives Zwischenprodukt übergeführt wird, das sich dann an Stickstoff- oder Sauerstoffatome in Makromolekülen der Zelle bindet. Ein typisches Akzeptor-Atom in der DNA ist das N7-Atom von Guanin. Den entstehenden Komplex nennt man ein "DNA-Addukt". Wird es nicht rechtzeitig repariert, kann das Guanosin-Aflatoxin-Addukt während der folgenden Replikation Wasserstoffbrücken sowohl mit dem korrekten C als auch mit A ausbilden; die Replikationsgabel scheint aber bei einer Paarung mit C hängen-zubleiben, während sie die Paarung mit A passieren kann. Dadurch ist der Einbau von A am Gegenstrang bevorzugt. Die folgende Reparatur des Addukts führt gegenüber des fälschlich eingebauten Adenins schließlich zum Einbau eines Thymins an der Stelle des ursprünglichen Guanins. Dieser Mechanismus wird als Ursache für die in Aflatoxin-belasteten Gebieten häufig beobachtete G->T Mutation an der dritten Position des Codons 249 von p53 in hepatozellulären Karzinomen angesehen, die zum Austausch des für DNA-Bindung und Konformation wichtigen Arg249 (AGG) gegen Serin (AGT) führt. Man nimmt an, dass dieser Prozess zum häufigeren Auftreten des Leberzellkarzinoms in den Tropen beiträgt.

Beim Erhitzen proteinreicher Nahrungsmittel wird eine Vielzahl von chemischen Reaktionen ausgelöst. So entstehen beim Braten von Fleisch oder Fisch **heterozyklische aromatische Amine**, z. B. PhIP (2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5 b]pyridin), die mit der Speise aufgenommen werden. Oxidation der exozyklischen Aminogruppe von PhIP durch eine Cytochrom P450-Oxidase generiert das hochreaktive N-OH-PhIP, das wiederum mit Guanin ein DNA-Addukt bilden kann.

In unserer Gesellschaft ist die Angst vor der versteckten Belastung mit exogenen Karzinogenen sehr ausgeprägt. Dabei ist ein großer Teil der tatsächlichen Exposition nicht versteckt, sondern offensichtlich und darüber hinaus freiwillig: gemeint sind z. B. die Karzinogene im Tabakrauch und die mutagene Wirkung der UV-Strahlung.

Polyzyklische Aromate wie **Benzyren** sind Bestandteile des "Teer"-Gehalts von Zigaretten. Aus Konzentrationsgründen betrifft ihre mutagene Wirkung am stärksten die Epithelzellen der Atemwege; formal verläuft die Schädigung analog dem schon bei Aflatoxin besprochenen Mechanismus über Benzyren-Adduktbildung an Guaninen. Bei starkem Zigarettenkonsum ist die mutagene Wirkung dieser Teerinhaltsstoffe quantitativ so ausgeprägt, dass sich

Raucher über die Wirkung "versteckter" Karzinogene eigentlich keine Gedanken mehr machen müssen. Neben polyzyklischen Aromaten wurden zahlreiche weitere Karzinogene im Tabakrauch nachgewiesen, z. B. **Aldehyde**, **Nitrosamine** und **Schwermetalle**, sogar das radioaktive Uran-Radium-Zerfallsprodukt Polonium 210 (Uran ist. Nikotin hat primär Suchtmachende Wirkung; zwar gibt es abgeleitete karzinogene Rauchinhaltsstoffe wie N'-Nitrosonornikotin, doch ist dieser mutagene Effekt angesichts der übrigen Rauch-Mutagene untergeordnet.

Zigarettenrauch ist die Nummer eins unter den vermeidbaren Verursachern von Krebstodesfällen. Weltweit ist das Bronchialkarzinom die Krebsart, welche die meisten Krebstoten bei Männern und die zweitmeisten (nach Brustkrebs) bei Frauen verursacht; in Europa überholt es das Mammakarzinom zurzeit auch bei Frauen. Betrachten wir die Entwicklung der Todesfälle von den häufigsten Krebsarten im 20. Jahrhundert, wird sofort klar, dass die allermeisten Fälle von Lungenkrebs vermeidbar wären: vor der Verbreitung des Zigarettenrauchens war das Bronchialkarzinom eine seltene Erkrankung. Die Mortalität an Lungenkrebs folgte mit einer Verzögerung von etwa 20 Jahren dem Anstieg des Zigarettenkonsums, zunächst bei Männern, später bei Frauen.

Löst nicht auch Luftverschmutzung Lungenkrebs aus? Leider ja, speziell Feinstaub: PM10 (*particulate matter*) mit einem Durchmesser unter 10 µm und PM2,5 mit einem Durchmesser unter 2,5 µm. Diese Partikel entstehen durch Verbrennungsprozesse in den Motoren unserer Autos sowie durch Hausbrand und Industrie. Sie enthalten wiederum polyzyklische Aromate. Wir sollten uns sehr bemühen, sie zu reduzieren. Allerdings bleibt die Schädlichkeit immer eine Frage der Konzentration: Raucher inhalieren weit höhere Konzentrationen, sodass Rauchen eine weit höhere Zahl an Lungenkrebsfällen verursacht. Im Vergleich dazu ist die Krebsgefährdung durch Luftverschmutzung ein relativ geringes Problem.

Mutationen durch Strahlung

Die im normalen Alltag bereits ohne willentliche Sonnenexposition absorbierte **UV-Strahlung** führt zu zahlreichen DNA-Schädigungen in lichtexponierten Arealen; in erster Linie über eine durch die Strahlungsenergie ermöglichte kovalente Quervernetzung benachbarter Pyrimidin-Nukleotide (z. B. "Thymin-Dimere"). Die Intensität dieser mutagenen Aktivität wird bei *Xeroderma pigmentosum*-Patienten klar, die solche Quervernetzungen nicht reparieren können: sogar durch den äußersten praktisch möglichen Lichtschutz lässt sich die Entstehung zahlreicher maligner Tumoren der Haut, häufig sogar der vorderen Areale der Mundhöhle (!), nicht vermeiden. Es wäre daher klug, die direkte Sonnenexposition in einem vernünftigen Rahmen zu halten und den in Kauf genommenen Schaden durch Sonnenschutzmittel zu begrenzen. Die Idee des Solariums erscheint aus dieser Sicht wenig glücklich.

Ionisierende Strahlung führt zu DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen. Jeder Mensch ist einem gewissen Niveau ionisierender Strahlung ausgesetzt, das in erster Linie durch medizinische bildgebende Verfahren, geologische Verhältnisse des Wohnorts und verwendete Baumaterialien determiniert wird. Durch berufliche Umstände (medizinische Berufe, häufige Langstreckenflüge) kann die Exposition erhöht werden.

Test auf Mutagenität: der Ames-Test

Um die Mutagenität einzelner Verbindungen zu testen, entwickelte der amerikanische Forscher Bruce Ames ein Testverfahren, das eine Quantifizierung von Mutationen in einem Bakterienstamm erlaubt. Der Test misst die Frequenz, mit der Mutationen einem Bakterium ermöglichen, selbst Histidin zu synthetisieren, sodass es auf einem Histidin-freien Medium eine Kolonie bilden kann. Indem der Testsubstanz ausgesetzte Bakterien mit Kontrollbakterien verglichen werden, kann die Zahl von Mutationen ermittelt werden, die auf die Testsubstanz zurückgehen. Zur Testsubstanz kann homogenisierter Leberextrakt zugegeben werden, um die Effekte der Biotransformation einzubeziehen.

Mutationen entstehen auch ohne äußere Karzinogene

Mutationen sind nicht ausschließlich auf aus der Umwelt stammende Mutagene, Strahlen etc. zurückzuführen. Bereits bei der normalen Funktion von DNA in unbelasteten Zellen entstehen etwa 20.000 "spontane" Veränderungen pro Zelle und Tag, die sekundär zu Mutationen führen können. Zwar ist doppelsträngige DNA ein für biologische Verhältnisse außerordentlich stabiles Molekül, wesentlich stabiler als Proteine oder RNA, doch befindet sich dieses Molekül in einer chemisch sehr reaktiven Umgebung: Wärme, Sauerstoffkonzentration, wässriges salzhaltiges Milieu (vergleiche Rostbildung!) und eine Vielzahl reaktiver Gruppen umgebender Makromoleküle führen dazu, dass die DNA unter dauerndem chemischen Beschuss liegt. Daraus ergeben sich folgende häufigen Veränderungen:

Hydrolyse

Die Kombination von wässrigem Milieu und Wärme führt zum Aufbrechen einer kovalenten Bindung durch ein Wassermolekül. Nach der Lokalisation der am häufigsten hydrolysierten Bindungen ergeben sich:

Depurinierung: die DNA jeder humanen Zelle verliert pro Tag etwa 5000 Purinbasen (Adenin oder Guanin) durch Hydrolyse ihrer N-glykosidischen Bindung an Desoxy-Ribose (*abasic site*).

Deaminierung: Verliert Cytosin durch Hydrolyse seine Aminogruppe, bleibt Uracil zurück. Diese Veränderung betrifft etwa 100 Cytosin-Basen pro Zelle und Tag. Während Cytosin Basenpaarung mit Guanin eingeht, verhält sich Uracil wie Thymin und geht Basenpaarung mit Adenin ein. Da Uracil aber nicht Bestandteil der DNA ist, wird Uracil durch ein spezialisiertes Enzym (Uracil DNA Glykosylase) rasch aus der DNA entfernt und die entsprechende Stelle neu synthetisiert (*base excision repair*, BER). Erst bei Defekten dieses Reparatursystems führt eine Cytosin-Deaminierung zu einer G->A Punktmutation am Gegenstrang.

Oxidation

Die hohe Reaktivität des Sauerstoffs, besonders in der Form des Hydroxylradikals, führt zu mehr als 10.000 Basenveränderungen pro Zelle und Tag. Manche dieser Veränderungen führen zu Mutationen: die Oxidierung von Guanin zu 8-Oxo-Guanin führt zu einer Basenpaarung mit A statt mit C. Andere, wie die Oxidation von Thymin zu Thyminglykol, führen zu einer Blockade der DNA-Replikation. Während Basenoxidation bereits unter physiologischen Bedingungen auftritt, ist dieser Effekt in Geweben mit chronischer Entzündung noch wesentlich verstärkt: Makrophagen und neutrophile Granulozyten

produzieren dauernd große Mengen aktiver Sauerstoffverbindungen. Dazu kommt noch, dass unter diesen Bedingungen viele Zellen untergehen. Die verbliebenen Zellen versuchen, diese Verluste durch verstärkte Proliferation auszugleichen. Die so erhöhte Frequenz der DNA-Replikation hat zur Folge, dass oxidative DNA-Schäden häufiger durch Basenfehlinkorporation im Gegenstrang fixiert werden.

Methylierung

Die geregelte Methylierung des C5-Atoms von Cytosin in der Basenfolge CG ("CpG"-Konfiguration) ist ein wichtiger, zur Genregulation beitragender Prozess. Jedoch kommen auch unregelmäßige Übertragungen von Methylgruppen vom Universal-Methylgruppendonor S-Adenosylmethionin auf Basen vor. Häufig ist z. B. die relativ harmlose Methylierung von N7 in Guanin; die seltenere Methylierung des O6-Atoms von Guanin führt jedoch zur fälschlichen Basenpaarung mit T statt C.

Replikationsfehler

Mehr noch als bei der bloßen Erhaltung der DNA bestehen bei der Replikation Möglichkeiten für Mutationen. Eine Sonderform, bei der ein verspätetes Chromosom zur Bildung eines separaten Mikronukleus, zur Verspätung der nächsten Replikation, zur Zerschlagung des Einzelchromosoms und zur Neuzusammensetzung der Bruchstücke führt, besprechen wir später. An dieser Stelle interessieren wir uns für die Fehlinkorporation einzelner Basen. Einerseits können normale Nukleotide fehlerhaft eingebaut werden, andererseits bestehen in jeder Zelle aufgrund der Reaktionsgleichgewichte auch geringe Mengen "falscher" Nukleotide, die sich z. B. in einer Seitengruppe von den "richtigen" unterscheiden. Um die Rate der durch diese Mechanismen entstehenden Mutationen möglichst niedrig zu halten, sind mehrere Ebenen des "Korrekturlesens" eingebaut. Die erste ist die tatsächlich *proofreading* genannte Aktivität der DNA-Polymerasen. Mit Hilfe einer eingebauten 3'->5'-Exonukleaseaktivität wird ein fehlerhaft eingebautes Nukleotid sofort durch einen Rückwärtsschritt des Enzyms wieder herausgeschnitten, vor weiterpolymerisiert wird. Die nächste Korrektorebene erfolgt durch das *mismatch repair* (MMR)-System.

Mismatch repair (MMR)

Fehler können den Einbau eines falschen Nukleotids an der richtigen Stelle, aber auch den Einbau zusätzlicher (Insertionen) oder den Wegfall von Nukleotiden (Deletionen) bedeuten, welche noch kritischer sind, da diese zu Leserasterverschiebungen führen. Bei der großen Zahl an Nukleotiden, die in einer DNA-Replikation polymerisiert werden, hat auch eine niedrige Fehlerrate zahlreiche Fehlinkorporationen zur Folge. Das falsch oder zusätzlich eingebaute Nukleotid passt nicht mit seinem Gegenüber zusammen –*mismatch*— d. h., kann keine Wasserstoffbrücken mit seinem Gegenüber ausbilden. Die DNA ist an dieser Stelle in ihrer Kontinuität gestört, sie bekommt einen "Buckel". Eine solche Diskontinuität wäre mit molekularen Mitteln nicht schwer zu erkennen; das viel schwierigere Problem besteht darin, zu erkennen, welches der beiden Nukleotide das Richtige und welches das Falsche ist. Die *mismatch repair*-Systeme in verschiedenen Organismen haben die Fähigkeit, alten und neu synthetisierten Strang voneinander zu unterscheiden. Es ist noch nicht sicher, auf welchem Weg das beim Menschen geschieht; bei Bakterien nützt das System die Tatsache aus, dass der alte Strang an manchen Stellen methyliert ist.

Das *mismatch repair*-System wurde zunächst in der einfacheren bakteriellen Form aufgeklärt. In *E. coli* besteht der Kern des Systems aus drei Proteinen: *mutS*, *mutL* und *mutH*. *mutS* ist das Protein, das die Diskontinuität in der DNA erkennt; ein *mutS*-Dimer bindet an diese Stelle und bewegt sich dann Energie-abhängig so in beide Richtungen vom Buckel weg, dass eine DNA-Schleife entsteht, die in ihrem Scheitelpunkt den *mismatch* trägt. Wenn eines der *mutS*-Proteine auf eine methylierte Base trifft, treten jeweils *mutL* und *mutH*-Dimere hinzu, damit im so entstandenen Komplex die Endonuklease *mutH* den der methylierten Base gegenüber liegenden DNA-Strang schneiden kann. Damit ist das Strang-Erkennungsproblem gelöst: in der Umgebung eines *mismatch* wurde jener Strang durch einen Schnitt markiert, der nicht methyliert ist. Mit Hilfe anderer Proteine wird in der Folge der nicht-methylierte Strang zwischen *mismatch* und Schnitt herausgeschnitten und neu synthetisiert.

Das menschliche *mismatch repair*-System besteht aus den selben Grundbausteinen, doch gibt es jeweils mehrere Homologe zu *mutS* und *mutL*, während das Korrelat zur Endonuklease *mutH* bisher nicht identifiziert werden konnte. Die *mutS*-Homologe tragen die Bezeichnung MSH2 bis-6 (MSH steht für *mutS*-Homolog; ein MSH-1 wird postuliert, wurde aber bisher nur in Hefe gefunden). Die vier identifizierten *mutL*-Homologe tragen die Bezeichnungen MLH-1, MLH-2, PMS-1, PMS-2 (MLH steht für *mutL*-Homolog, PMS für *postmeiotic segregation*, da diese Proteine auch eine Funktion beim *crossing over* der Meiose haben). Während in *E. coli* *mutS* und *mutL* als Homodimere auftreten, funktionieren die menschlichen Homologe als Heterodimere. Ein typischer *mismatch repair*-Komplex wäre z. B. MSH2/MSH6 mit MLH1/PMS1 plus unbekannter Endonuklease. Unklar ist auch der Mechanismus der Strangunterscheidung, der sich beim Menschen nicht auf Methylierung stützt.

Die Summe der Überwachungs- und Korrekturmaßnahmen beseitigt den Großteil der primär gesetzten DNA-Veränderungen, so dass es zu keinen dauerhaften Mutationen kommt. Die molekularen Maschinerien für DNA-Replikation und -Reparatur arbeiten mit großer Präzision, können aber nicht perfekt sein. Nach allen Sicherheitsmechanismen bleibt eine geringe Mutationsrate von 10^{-6} Mutationen pro Gen und Zellteilung. Obwohl diese Rate gering ist, reicht sie aus, viele Mutationen zu verursachen, da der Mensch im Lauf seines Lebens etwa 10^{16} Zellteilungen durchmacht: kumulativ, also auf alle Zellen bezogen, die der Mensch im Lauf seines Lebens besitzt, bedeutet das 10^{10} Mutationen in jedem einzelnen unserer Gene.

Unsere Zellen stehen in einem anhaltenden Nieselregen von Mutationen

Die allermeisten DNA-Schäden oder Einbaufehler werden durch unsere DNA-Reparatursysteme so rasch behoben, dass keine Mutationen entstehen. Fassen wir also zusammen: Während unsere Zellen einer Flut von DNA-Schäden durch exogene und endogene Ursachen ausgesetzt sind, reduzieren unsere Reparatursysteme diese zu einem leichten Nieselregen. Da die verbleibenden Mutationen in der Regel verschiedene Zellen treffen, stellt dieser Regen kein Problem dar, solange nicht zu viele Zellteilungen in Serie hintereinander geschaltet werden. Die Begrenzung der Zahl an Zellteilungen, die eine somatische Zelle durchmachen kann —z. B. durch Telomer-"Verbrauch"— stellt daher einen wichtigen Schutz vor der Akkumulation zu vieler Mutationen dar. Die typische Zelle macht auf ihrem Entwicklungsweg von der Stammzelle bis zur terminal differenzierten Zelle nur etwa 10 bis 15 Zellteilungen durch.

Beitrag von Umweltfaktoren zur Krebsentstehung

Eine für das Verhalten des Individuums bedeutsame Frage ist, wie groß der relative Anteil dieser zwei Mutationsursachen ist: "endogen" versus "durch Umweltkarzinogene ausgelöst". Diese Frage ist leider nicht exakt beantwortbar, und es existieren sehr verschiedene Schätzungen darüber. Eine Gruppe von Epidemiologen (Trichopoulos et al., Scientific American 275 (Sept.): 50-57, 1996) schätzt, dass nur ein Viertel der malignen Neoplasien endogen bedingt ist, während 75% durch exogene Ursachen beigetragen werden, angeführt durch Tabakkonsum (30%) und falsche Ernährungsgewohnheiten (30%). Der herausragende Effekt des Rauchens wird sehr klar, wenn man die Entwicklung der Todesfälle durch maligne Neoplasien seit 1930 betrachtet. Der ungeheure Anstieg von Todesfällen durch Lungen- und Bronchuskarzinom, zunächst bei Männern, dann, mit 30-jähriger Verschiebung bei Frauen, spiegelt den Verlauf der Verbreitung des Zigarettenkonsums wieder.

Eine einzelne Mutation löst noch keinen Krebs aus

Für die meisten malignen Tumoren steigt die Inzidenz mit dem Lebensalter. Trägt man z. B. die Inzidenz des Kolonkarzinoms gegen das Lebensalter auf, erhält man eine typische, exponentiell ansteigende Kurve. Die Form dieser Kurve ist nur durch das Zusammentreffen mehrerer unabhängiger seltener Ereignisse in derselben Zelle erklärbar. So lässt sich beispielsweise berechnen, dass zur Entstehung eines Kolonkarzinoms sechs unabhängige Ereignisse zusammentreffen müssen. Ein solches Einzelereignis kann die Aktivierung eines Protoonkogens oder die Inaktivierung eines Antionkogens sein. Das Zusammentreffen von sechs seltenen, unabhängigen Ereignissen in derselben Zelle ist am Beginn des Lebens sehr unwahrscheinlich, wird aber mit zunehmendem Alter immer wahrscheinlicher. Die Grund für diese Konstellation liegt darin, dass Proliferation und Verhalten unserer Zellen durch mehrere Ebenen von Kontroll- und Sicherheitsmechanismen gesteuert werden, von denen jede einzeln durch genetische oder epigenetische Ereignisse verändert werden muss.

Zu dieser Regel gibt es Ausnahmen. So tritt der Netzhauttumor Retinoblastom beinahe ausschließlich bei kleinen Kindern auf. Einige der erwähnten Kontrollmechanismen sind in Retinazellen offenbar nicht "eingeschaltet". Der Verlust des Antionkogens Rb in der Gegenwart von Wachstumssignalen in Zusammenhang mit dem Wachstum des Augapfels genügt, um diesen malignen Tumor auszulösen.

Das *Multi-Step-Modell*: Mutation und Selektion

Das gegenwärtig vorherrschende Denkmodell für die Entwicklung der meisten malignen Tumoren wurde von Vogelstein und Kinzler am Beispiel des Kolonkarzinoms entwickelt. Es sieht Krebsentstehung als einen sich über viele Jahre hinziehenden Mutations- und Selektionsprozess. Ein erstes Ereignis führt beispielsweise zur Inaktivierung des Antionkogens APC in einer Kolonstammzelle. Der Phänotyp der betroffenen Zelle ändert sich nur minimal: Die Zelle hat eine geringfügig erhöhte Tendenz, zu proliferieren. Möglicherweise gibt es auch ein Problem mit der asymmetrischen Stammzellteilung, sodass mehr Stammzelltöchter entstehen (siehe Abschnitt "Kolonkarzinom"). So bildet sich, beispielsweise über den Zeitraum von zwei Jahren, eine kleine "Epithelinsel" aus

Nachkommen dieser ersten Zelle, denen natürlich allen das APC fehlt. Mutationen treten im Darmepithel mit einer charakteristischen Frequenz auf. Je größer die APC-lose Zellinsel wird, desto wahrscheinlicher wird es, dass eine dieser weiteren Mutationen eine APC-lose Zelle trifft. Dieses zweite relevante Mutationsereignis könnte beispielsweise die Aktivierung von *ras* durch eine Punktmutation sein. Der entstehende Zellklon hat damit einen weiteren Selektionsvorteil: die verstärkte Proliferationstendenz bewirkt, dass aus den Nachkommen dieser Zelle langsam eine Insel von Zellen mit zwei genetischen Problemen innerhalb der ursprünglichen Insel mit einem Problem entsteht. Die Zellen sind immer noch gut differenziert, doch erhebt sich nun langsam ein Adenom aus der Ebene des Epithels. Weitere eineinhalb Jahre später geht in einer Tochterzelle dieses Klons die Funktion eines weiteren Tumorsuppressorgens verloren, z. B. p53, und so weiter...

Mit jedem Mutationsereignis vergrößert sich der Selektionsvorteil und verkleinert sich der Differenzierungsgrad des driftenden Zellklons. Nach 10 Jahren entsteht durch ein sechstes unabhängiges Mutationsereignis auf diese Weise die erste maligne Tumorzelle.

Die "Tumor-Evolution" bleibt damit nicht stehen: im Lauf der weiteren Entwicklung sammelt der Tumor noch weitere Mutationsereignisse, die z. B. für Metastasierungsorte oder – Geschwindigkeit oder für das Verhalten des Tumors unter Therapie von Bedeutung sein können. Dabei spaltet sich die Neoplasie in genetisch unterschiedliche Subklone auf, die sich auch biologisch oft unterschiedlich verhalten.

Neoplasien desselben Grundtyps können sich auf Grund ihrer genetischen Heterogenität biologisch unterschiedlich verhalten.

In der Klinik beobachtet man durchaus unterschiedliche Verläufe der Krankengeschichten von Patienten mit Tumoren desselben Grundtyps. Während ein Patient mit Kolonkarzinom auf die Therapie gut anspricht und danach jahrelang beschwerdefrei ist, bekommt der nächste rasch ein Rezidiv und verstirbt wenige Monate später. Was zunächst unverständlich wirkt, wird durch die unterschiedliche Ausstattung der Tumorzellen der beiden Patienten mit "genetischen Problemen" begreiflich.

Eine gegenwärtige Stoßrichtung der Therapieentwicklung ist, auf Basis einer Bestimmung des individuellen "Tumormutationsprofils" eine rational begründete, individuell sinnvolle Therapie zu verabreichen (*personalized medicine*).

Mutationen sind nicht alles: das Initiator-Promotor-Konzept

Karzinogene sind nicht ausschließlich Mutagene. Dies wurde schon früh klar, als man erkannte, dass es zwei Gruppen von Neoplasie-fördernden Substanzen gibt, die auf Grund ihrer Wirkung als "Tumorinitiatoren" und "Tumorpromotoren" bezeichnet wurden. Behandelte man beispielsweise die Haut einer Maus zunächst mit einer Substanz aus der Initiatorgruppe, dann wiederholt mit einer aus der Promotorgruppe, entwickelte sich ein maligner Tumor. In der umgekehrten Reihenfolge –zuerst Promotor, dann Initiator— entwickelte sich keiner.

Die Erklärung für dieses Verhalten liegt darin, dass nur der Tumorinitiator mutagen wirkt. Ein Tumorpromotor dagegen wirkt proliferationsfördernd, ohne selbst Mutationen zu verursachen. Wirkt nur der Tumorpromotor ein, ohne dass vorher Mutationen gesetzt wurden, bewirkt das keine Progression zur Malignität. Wurden jedoch vorher durch den Tumorinitiator Mutationen ausgelöst, werden die betroffenen Zellen mitsamt deren genetischen Defekten durch den Proliferationsreiz vervielfacht. Mit dieser Vervielfachung steigt die Wahrscheinlichkeit, dass weitere Mutationen auf Zellen treffen, die bereits mit einigen Defekten belastet sind. Tumorpromotoren vergrößern also die Basis an Zellen mit präexistenten Problemen, ohne selbst mutagen zu sein.

Beispiele für Tumorpromotorwirkung wären etwa Östrogene in bezug auf das Mammakarzinom oder der von einem Magengeschwür ausgehende Proliferationsreiz für die Entstehung eines Magenkarzinoms.

3. ANTIKNOGENE = TUMORSUPPRESSORGENE

3. 1. Zellzyklus-Regulation

Zellzyklusphasen

Die Beschreibung von Phasen des Zellzyklus konzentrierte sich in der lichtmikroskopischen Ära auf die Mitose: nur dann war etwas Besonderes zu sehen: Entstehung, Anordnung und Auseinanderwandern der Chromosomen. Der Rest wurde einfach "Interphase" genannt: das langweilige Intervall zwischen zwei Mitosen.

Später wurde klar, dass in einem Abschnitt der Interphase die Replikation der DNA abläuft. Diese Zellzyklusphase wurde mit "S" für Synthese bezeichnet.

Damit kommt man zu folgendem einfachen Modell für den Zellzyklus:

- M- Mitose
- G1- steht, je nach Temperament, für *gap* oder *growth*
- S- DNA-Replikation (Synthese)
- G2- nach Abschluss der DNA-Synthese bis zur nächsten Mitose

Cdk/Cyclin-Komplexe

Die Entscheidung, den nächsten Schritt im Zellteilungszyklus einzuleiten, bedeutet jeweils die Aktivierung eines "Hauptschalters" in der Form eines Cdk/Cyclin-Komplexes.

Die einfachste Form dieses Zellzykluskontrollsystems findet sich in der Hefe, die über eine einzige, ständig vorhandene Kinase verfügt. Diese ist inaktiv, bis ein weiteres Protein, ein sogenanntes Cyclin, exprimiert wird und an sie bindet: daher der Name *Cyclin-dependent kinase*, abgekürzt Cdk. Die Cdk wird durch unterschiedliche Cycline aktiviert: ein G1/S-Cyclin wird exprimiert, wenn die Zelle in die S-Phase eintreten soll; ein S-Cyclin, um die DNA-Synthese durchzuführen; ein mitotisches Cyclin trägt zum Eintritt in die eigentliche

Teilungsphase bei. Während eines dieser Cycline vorhanden ist, ist der Cdk/Cyclin-Komplex aktiv; wenn der dadurch eingeleitete Schritt im Zellzyklus absolviert ist, wird das Cyclin durch Proteolyse rasch wieder abgebaut und die Kinase dadurch inaktiviert. Die verschiedenen Cdk/Cyclin-Komplexe haben unterschiedliche Substrate (Zielproteine, die durch den Komplex phosphoryliert werden).

Der menschliche Zellzyklus

Die entsprechenden menschlichen Hauptschalter zur Koordinierung des Zellzyklus funktionieren nach dem gleichen Prinzip. Der Hauptunterschied zum Hefesystem ist, dass es mehrere Cdks gibt. Die Cdks werden durchnummeriert; die Cycline mit Großbuchstaben bezeichnet. Folgende Cdk/Cyclin-Komplexe haben Bedeutung für das Fortschreiten in den Phasen des menschlichen Zellzyklus:

G1-Phase:	Cdk6/D
	Cdk4/D –Komplex phosphoryliert pRb
Übergang G1-S:	Cdk2/E –Komplex phosphoryliert pRb
S-Phase:	Cdk2/A
Übergang G2-M:	Cdk1/A
M –Phase:	Cdk1/B

Ebenen der Cdk-Regulation, Checkpoints

Der Hauptschalter Cdk wird auf mehreren Ebenen reguliert. Zusätzlich zur Bedingung für ein Cyclin erfolgt Regulation durch hemmende und aktivierende Phosphorylierungen, sowie durch Proteinregulatoren wie p21CIP1/WAF1, p27Kip1 oder p16 INK4A . Eine Cdk stellt also ein komplexes Schaltelement dar, das erst aktiv wird, wenn mehrere unabhängige Bedingungen erfüllt sind. Mit Hilfe dieser Schaltelemente kann der Zellzyklus an sogenannten Checkpoints angehalten werden, falls noch nicht alle Bedingungen der Checkliste für den nächsten Schritt erfüllt sind. Dabei spielen Faktoren wie Masse der Zelle, Versorgungssituation und Energieniveau eine Rolle, besonders aber auch potentielle Schäden der DNA sowie die vollständige Anheftung aller Chromatiden an der Teilungsspindel während der Mitosephase. Die letzten beiden Punkte führten zur Benennung folgender Checkpoints:

- *G1 DNA damage checkpoint* (Arrest bei DNA-Schäden)
- *DNA replication checkpoint* (Arrest bei hängengebliebenen Replikationsgabeln)
- *G2/M DNA damage checkpoint* (Arrest bei DNA-Schäden nach der Replikation)
- *Spindle checkpoint* (Arrest, bis alle Chromatiden angeheftet und unter Spannung sind)

Durch Anhalten des Zellzyklus in diesen Situationen werden größere Probleme, wie die Replikation geschädigter DNA, die Aufteilung noch unvollständig replizierter DNA oder die Fehlverteilung von Chromatiden, vermieden. Es entsteht Gelegenheit zur Korrektur: DNA-Schäden werden repariert, die Replikation wird abgeschlossen, die letzten Chromatiden werden korrekt angeheftet. Falls ein Problem über längere Zeit nicht gelöst werden kann, wird über den Checkpoint-Mechanismus häufig Apoptose der betroffenen Zelle ausgelöst-- das schützt den Gesamtorganismus vor Zellen mit defektem Genom.

Für jeden Checkpoint ist eine Reihe von Proteinen notwendig. Sind solche Checkpoint-Proteine selbst von Mutationen betroffen, kann der Zellzyklus im Fall eines Problems nicht mehr angehalten werden. Die trotz Problem fortschreitende DNA-Replikation oder Mitose führt zu weiteren Mutationen oder Aneuploidien.

Wir werden im Abschnitt über p53 den *G1 DNA damage checkpoint* näher betrachten.

3. 2. RETINOBLASTOMA-PROTEIN (pRb)

Ein Substrat der Cdk/Cyclin-Komplexe, die in der G1-Phase aktiv sind, ist das Retinoblastoma-Protein (pRb), das seinen Namen vom Netzhauttumor Retinoblastom erhalten hat. Solange pRb nicht phosphoryliert ist, maskiert es den Transkriptionsfaktor E2F, sodass dieser seine Zielgene nicht anschalten kann. Mehrere äußere und innere Signale, die für die Einleitung eines Zellverdoppelungszyklus sprechen, werden die entsprechenden Cycline exprimiert, Phosphorylierungen adjustiert und Proteinhemmer abgebaut. Damit werden die Cdk/Cyclin-Komplexe aktiv: pRb wird an vielen Stellen phosphoryliert. Durch einen letzten Phosphorylierungsschub durch den Cdk2/E-Komplex verändert sich die pRb-Struktur so, dass es von E2F abfällt. E2F aktiviert nun seine Zielgene:

- E2F selbst als kurzfristige positive Rückkoppelung
- Cyclin E (Verstärkung der positiven Rückkoppelung)
- Cdk2 (Verstärkung der positiven Rückkoppelung)
- c-Myc, c-Myb (Transkriptionsfaktoren für weitere Genpaletten)
- Cyclin A (Cdk2/A nötig zum Abfeuern der DNA-Replikationsgabeln)
- DNA-Polymerase α
- PCNA (Gleitring, der DNA-Polymerase an DNA hält)
- Thymidylatsynthase, Thymidinkinase (für Thymidin-Neusynthese)
- Dihydrofolatreductase (für Purin-, Thymidin-Neusynthese)
- Cdk1 (notwendig für Mitose)
- Apaf1 (für Apoptose-Notausstieg bei Problemen)
- Caspase3 (für Apoptose-Notausstieg bei Problemen)
- p14ARF (Sensor für unphysiologische Zellzyklusaktivierung, siehe p53!)

Die durch diese Zielgene kodierten Proteine haben wichtige Funktionen für S- und M-Phase, wie z. B. die Synthese von Desoxynucleotidtriphosphaten (dNTPs). Die Aktivierung dieser Zielgene trägt daher dazu bei, die Zelle von der G1-Phase in den Zellteilungszyklus zu treiben; allerdings werden auch für die Apoptose benötigte Faktoren in Form inaktiver Vorstufen bereitgestellt für den Fall, dass während der kritischen Zellteilung gravierende Probleme auftreten. Das muss vor der Kondensation der Chromosomen geschehen, da die Genexpression während der Mitose weitgehend stillgelegt ist.

Rb als Musterbeispiel eines Tumorsuppressorgens

Rb stellt das paradigmatische Tumorsuppressorgen oder, synonym, Antionkogen dar. Retinoblastoma-Protein wirkt wie eine "Bremse am Zellzyklus", indem es in Abwesenheit

von Wachstumssignalen E2F maskiert und die Zelle so in der G1-Phase festhält. Wachstumssignale lösen diese Bremse über die Expression von D- und E-Cyclinen und die dadurch ausgelöste Phosphorylierung und Konformationsänderung von pRb. Viele Antionkogene können als Bremsen am Zellzyklus verstanden werden.

Mutationen im Rb-Gen führen häufig zu einem Verlust der Bremsfunktion

Die pRb-Bremse kann physiologisch nur durch Wachstumssignale gelöst werden. Was aber passiert, wenn das Rb-Gen durch Mutationen betroffen wird? Viele Mutationen werden die Folge haben, dass pRb nicht mehr funktioniert. Deletionen, vorzeitige Translationsstops, Leserasterverschiebungen und viele Punktmutationen führen zu einem Verlust der Fähigkeit von pRb, E2F zu maskieren und damit zu einem Verlust der Bremsfunktion. Damit entsteht wieder die Situation, dass eine Mutation das Vorhandensein von Wachstumssignalen "vortäuscht".

Tumorsuppressoren sind im Regelfall Zweikreisbremssysteme: erst wenn beide Allele ausfallen, macht sich der Ausfall bemerkbar

Defekte führen generell meist dazu, dass etwas nicht funktioniert (tiefe Weisheit). Auf Mutationen übertragen bedeutet das, dass die meisten Mutationen *loss-of-function*-Mutationen sind. Durch eine solche Mutation geht also die Funktion eines Allels verloren. Im menschlichen diploid organisierten Genom gibt es jedoch für jedes Gen zwei Allele, und die Bremsfunktion des am zweiten Allel kodierten pRb ist ausreichend, um die Zelle in G1 zu halten. Der Ausfall der Bremsfunktion ist also, typisch für *loss-of-function* Mutationen, rezessiv. Erst wenn in derselben Zelle auch das zweite Allel defekt wird, drängt die Zelle über E2F-Wirkung in den Zellteilungszyklus.

Dieses Prinzip wurde durch Alfred G. Knudson erkannt, als er sich mit dem Augentumor Retinoblastom beschäftigte. Dieser von der Netzhaut ausgehende Tumor ist in mehrfacher Hinsicht ungewöhnlich: er betrifft beinahe ausschließlich Kleinkinder, tritt häufig beidseitig und manchmal familiär gehäuft auf. Als er die Krankheitsgeschichten der betroffenen Kinder retrospektiv aufarbeitete, ordnete Knudson sie in zwei Gruppen ein:

1. Die Kinder mit mehr als einem Primärtumor bildeten die erste Gruppe (im Schnitt drei Primärtumoren pro Kind und meist beidseitig). Diese Kinder waren bei der Erstdiagnose jünger (Schnitt 14 Monate) und entwickelten später im Leben häufig Sekundärtumoren (z. B. Osteosarkome). In diese Gruppe fielen auch die Fälle mit familiärer Häufung.
2. Die zweite Gruppe war durch einen einzelnen Primärtumor charakterisiert, war bei der Diagnose älter (30 Monate) und zeigte weder eine Tendenz zu Sekundärtumoren noch zu familiärer Häufung.

Diese Daten interpretierte Knudson so: die erste Gruppe beginnt ihr Leben im Stadium einer befruchteten Eizelle bereits mit einem defekten, damals noch hypothetischen, "Retinoblastom"-Allel. Alle somatischen Zellen des sich entwickelnden Kindes enthalten dieses Allel. Im dauernden Mutationenregen kommt es mit der Zeit in einzelnen Zellen dazu, dass auch das zweite, bis dahin funktionelle Allel getroffen wird. Diese Zellen werden zum Ausgangspunkt eines Primärtumors; im Schnitt geschieht das dreimal pro betroffenem Kind. Wieso gerade in der Retina und nicht in anderen Geweben? Offensichtlich ist es so, dass in der Retina viele der Kontroll- und Ausgleichssysteme, die in Zellen unseres Körpers

normalerweise agieren, inaktiv sind. Für die Entwicklung dieses spezifischen malignen Tumors genügt es anscheinend, wenn in einer wachsenden Retina die Funktion von pRb verloren geht. Wie sieht es in anderen Geweben aus? Dort sind die Sicherungsmechanismen offensichtlich besser ausgeprägt, sodass erst zusätzliche Mutationen in anderen Loci zur Bildung eines Malignoms führen. Das erklärt, warum Sekundärtumoren erst später auftreten. Wenn diese Kinder mit einem defekten Allel starten, warum sind dann, abgesehen von den gelegentlichen familiären Fällen, die Eltern sonst nicht betroffen? In den meisten Fällen entsteht die Mutation offensichtlich erst in den Keimzellen der Eltern; die Eltern selbst sind gesund. In der zweiten Gruppe von Kindern wird das Retinoblastom durch zwei sequentielle Mutationsereignisse in derselben Zelllinie ausgelöst. Das benötigt mehr Zeit, sodass die Kinder bei Diagnose älter sind. Nach Entfernung des Retinoblastoms besteht kein erhöhtes Risiko für andere Tumoren. Gemeinsam ist den beiden Gruppen, dass die beiden Allele des Rb-Gens durch zwei unabhängige Mutationsereignisse inaktiviert wurden. Durch seine *two-hit*-Hypothese definierte Knudson das Konzept des Tumorsuppressors: ein Gen, das zur Tumorentwicklung beiträgt, wenn beide Allele inaktiviert werden.

In dieser Hinsicht sind die Bremssysteme der Zelle analog denen unserer Autos. Beim Tritt auf das Bremspedal komprimiert man die Bremsflüssigkeit im Hauptbremszylinder. Dieser Druck pflanzt sich hydraulisch über die Bremsleitungen fort und bewegt so die Kolben der Radbremszylinder, die das Anpressen der Bremsbeläge an die Bremscheiben zur Folge haben. Das hydraulische System ist jedoch anfällig für Lecks: Bremsflüssigkeit tritt aus, Luftblasen entstehen. Sind Luftblasen im System, fällt das Bremspedal bei einem Bremsversuch widerstandslos durch, da sich die Luftblasen leicht komprimieren lassen: die Kraft pflanzt sich nicht mehr auf die Bremsen fort. Da dies zu häufigen Unfällen führte, entwickelte die Autoindustrie das Zweikreisbremssystem: das hydraulische System wird einfach in doppelter Ausführung eingebaut. Wird eines der Systeme undicht, kann man mit dem anderen immer noch bremsen.

Da der Phänotyp der Proliferationstendenz erst bei Ausfall beider Allele auftritt, hat man Tumorsuppressorgene (Antionkogene) auch als "rezessive Onkogene" bezeichnet. Viele Tumorsuppressorgene wurden, lange vor der Sequenzierung des menschlichen Genoms, durch ein Phänomen namens "Verlust der Heterozygotie" (*loss of heterozygosity*) identifiziert. Wird das erste Allel durch ein Mutationsereignis inaktiviert, ist die Zelle für den entsprechenden Locus heterozygot. Bei Kindern aus der ersten Retinoblastomgruppe sind alle somatischen Zellen heterozygot. Diagnostisch würde man zwei unterschiedliche Allele "sehen", auch wenn man nicht weiß, welches das "korrekte" ist. In Tumoren stellte man oft den Verlust des zweiten, gesunden Allels fest. Das kann über mehrere Wege geschehen: über eine große Deletion, die das gesamte zweite Allel eliminiert, über Genkonversion (die "Reparatur" des gesunden Gens nach dem Muster des defekten), über somatische uniparentale Disomie (Verlust des gesunden Chromosoms kompensiert durch Verdoppelung des anderen). Die üblichen diagnostischen Verfahren, wie PCR gefolgt von Sequenzierung, können diese Möglichkeiten nicht unterscheiden: sie "sehen" einfach nur einen Typ, egal, ob es sich um ein einzelnes Allel oder um zwei identische Allele handelt. Das ist der technische Hintergrund des seltsamen Ausdrucks "Verlust der Heterozygotie".

Epigenetische Inaktivierung von Tumorsuppressoren

Jede individuelle Zelle exprimiert nur einen kleinen Ausschnitt des menschlichen Genoms, das etwa 23.000 proteinkodierende Gene umfasst. In jedem Gewebe wird die überwiegende

Mehrheit von Genen durch epigenetische Modifikationen, die zur Heterochromatinbildung führen, permanent inaktiviert. Dieser Prozess beginnt durch CpG-Methylierung, die Methylierung jener Cytosine, die in der DNA unmittelbar durch Guanin gefolgt werden (mit demselben Muster am Gegenstrang). Dieser DNA-Methylierung folgt eine Histon-Deacetylierung und das dichte Verpacken des betroffenen Genlocus unter Zuhilfenahme zusätzlicher Proteine. Manchmal geht dieser Prozess "daneben" und schließt Gene, die eigentlich aktiv hätten bleiben sollen. Die für diese Art von Fehler verantwortlichen Umstände verstehen wir noch nicht ausreichend, doch stellen wir fest, dass bestimmte Tumorsuppressoren besonders häufig betroffen sind. Dazu gehören Cdk/Cyclin-Komplex-Inhibitoren p27 Kip1, p16 INK4a und p15 INK4b (siehe unten), Mammakarzinom-Tumorsuppressor BRCA1 und die Komponente des *mismatch repair*-Systems MLH1. Die epigenetische Inaktivierung des Tumorsuppressors wird von Zellgeneration zu Zellgeneration wie eine genetische Eigenschaft weitergegeben. Zwar wird der Locus zur DNA-Replikation geöffnet, doch wird der neusynthetisierte Strang rasch wieder durch *DNA maintenance methylases* modifiziert und der Locus wieder weggesperrt.

Funktionell verwandte Antionkogene: Inhibitoren der Cdk/Cyclin-Komplexe

Da Cdk/Cyclin-Komplexe zu einem Fortschreiten im Zellzyklus führen, wirken Hemmer dieser Komplexe als Bremsen am Zellzyklus und damit als Antionkogene. Zwei Gruppen von Inhibitoren wirken mechanistisch unterschiedlich:

1. Gruppe: bindet an Cdk/Cyclin-Komplexe; Cdk2-Komplexe werden gehemmt:

- p21 CIP1/WAF1
- p27 Kip1
- p57 Kip2

2. Gruppe: bindet an Cdk4 und Cdk6 und verhindert deren Interaktion mit Cyclin D:

- p16 INK4a
- p15 INK4b
- p18 INK4c
- p19 INK4d

3. 3. DER ZENTRALE TUMORSUPPRESSOR p53

Die zentrale Bedeutung von p53 für die Tumorentstehung ergibt sich daraus, dass es nach gegenwärtigem Wissen das am häufigsten mutierte Gen in malignen Tumoren ist.

Mäuse, die kein p53 besitzen (sogenannte *p53-knockouts*) kommen als normale, lebensfähige Mäuse zur Welt. Das bedeutet, dass p53 nicht für die Entwicklung einer normalen Maus notwendig ist. Allerdings bekommen diese Mäuse später häufig maligne Neoplasien.

Man kann p53 mit der Feuerwehr vergleichen: schafft man diese heute ab, bedeutet das nicht, dass morgen die Katastrophe eintritt. Es ist allerdings so gut wie sicher, dass früher oder später eine solche eintritt. P53 ist ein Transkriptionsfaktor, der der Zelle ermöglicht, sinnvoll auf bestimmte Schädigungen zu reagieren, um negative Folgen zu minimieren.

Struktur und Abbau von p53

p53 hat drei Domänen: eine N-terminale Abbau/Aktivierungsdomäne, eine mittlere DNA-Bindungsdomäne und eine C-terminale Tetramerisierungsdomäne. p53 wird in praktisch allen Zellen dauernd exprimiert. Solange in der Zelle kein Problem auftritt, wird p53 postwendend über das Ubiquitin-Proteasom-System wieder abgebaut. In gesunden Zellen ist der p53-Spiegel daher sehr niedrig.

Im Ubiquitin-System arbeiten drei Typen von "Enzymen" zusammen: E1, E2 und E3. E1 ist das Ubiquitin-aktivierende Enzym: es bindet das kleine, in allen Zellen exprimierte Protein Ubiquitin unter ATP-Verbrauch an eine -SH-Gruppe. Dann gibt es das aktivierte Ubiquitin an ein E2, ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym, weiter. Das E2 bindet an eines der zahlreichen E3-Proteine. E3-Proteine werden meist als "Ubiquitin-Ligasen" bezeichnet, was nicht ganz korrekt ist, da sie selbst keine Enzymaktivität besitzen; erst der Komplex aus E2 und E3 ermöglicht die Übertragung des Ubiquitins auf ein Substratmolekül. Die E3-Moleküle stellen in der Regel den Kontakt zu einer "schaltbaren" Domäne des Substratmoleküls her. Im Fall von p53 ist dies die N-terminale Domäne, solange sie nicht phosphoryliert ist.

Das für p53 zuständige E3-Protein heißt Mdm2 (*Mouse double minute 2*, ein historisch bedingter Name, der häufig durch Hdm2 -*Human double minute*- ersetzt wird, mit der Begründung, der Mensch könne kein Mausgen haben). Solange die N-terminale Abbau/Aktivierungs-Domäne nicht phosphoryliert ist, kann Mdm2 sie sehr effizient binden und p53 mit Hilfe seines E2-Partners mehrfach ubiquitinieren. Polyubiquitinierung ist das Signal für den Abbau im Proteasom. Phosphorylierung der N-terminalen Domäne führt dazu, dass p53 durch Mdm2 viel schlechter gebunden und damit viel langsamer abgebaut wird.

Auffällig ist, dass unter den in Karzinomen gefundenen p53-Mutanten Punktmutationen in sehr wenigen Kodons der DNA-Bindungsdomäne überwiegen. Das spricht dafür, dass die dort kodierten Aminosäuren, meist Arginine (z. B. Arg248, Arg249, Arg273), von besonderer funktioneller Bedeutung sind bzw. dass das Austauschen dieser Aminosäuren besonders malignitätsfördernd wirkt.

Die Röntgenstrukturanalyse der DNA-Bindungsdomäne zeigt, dass diese Aminosäuren entweder direkten Kontakt zur DNA herstellen oder zumindest in unmittelbarer Nähe der DNA-Interaktionsoberfläche liegen. Der Austausch einer solchen Aminosäure führt dazu, dass das p53-Molekül schlechter oder nicht mehr an DNA binden und damit schlechter oder nicht mehr als Transkriptionsfaktor wirken kann.

Aktivierung von p53

Verschiedene Stress-Situationen der Zelle lösen die Aktivierung von p53 aus. Dazu gehören DNA-Schäden, Sauerstoffmangel und unphysiologische Aktivierungsformen des Zellzyklus.

Betrachten wir als Musterbeispiel einen DNA-Doppelstrangbruch. Der Bruch hat eine Änderung der Chromatinstruktur in der unmittelbaren Umgebung zur Folge. So wird das normale Histon H2A durch das spezialisierte H2AX ersetzt, und Dimere eines als "Ku" bezeichneten Proteins binden direkt an die durch den Bruch entstandenen DNA-Enden. Diese Änderungen führen zur Rekrutierung mehrerer Proteinkinasen, die p53, H2AX und weitere

Proteine phosphorylieren: DNA-abhängige Proteinkinase, ATM, sowie die *Checkpoint*-Kinase Chk2.

[ATM steht für *Ataxia Teleangiectasia Mutated*. Ein Defekt im Gen für diese Kinase führt zu einer Krankheit, die extreme Strahlensensitivität mit einer Prädisposition für lymphoide Malignome und Defekten in zellulärer und humoraler Immunität kombiniert.]

Phosphorylierung von p53 hat zwei Effekte:

- Störung der Bindung an seine E3-Ubiquitinligase Mdm2. Da das dauernd exprimierte p53 nun nicht mehr so effizient abgebaut wird (Steigerung der Halbwertszeit) steigt der p53-Spiegel in der Zelle dadurch stark an.
- Umschaltung der N-terminalen Domäne in eine Transkriptions-Aktivierungsdomäne. Die negativ geladenen Phosphorsäurereste erleichtern die Interaktion des Transkriptionsfaktors mit der RNA-Polymerase.

Zielgene von p53

Von der großen Zahl von p53-induzierten Genen sollen hier nur wenige angeführt werden:

- Mdm2: Es wirkt zunächst eigenartig, dass p53 seine eigene E3-Ubiquitinligase induziert. Das Ziel der p53-Aktivierung ist jedoch, ein Zellproblem zu beheben. Sobald es behoben ist, muss p53 wieder abgebaut werden. Daher ist es sinnvoll, Mdm2 vorzubereiten. Solange p53 phosphoryliert ist, bleibt Mdm2 ohnehin nur schwach wirksam.
- p21CIP1/WAF1: Hemmer von Cdk4/D und Cdk2/E und damit Instrument zum Auslösen einer G1-Arrests
- 14-3-3 σ als Instrument zum Auslösen eines G2-Arrests
- verschiedene Gene für DNA-Reparaturproteine
- Bax und weitere Apoptose-fördernde Proteine der Bcl2-Familie wie PUMA und Noxa

Zellzyklusarrest mit Reparatur oder Apoptose

Im Fall eines DNA-Doppelstrangbruchs induziert phosphoryliertes p53 sein Zielgen p21, das seinerseits jene Cdk/Cyclin-Komplexe hemmt, die sonst pRb phosphorylieren würden. E2F bleibt so maskiert und die Zelle bleibt in der G1-Phase arretiert. Die Zelle erhält somit Gelegenheit, ihre DNA zu reparieren; die Weitergabe unvollständiger Chromosomen an die Tochterzellen wird damit verhindert. Nicht immer ist das Problem, das zur Aktivierung von p53 geführt hat, lösbar. Hält der G1-Arrest durch p53-Aktivierung über Wochen oder noch länger an, spricht man von Seneszenz. In manchen Fällen werden solche seneszente Zellen durch Makrophagen abgeräumt.

P53 ist also ein wesentliches Instrument im *G1 DNA damage checkpoint*. Dieser Mechanismus ist zielführend, beruht jedoch auf der Funktionalität von p21 und pRb. Was geschieht, wenn eines dieser Tumorsuppressorgene durch Mutationen inaktiviert wird?

Betrachten wir nun also einen anderen Notfall, nämlich den Verlust des zweiten Rb-Allels einer Zelle durch ein Mutationsereignis. Wird Rb inaktiviert, bleibt E2F aktiv. E2F wird natürlich bei jeder Zellteilung aktiviert, im Normalfall jedoch bald wieder zurückgefahren. Nun bleibt es dauernd aktiv und schraubt die Expression seiner Zielgene, darunter p14ARF, immer höher. P14ARF bindet und inaktiviert Mdm2, die E3-Ubiquitinligase für p53. Da Mdm2 für den proteolytischen Abbau von p53 notwendig ist, steigt dadurch die Konzentration von p53 immer weiter an. Die Induktion von p21 ist in diesem Fall wirkungslos (die Hemmung der Cdk/Cyclin-Komplexe bringt nichts, wenn Rb fehlt), doch werden auch die Apoptose-fördernden p53-Zielgene Bax, PUMA, Noxa immer stärker exprimiert. Dadurch wird die Zelle schließlich in Apoptose getrieben. Für den Organismus ist das eine gute Lösung: die einzelne Zelle, die verloren geht, ist leicht ersetzbar. Dafür wird die Gefahr vermindert, dass es durch diese Zelle, die offensichtlich ein Zellzyklus-Steuerungsproblem hat, zur Entwicklung einer malignen Neoplasie kommt.

Der Name p14ARF steht für *alternative reading frame*. Im auf Chromosom 9 gelegenen Gen verwenden zwei völlig verschiedene Proteine ein gemeinsames zweites Hauptexon, das sie allerdings in unterschiedlichen Leserastern ablesen. Das eine Protein ist p16 INK4A, das andere p14ARF. Beides sind kritische Tumorsuppressoren. Geht das gemeinsame Exon durch Deletion verloren oder wird es mutiert, verliert die Zelle durch ein Ereignis zwei Antionkogene. Der Locus auf 9p21 stellt damit eine Art Achillesferse dar und ist tatsächlich in vielen Tumoren mutiert.

Die Folgen von Mutationen in p53

Einzelne p53-Mutationen haben unterschiedliche biologische Konsequenzen und können zumindest vier Aspekte in unterschiedlichem Grad verändern: DNA-Bindung, Tertiärstruktur des Proteins, zelluläre Lokalisation und Tetramerbildung.

Wie bereits erwähnt, haben die häufigsten Punktmutationen in p53 zur Folge, dass das Molekül nicht mehr an die DNA binden kann. Einzelne, seltenere Mutationen im Inneren der normalerweise bereits dicht gepackten DNA-Bindungsdomäne ziehen jedoch darüber hinaus eine massive Konformationsänderung ("Mais Korn zu Popcorn") nach sich. Das hat in der Regel zwei Folgen: erstens eine starke Steigerung der Halbwertszeit des mutierten Moleküls, zweitens eine falsche Lokalisation: im Zytoplasma statt im Kern.

Die Tetramerisierungsdomäne bleibt jedoch von Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne in der Regel unberührt. Mutierte p53-Monomere, sogar "Popcorn-p53", beteiligen sich weiterhin an der Tetramerbildung. Tetramere werden aus mutierten und normalen Monomeren in allen Permutationen gebildet. Wie viele mutierte Untereinheiten ein Tetramer verträgt, hängt von der individuellen Mutation ab. Für viele Mutationen, speziell jene vom "Popcorn-Typ", genügt eine defekte Untereinheit, um das ganze Tetramer zu inaktivieren. Die einzigen funktionierenden Tetramere, jene aus vier gesunden Untereinheiten, stellen nur mehr eine kleine Minderheit dar (ein Sechzehntel aller Tetramere, wenn beide Monomertypen dieselbe Halbwertszeit haben und ein noch kleinerer Anteil, wenn das mutierte Monomer langsamer abgebaut wird). Nur diese können aber im Kern ihrer eigentlichen Aufgabe nachgehen. Eine solche Mutation eines p53-Allels schaltet damit die Funktion von p53 in dieser Zelle praktisch aus. Bei Mutationen, die nur die DNA-bindende Oberfläche des Proteins betreffen, z. B. die häufige Arg273His-Mutation, ist dieser Effekt weniger ausgeprägt.

Daher inaktivieren viele, aber nicht alle Mutationen nahezu das gesamte p53 einer Zelle. p53 ist damit eine Ausnahme unter den Antionkogenen: während sich Mutationen in Antionkogenen sonst rezessiv verhalten, kommt es bei vielen Mutationen in p53 vor, dass eine Mutation in einem p53-Allel über ein gleichzeitig in der Zelle vorhandenes gesundes Allel dominiert. Man nennt dieses Verhalten "dominant negativ".

Chromosomale Instabilität (CIN)

Wenn in einer Zelle p53 funktionell nicht mehr vorhanden ist, haben auftretende Doppelstrangbrüche fatale Folgen. Da der Zellzyklus nicht angehalten wird, tritt die Zelle in die S-Phase ein. Auch die Teile eines gebrochenen Chromosoms werden verdoppelt. Das periphere Fragment, das nicht mehr am Zentromer hängt, geht während der nächsten Mitose wahrscheinlich verloren. Durch die Verdoppelung des Fragments mit Zentromer kommen zwei "illegale" DNA-Enden ("legale" DNA-enden sind mit durch Telomerasequenzen gekennzeichnet) direkt neben einander zu liegen. Die Zelle "repariert" diese Situation, indem sie die beiden Schwesterchromatiden End-zu-End aneinanderhängt. In der darauffolgenden Zellteilung werden die aneinanderhängenden Chromatiden jedoch zum Objekt eines Tauschens zwischen den entstehenden Tochterzellen, mit drei möglichen Ausgängen: 1) Tochter A gewinnt beide Chromatiden, Tochter B bekommt nichts, 2) der umgekehrte Fall tritt ein (Resultat jeweils: Aneuploidie) oder 3) der DNA-Strang reißt irgendwo und ein neuer Chromosomenbruch tritt auf: in diesem Fall beginnt die Geschichte wieder von vorne (*breakage-fusion-bridge cycle*). Die Fehler in Chromosomenzahl und -Struktur werden so von Zellgeneration zu Zellgeneration größer, ein Phänomen, das wir chromosomale Instabilität nennen. Funktionierendes p53 ist daher ein "Wächter über die Integrität des Genoms". Geht er verloren, geht das Genom der betroffenen Zellen rasch den Bach hinunter.

Li-Fraumeni-Syndrom

Wenn in einer Familie eine typische Austauschmutation, die den Verlust eines DNA-Kontakt-Arginins bedeutet, in der Keimbahn weitergegeben wird, erkranken Familienmitglieder schon jung an malignen Tumoren. Eine typische Familiensituation: eine Patient, der in jungen Jahren an einem Sarkom wie z. B. einem Osteosarkom erkrankt, mit zwei unmittelbaren Verwandten, die ebenfalls jung einen malignen Tumor entwickelt haben, wie z. B. ein Nebennierenrinden-Karzinom, ein Mammakarzinom oder einen Hirntumor.

Auswirkungen des p53-Status auf die Behandelbarkeit von Tumoren

p53 ist auch für die Tumorthherapie von großer Bedeutung. Viele therapeutische Optionen, wie Bestrahlung oder zahlreiche Komponenten der Chemotherapie, wirken, indem sie DNA-Schäden induzieren. Anscheinend sind diese Maßnahmen um vieles effektiver, wenn der behandelte Tumor noch funktionstüchtiges p53 hat: dieses leitet in den betroffenen Zellen den apoptotischen Prozess ein. Tumorarten, bei denen p53 häufig intakt ist, wie Seminom, Wilms-Tumor oder ALL bei Kindern, sprechen in der Regel gut auf Therapieversuche an.

Bindung von pRb und p53 durch Virusproteine

Mehrere DNA-Virusarten haben unabhängig voneinander Proteine entwickelt, die den Zweck haben, p53 und pRb in der virusbefallenen Zelle auszuschalten:

Virus	pRb	p53
Adenovirus	E1A	E1B-p55
humanes Papillomavirus	E7	E6
SV40 (Affenvirus)	T	T ("large T")

Ein DNA-Virus, das für seine Vermehrung auf das Vorhandensein von Desoxyribonucleotiden etc. angewiesen ist, genießt offensichtlich einen Selektionsvorteil, wenn es ihm gelingt, die Zelle in die DNA-Replikationsphase zu drängen.

Die Kombination eines genetischen und eines genderspezifischen Effekts beeinflusst Mdm2- und p53-Spiegel

SNP309 (offizielle Bezeichnung rs2279744) bezieht sich auf das Nukleotid 309 im ersten Intron des MDM2-Gens an einer Stelle, die als transkriptioneller *enhancer* wirkt. An dieser Position findet sich in der Regel ein T, mit einer Häufigkeit von 0,35 aber ein G. Bei Krebspatienten beobachtet man, dass ein Malignom im Schnitt früher auftritt, wenn sie an dieser Position homozygot für "G" sind. Wie kommt das zustande? Ein G erzeugt an dieser Stelle eine wacklige Bindungsstelle für Transkriptionsfaktor Sp1, sodass das Mdm2-Protein verstärkt exprimiert wird. Wie wir vorher gesehen haben, bedeutet ein Mehr an Mdm2 ein Weniger an p53.

Doch es gibt noch eine weitere Eigenheit. Gerade neben dieser nicht-optimalen Sp1-Bindungsstelle liegt eine Bindungsstelle für den Östrogenrezeptor. Exprimiert die betreffende Zelle den Östrogenrezeptor UND ist reichlich Östrogen vorhanden, ist diese Bindungsstelle dauernd durch den Rezeptor besetzt, der seinerseits den Sp1-Wackelkandidaten durch Protein-Protein-Interaktion auf seinem Platz festnagelt. Dieser Mechanismus führt dazu, dass der p53-senkende Effekt von "G" versus "T" bei Frauen wesentlich stärker ausgeprägt ist. So war in einem Kollektiv von 162 PatientInnen mit diffusem großzelligem B-Zell-Lymphom das G-Allel nur bei Frauen mit einem (um 13 Jahre) früheren Auftreten des Tumors assoziiert, nicht aber bei Männern.

3. 4. Weitere Antionkogene

Weitere Tumorsuppressoren werden in den Abschnitten über Kolonkarzinom und Mammakarzinom besprochen:

Kolonkarzinom:

APC, "HNPCC" (MLH1, MSH2,...)

Brustkrebs:

BRCA1, BRCA2

Sehr wesentlich für die Entwicklung einer malignen Zelle ist der Zustand ihrer DNA-Reparaturmechanismen. p53, ATM, p21 lassen sich auch hier einordnen. Jede Zelle verfügt über mehrere Reparaturmechanismen, die verhindern, dass dauernd auftretende DNA-Schäden zu fixierten Mutationen werden. Gene, die zur DNA-Reparatur notwendige Proteine kodieren, verhalten sich in Bezug auf die Tumorentstehung in der Regel als Antionkogene.

4. TELOMERE UND TELOMERASE

Ist das ein erlaubtes Ende?

DNA ist, biologisch gesehen, ein "endloses" Molekül. Bei Bakterien hat ein Genom konsequenterweise Kreisform. Bei Eukaryoten gibt es natürlich Enden, da das Genom in Chromosomen aufgeteilt ist. Diese Enden sind aber besonders gekennzeichnet, um sie als "erlaubte" Enden auszuweisen. Diese Kennzeichnung basiert auf hunderten Wiederholungen der Sequenz TTAGGG, an die wieder spezielle Proteine binden. Das Ende des Chromosoms bildet eine Schlinge. Einer der beiden Stränge hängt als Einzelstrang etwas über und verdrängt über eine gewisse Strecke seinen eigenen Vorläufer (*displacement loop*) durch spezifische Basenpaarung. Durch diese "Lassostruktur" wird für die Zelle gar kein Doppelstrang-Ende sichtbar. In ihrer Gesamtheit wird diese Struktur Telomer genannt. Telomer-Strukturen kennzeichnen "erlaubte" Enden; alle anderen DNA-Enden werden als Doppelstrangbrüche interpretiert, welche repariert werden müssen.

Das Endreplikationsproblem

Die Aufteilung des Genoms in Chromosomen führt zu Problemen an diesen Enden, sobald die DNA verdoppelt werden soll. In Richtung Chromosomenende ist die Synthese kein Problem; sie wird einfach kontinuierlich bis zum Ende durchgeführt. In die Gegenrichtung, also vom Ende her, wird der Strang diskontinuierlich in Okazaki-Fragmenten synthetisiert. Dazu wird jeweils zuerst ein kurzer RNA-Strang synthetisiert, da nur die RNA-Polymerase einen Strang "von Null weg" starten kann. Anschließend verwendet die DNA-Polymerase dieses RNA-Stück als Primer, um ein Okazaki-DNA-Fragment zu synthetisieren. Um einen durchgehenden DNA-Strang zu erhalten, werden anschließend die RNA-Stücke wieder herausgeschnitten und durch DNA ersetzt. Das funktioniert für alle RNA-Fragmente bis auf das eine, das dem Chromosomenende am nächsten liegt. Dieses kann zwar herausgeschnitten, aber nicht mehr ersetzt werden, da kein 3'-Ende vorhanden ist, an den die DNA-Polymerase etwas anhängen könnte. Der einzelsträngige Rest ist nicht stabil und wird mit der Zeit abgebaut. Mit jedem Replikationszyklus verkürzt sich das Telomer dadurch um etwa 50 bis 100 Basenpaare.

Telomerase

Im Lauf der Generationen wäre diese Entwicklung fatal. Zunächst würde die Lassostruktur verloren gehen und mit sich immer weiter verkürzenden Telomeren wäre irgendwann der Punkt erreicht, wo die ersten wichtigen Gene angeknabbert werden. Aus diesem Grund hat die Evolution Telomerase erfunden, einen Enzymkomplex, der Telomere mit einem Trick verlängern kann. Telomerase verwendet eine eingebaute RNA als Matrize, um den "unproblematischen Strang" um viele repetitive TTAGGG-Einheiten zu verlängern, damit der

problematische Strang bei der nächsten Replikation von vornherein viel weiter draußen mit zusätzlichen Okazaki-Fragmenten beginnen kann. Im Grunde entspricht die Enzymaktivität der Telomerase jener einer reversen Transkriptase, da sie eine RNA-Matrize verwendet, um DNA zu synthetisieren. Ihre katalytische Untereinheit wird daher als hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*) bezeichnet.

Replikative Seneszenz

Telomerase ist nur in Keimlinienzellen --nur diese werden "unendlich" weitergegeben—sowie in einem Teil der Stammzellen und in klonal expandierenden B- und T-Zellen aktiv. In den übrigen somatischen Zellen wird Telomerase nicht mehr exprimiert. Das trägt zur eingeschränkten Teilungsfähigkeit und Seneszenz somatischer Zellen bei. Sobald nach einigen Teilungen das erste Telomer zu kurz wird, um die Lassostruktur noch ausbilden zu können, nimmt die Zelle das DNA-Doppelstrang-Ende wahr und interpretiert es als Doppelstrangbruch. Über Aktivierung von p53 und p21 wird die Zelle in einen anhaltenden Zellzyklusarrest versetzt, den wir als replikative Seneszenz bezeichnen. Dies ist ein wichtiger Schutzmechanismus zur Verhinderung von Tumoren.

Krebszellen reaktivieren Telomerase

Verliert eine Zelle p53, verliert sie auch diesen Schutzmechanismus. Ohne ihr molekulares Replikationszählwerk teilen sich die Zellen ungehemmt weiter und verbrauchen ihr gesamtes Telomerkapital. Der Prozess mündet in chromosomale Instabilität (CIN) mit Chromatid-Fusionierungen und *breakage-fusion-bridge*-Zyklen. Viele Zellen verlieren lebenswichtige Gene, sodass sie absterben. Mit der Zeit gelingt es einigen wenigen Zellen, ihr hTERT-Gen und damit die Telomerase-Expression zu reaktivieren. Mit Hilfe der Telomerase wird der gerade vorliegende, meist katastrophale Zustand des Genoms stabilisiert, indem die gerade vorliegenden DNA-Enden mit Telomeren versehen und so als "erlaubte" Enden getarnt werden. Das beendet den Anarchismus des Bruch-Fusions-Brücken-Zyklus und stabilisiert einen Zellklon mit grotesk verunstaltetem Genom. Dieser Zellklon wird zum Ausgangspunkt des nächsten Stadiums der Tumorverbreitung. In 85 bis 90% der malignen Neoplasien des Menschen ist Telomerase reaktiviert (der Rest verfügt über einen alternativen, hier nicht besprochenen Mechanismus zur Telomererhaltung). Reaktivierte hTERT verhält sich also wie ein Onkogen, das zur unbegrenzten Teilungsfähigkeit der Tumorzellen beiträgt.

Die pharmazeutische Industrie arbeitet intensiv daran, Telomerasehemmer zu entwickeln. Da der Großteil der somatischen Zellen Telomerase nicht exprimiert, besteht hier die Hoffnung auf eine neue Klasse von Krebsmedikamenten mit niedrigerer Toxizität.

5. PROTO/-ONKOGEN-AKTIVIERUNG

Doppelnamen erklären sich aus der Entdeckungsgeschichte der Moleküle

Verwirrung entsteht bei Molekülen der Protoonkogen/Onkogenfamilie leicht dadurch, dass dieselben Moleküle im Lauf ihrer Entdeckungsgeschichte verschiedene Namen erhielten. Viele Moleküle wurden zunächst in einer onkogenen Form in Retroviren entdeckt: ein Beispiel sind die beiden Onkogene des AEV (*avian erythroblastosis virus*), erbA und erbB. erbA stellte sich später als onkogene Form des Schilddrüsenhormonrezeptors heraus, erbB als jene des *epidermal growth factor* (EGF)-Rezeptors.

Manche Proteine, wie Myc, haben ihre aus dem Virus stammende Bezeichnung behalten. Um Unklarheiten zu vermeiden, wird in diesen Fällen die physiologische Form mit dem Präfix c- (für *cellular*) gekennzeichnet; die virale mit v- (z. B. c-Myc, v-Myc). In der Literatur zu molekularen Aspekten der Krebsentstehung war es üblich, Gene klein und kursiv zu schreiben (*c-myc*), Proteine groß und normal (c-Myc). Heute kollidiert diese Schreibweise mit einer jüngeren Konvention, in der menschliche Gene durchgehend mit Großbuchstaben geschrieben werden (c-MYC statt *c-myc*).

Obwohl also c-ErbB ganz anders klingt als EGFR oder HER-1 (*human EGF receptor-1*), handelt es sich immer um dasselbe Protein.

Der EGF-Signaltransduktionsweg als Beispiel für normale Protoonkogen-"Arbeitsplätze"

Ein Signaltransduktionsweg, in den einige "klassische" Protoonkogene eingebaut sind, ist der EGF/PDGF-Signaltransduktionsweg, der auch deshalb von Bedeutung ist, da wir über mehrere Typen von Therapeutika verfügen, um ihn zu blockieren. Viele Epithelzellen exprimieren EGF-Rezeptoren, viele mesenchymale Zellen PDGF-Rezeptoren; nach dem jeweiligen Rezeptor sind die zur Signalweiterleitung verwendete Proteine ident. Der Wachstumsfaktor **EGF** quervernetzt zwei **EGF-Rezeptoren**, deren intrazelluläre Domäne Tyrosinkinasen darstellen und einander auf Tyrosinen phosphorylieren. An diese Phosphotyrosine bindet zunächst ein **Adapter-Protein**, das dann einen Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF, *guanine exchange factor*) an die Membran holt. GEF wiederum interagiert mit dem **Ras**-Protein und tauscht das daran gebundene GDP gegen GTP aus. In diesem Zustand ist Ras aktiv und aktiviert mehrere Kinasekaskaden: eine besteht aus **Raf**, MEK und ERK, eine andere aus MEKK, SEK und Jun-K (Namen unwichtig). Die jeweils letzte dieser Kinasen wechselt in den Kern und phosphoryliert dort Transkriptionsfaktoren: **Elk** und **Jun**. Diese Transkriptionsfaktoren schalten Gene an, die ihrerseits wieder für Transkriptionsfaktoren kodieren, die früh nach einem Wachstumssignal exprimiert werden: **Fos** und Jun. Jun führt also über eine positive Rückkoppelungsschleife kurzzeitig zur Produktion von mehr Jun. Die Kombination von Elk, Fos und Jun (das Heterodimer aus Fos und Jun wird als AP-1, *activating protein-1*, bezeichnet) aktiviert viele andere Gene, die zur Umsetzung des Wachstumssignals benötigt werden.

Alle im letzten Absatz **fettgedruckten** Moleküle wurden auch schon in onkogener Form als Mitverursacher maligner Neoplasien gefunden. In onkogener Form wird der Zelle also jeweils

das Vorhandensein des Wachstumssignals EGF vorgetäuscht- und die Zelle reagiert entsprechend: durch Proliferation.

Beispiele für Protoonkogenaktivierung:

Klasse I: Überexpression von Wachstumsfaktoren:

Wachstumsfaktoren –Protoonkogen-Produkte der Klasse I-- wirken onkogen meist dadurch, dass durch ein Mutationsereignis das unveränderte Molekül viel zu stark exprimiert wird, häufig autokrin durch dieselbe Zelle.

Bei M. Hodgkin führt eine Überproduktion von Wachstumsfaktoren in den wenigen Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen zu einer starken Vermehrung von eigentlich harmlosen Lymphozyten, Histiocyten und Granulozyten, bis große Lymphome entstehen. Der spezifische Wachstumsfaktor-Cocktail entscheidet dabei über die Ausformung des histologischen Typs (z. B. nodulär sklerosierend bei kräftiger Beimischung des Fibroblastenstimulators TGF β). Über 99% der Zellen bei M. Hodgkin sind normale, nicht-maligne Zellen, die nur tun, was ihnen gesagt wird.

Viele Epithelzellen exprimieren einen oder mehrere der vier Typen von EGF-Rezeptoren: HER1 bis HER4 (*Human EGF Receptor*). Diese Rezeptoren können durch eine ganze Reihe von Wachstumsfaktoren der EGF-Familie aktiviert werden: z. B. EGF, TGF α , Heregulin. Bronchialepithel exprimiert sowohl Heregulin, als auch alle vier EGF-Rezeptoren. Ligand und Rezeptor treffen sich normalerweise jedoch deshalb nicht, da die Rezeptoren ausschließlich nach basolateral sortiert werden, Heregulin aber ausschließlich apikal sezerniert wird. Die dichten Zellkontakte der *tight junctions* verhindern eine autokrine Stimulation. Dies ändert sich, sobald eine kleine Verletzung für eine Diskontinuität im Epithel sorgt: Heregulin kann durch das "Loch" auf die basolaterale Seite diffundieren und Zellen des Epithels zur Proliferation anregen, bis der Epitheldefekt wieder geschlossen ist. Dieser sinnvolle Regulationsmechanismus wirkt jedoch kontraproduktiv, wenn sich ein Bronchuskarzinom entwickelt hat. Sobald sich Zellen aus dem Epithelverband lösen, wird die Situation durch autokrine Stimulation des Zellklons verschlimmert, da Wachstumsfaktor und Rezeptor nun ungehindert interagieren können. Medikamente wie Cetuximab, Panitumumab (monoklonale Antikörper gegen HER1) oder Erlotinib (ein niedermolekularer Hemmer der EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase) werden beim nicht-kleinzelligen Bronchuskarzinom eingesetzt, um diese Stimulation zu unterbinden.

Kinasen der Klassen II und III

Eine Gruppe von Molekülen, die relativ leicht durch eine Mutation aktiviert werden, stellen die Kinasen dar. Der Grund liegt darin, dass eine isolierte Kinasedomäne in der Regel dauernd aktiv ist. Andere Teile des Moleküls dienen dazu, die Kinasedomäne zu regulieren, das heißt, zeitweilig zu bremsen. Dieses Prinzip kann gut am Beispiel des Signaltransduktionsmoleküls c-Src illustriert werden. Die Kinasedomäne von Src wird abgeschaltet, indem das ganze Molekül wie ein Taschenmesser zusammenklappt und die Kinasedomäne dadurch unzugänglich macht: ein C-terminal liegendes Tyrosin wird durch eine übergeordnete Kinase phosphoryliert und bindet dann an die SH-2-Domäne des N-

Terminus. Damit sind leicht Mutationen vorstellbar, die zur Src-Aktivierung führen: am einfachsten ist eine Punktmutation oder Deletion am C-Terminus, was jeweils zum Verlust des kritischen Tyrosins führt; aber auch Mutationen, die die SH-2-Domäne am N-Terminus betreffen, können funktionell dieselbe Wirkung haben. Generell führt also der Verlust "bremsender" Molekülteile bei Kinasen leicht zur Daueraktivierung.

Eine ähnliche Situation besteht beim EGF-Rezeptor. Sein extrazellulärer Anteil wirkt zunächst bremsend auf die intrazellulär liegende Kinasedomäne. Diese Hemmung wird physiologischerweise nur durch Bindung von EGF aufgehoben. Eine Deletion der extrazellulären Domäne oder eine Punktmutation in der kleinen Transmembranstrecke (bei einem zweiten EGF-Rezeptortyp namens HER-2/neu) führen aber ebenso zu einer Enthemmung, sodass es für die Zelle so aussieht, als wären extrazellulär große Mengen EGF vorhanden.

Nach grundsätzlich demselben Prinzip können zahlreiche Kinasen zu Onkogenen aktiviert werden. Erwähnt seien hier noch c-Raf und c-Abl, wobei letzteres beim Menschen häufig durch die Philadelphia-Translokation aktiviert wird, die weiter unten besprochen wird.

Der EGF-Rezeptor HER2 kann jedoch auch durch reine Überexpression, also ohne jede Veränderung des Moleküls, zur Krebsentstehung beitragen. Das ist bei etwa einem Viertel der Mammakarzinome der Fall: wenn die Moleküle dicht an dicht auf der Membran sitzen, phosphorylieren sie einander auch in der Abwesenheit von Ligand. Dadurch erzeugt sich die Zelle selbst ein dauerndes Proliferationssignal. Diese Form des Mammakarzinoms hatte ursprünglich eine sehr schlechte Prognose. Inzwischen ist es möglich, dieses Signal durch den monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin[®]) zu unterbrechen und zugleich die HER2-überexprimierenden Zellen spezifisch anzugreifen.

Klasse III: Ras: die Aktivierung eines G-Proteins

Ras driftet, durch einen Farnesylrest verankert, der Plasmamembran entlang. An Ras gebunden ist immer ein Guanosinnukleotid: GDP in der abgeschalteten Form und GTP in der angeschalteten Form. Trifft ein Wachstumssignal ein, bewirkt ein Austauschfaktor (GEF) das Ersetzen des GDP durch ein neues GTP. Damit ist Ras eine gewisse Zeit aktiv. Diese Zeit ist limitiert durch eine in das Ras-Protein integrierte enzymatische Aktivität, eine Art "Zange", die GTP spaltet, indem sie das letzte der drei Phosphate "abwickelt". Diese GTPase-Aktivität ist ziemlich ineffizient, verglichen mit typischen Enzymaktivitäten. Die Aktivität dieser Zange kann von außen durch *GTPase activating proteins* (GAP) beschleunigt werden, doch ist die Zange selbst integraler Bestandteil des Ras-Proteins. Die zwei Schneideflächen der Zange sind Glycin 12 und Glutamin 61. Wird eine dieser beiden Aminosäuren durch eine Punktmutation ausgetauscht, funktioniert die GTPase nicht mehr, und das Ras-Protein wird unabschaltbar.

Die klassische Mutation mit diesem Effekt, die man z. B. häufig in Bronchuskarzinomen beobachtet, ist der Austausch von Glycin 12 (Codon: GGC) durch Valin (GTC) oder Cystein (TGC). In beiden Fällen wird also ein G durch Mutation in ein T verwandelt, ein Austausch, der bei Rauchern durch Benzpyren-Adduktbildung an Guanin mit Fehleinbau von dATP am gegenüberliegenden Strang erklärt werden kann (siehe Abschnitt "Mutationen").

Eine Anwendung von *personalized medicine* liegt darin, zu bestimmen, ob bei einem Individuum mit z. B. Bronchuskarzinom die Karzinomzellen aktiviertes Ras aufweisen. Ist Ras, und damit der gesamte EGF-Signaltransduktionsweg aktiviert, hat es keinen Sinn, teure anti-EGF-Medikamente wie Antikörper oder EGF-Rezeptor-Kinasehemmer einzusetzen.

Klasse IV: Myc: Möglichkeiten der Aktivierung eines Transkriptionsfaktors

c-Myc ist ein Transkriptionsfaktor, der immer aktiviert wird, wenn eine Zelle in die S-Phase eintreten soll. Durch Mutation kann Myc auf zwei klassische Arten aktiviert werden:

Amplifikation

Amplifikation bedeutet die Vervielfältigung eines Gens. Die Auslöser und Mechanismen, die zu diesem eigenartigen Zustand führen, sind nicht geklärt. Amplifikation tritt in zwei Formen auf, die durch FISH (*fluorescent in-situ hybridization*) dargestellt werden können:

1. *Homogeneous staining regions*: In einem Chromosom tritt ein Genabschnitt auf, der ausschließlich aus aneinandergereihten Kopien des fraglichen Gens, in unserem Beispiel des c-MYC-Gens, besteht.
2. *Double minute chromosomes* (doppelte winzige Chromosomen): Viele neue, unabhängig Neben den normalen Chromosomen treten zahlreiche zusätzliche, sehr kleine Chromosomen auf, die viele Kopien des fraglichen Gens enthalten.

[Mdm2, *mouse double minute 2*, bekam diesen Namen, weil es in dieser Form amplifiziert in einer Maustumorzelle identifiziert wurde. Eine Amplifikation der E3-Ubiquitin-Ligase für p53 ist biologisch gleichbedeutend mit dem Verlust von p53. Mdm2 ist daher ebenfalls ein Protoonkogen, das durch Amplifikation aktiviert werden kann.]

Wie entstehen diese eigenartigen Chromosomenveränderungen? Einen Schlüssel ergab die Beobachtung, dass einzelne "nachhinkende" Chromosomen in der Mitose manchmal dazu führten, dass daraus zusätzliche Mikronuclei entstanden, wenn sich die Kernmembran wieder bildete. Diese Mikronuclei weisen häufig eine niedrige Anzahl von Kernporen auf, sodass zu wenig Material für die nächste DNA-Replikation importiert werden kann. Die Replikation verläuft dadurch im Verhältnis zum Hauptkern verzögert. Beim Eintritt der Zelle in die nächste Mitose führt die Chromosomenkondensation bei noch zahlreichen offenen Replikationsgabeln zum Zertrümmern des Chromosoms (**Chromothripsis**). Die Bruchteile werden später durch den Reparaturmechanismus des *non-homologous end joining* (NHEJ) irgendwie zusammengestückelt, was zu absurd rearrangierten Einzelchromosomen und/oder kleinen zirkulären *double minutes* führen kann. Schon vorher können "verhaltensoriginelle" Versuche, hängengebliebene Replikationsgabeln wieder flottzubekommen, zur Vermehrfachung von DNA-Abschnitten führen. Dabei wird wiederholt versucht, lose Enden an über kurze Strecken halbwegs ähnliche Matrizen anzulagern und fortzusetzen (*fork stalling and template switching, microhomology-mediated priming*).

Die in einer dieser Formen amplifizierten c-MYC -Gene sind an sich normal aufgebaut; doch gibt es so viele davon, dass, wenn jedes "normal" funktioniert, insgesamt viel zu viel "normales" Myc-Protein entsteht, das die Zelle in die S-Phase treibt.

Translokation

Bei der klinischen Form des Burkitt-Lymphoms, eines B-Zelltumors, finden sich häufig Translokationen, die einerseits das c-MYC -Gen auf Chromosom 8, andererseits einen der drei Immunglobulinloci (Schwere Ketten auf Chromosom 14, leichte Ketten auf Chromosom 2 oder 22) betreffen. Diese Form der Translokation wird in B-Zellen dadurch erleichtert, dass die DNA an den entsprechenden Stellen im Rahmen des Rearrangements geschnitten wird. Das normale c-MYC -Gen gerät dadurch unter den Einfluss eines *enhancers*, der eigentlich dazu da ist, eine sehr starke Expression der Immunglobulinketten zu bewirken. Resultat: normales c-Myc-Protein wird in viel zu großen Mengen produziert.

Was für Myc gilt, gilt auch für viele andere Transkriptionsfaktoren: deren Aktivierung bedeutet meist, dass ein mehr oder weniger normal funktionierendes Protein in viel zu großen Mengen exprimiert wird.

Klasse V: Überexpression von Cyclin D

Translokationen geschehen immer wieder an typischen Stellen: die Kartierung der Translokationsorte hat manchen Genen, wie *bcr* (*breakpoint cluster region*), den Namen gegeben. Ein anderes Beispiel ist *bcl-1* (*B-cell leukemia-1*), identifiziert aus der häufig beim Mantelzelllymphom auftretenden Translokation t(11;14), das sich als Cyclin D herausgestellt hat. Durch die Translokation kommt es auch in Abwesenheit eines Wachstumssignals zur Expression von Cyclin D und damit zu einer Proliferationstendenz.

Andere typische Translokationen

Bcl-2, identifiziert aus der Translokation t(14;18), hat diesen Namen behalten. Es hat sich später als ein Apoptose-verhinderndes Protein auf Mitochondrien herausgestellt. Diese Translokation bewirkt kein rascheres Wachstum, sondern verhindert, dass die Zellen sterben - das daraus resultierende folliculäre Lymphom ist hochdifferenziert und wächst langsam, mit einem natürlichen Verlauf von vielen Jahren. Dem steht gegenüber, dass es in der Regel nicht heilbar ist, da unsere Therapiemöglichkeiten wesentlich besser gegen rasch proliferierende Zellen wirken.

t(9; 22)- Philadelphia-Translokation:

Beteiligt sind die Tyrosinkinase *c-abl* und ein Gen, dessen Namen *bcr* (*breakpoint cluster region*) einfach aus der Tatsache stammt, dass das Chromosom 22 häufig an dieser Stelle bricht (es handelt sich in diesem Fall nicht um den Leichtkettenloкус). Diese Translokation unterscheidet sich von der eben besprochenen Burkitt-Translokation in einem wichtigen Punkt: die genaue Lokalisation der Translokation ist innerhalb der beiden betroffenen Gene. Das bedeutet, dass Fusionsgene entstehen, die "vorn" dem einen, aber "hinten" dem anderen Gen entsprechen. Von den beiden entstehenden Fusionsgenen macht sich nur das funktionell bemerkbar, das "vorn" *bcr* und "hinten" *abl* entspricht. Durch Transkription dieses Fusionsgens entsteht eine Fusions-mRNA; weiter durch Translation ein Fusionsprotein: ein Protein also, das in dieser Form normalerweise beim Menschen nicht existiert und eine dauernd aktive Tyrosinkinase darstellt.

Pharmakologische Querverstrebung: Novartis hat einen spezifischen Hemmer gegen dieses Protein entwickelt (Imatinib, Glivec[®]), der hervorragende Ergebnisse in der klinischen Erprobung bei CML und anderen Ph⁺-Leukämien erbracht hat.

Mutationen mit Fernwirkungen

Die bisher beschriebenen Mutationstypen haben den Vorteil, pädagogisch wertvoll zu sein, da sie in nachvollziehbarer Weise die Entstehung eines anarchistischen Zellklons fördern. Der Großteil der einen individuellen Tumor verursachenden Mutationen verhält sich leider nicht pädagogisch wertvoll. Viele Mutationen in den Weiten der DNA betreffen Bindungsstellen für transkriptionsfördernde oder –hemmende Proteine, die sich durch DNA-Schleifenbildung auf Gene auswirken, die weit entfernt liegen. Das Ergebnis ist ein überexprimiertes Onkogen oder ein unterexprimierter Tumorsuppressor, die wir diagnostizieren können, ohne dass wir eine Chance hätten, die verantwortliche Punktmutation 27 Gene weiter zu identifizieren. Auch Mutationen, die non-coding RNAs betreffen, sind in der Lage, die Expression weit entfernter Gene zu verändern.

6. MUTATIONSARTEN BEI DER MENSCHLICHEN KREBSENTSTEHUNG: ZUSAMMENFASSUNG NACH FORMALEN KRITERIEN

Formal lassen sich drei große Gruppen von Mutationsarten unterscheiden:

1. Punktmutationen, Deletionen, Insertionen

Beispiele:

Proto/-Onkogene: EGF-Rezeptor, Src, Ras: nicht abschaltbare Proteine

Antionkogene: Rb, p53: inaktive Proteine

2. Amplifikationen

Beispiele: Myc, Mdm2: normales Protein stark überexprimiert

3. Translokationen

Beispiele:

Burkitt-Typ: Myc, normales Protein stark überexprimiert

Philadelphia-Typ: Bcr-Abl, Fusionsprotein nicht abschaltbar oder überexprimiert

7. VIREN

Beitrag von Viren zur Krebsentstehung beim Menschen

Manche Viren fördern die Entstehung spezifischer Neoplasien:

HPV

Zervixkarzinom

EBV

Burkitt-Lymphom, M. Hodgkin, nasopharyngeales Karzinom

HBV, HCV

Hepatozelluläres Karzinom

HHV-8	Kaposi-Sarkom
MCV	Merkelzell-Karzinom
HTLV-1	adulte T-Zell-Leukämie

Dies geschieht nicht nach einem einheitlichen Mechanismus. Unter den beim Menschen Tumoren fördernden Viren überwiegen DNA-Viren. DNA-Viren profitieren davon, Zellen in S-Phase zu treiben, da dann das Material –Nukleotide, Polymerasen— für die Replikation ihres Genoms reichlich zur Verfügung steht. Die Mechanismen, über die dieser Effekt erreicht wird, sind verschieden.

Für das **humane Papillomavirus (HPV)** wurde er bereits im Abschnitt über pRb und p53 erwähnt: spezielle Proteine, E7 und E6, führen zur Inaktivierung dieser beiden zentralen Tumorsuppressoren. "E" steht dabei für "early", die Gruppe von Proteinen, die früh nach Infektion einer Zelle exprimiert werden. Papillomviren infizieren Plattenepithelzellen und führen meist zu gutartigen Warzen; etwa ein Drittel der ca. 100 Typen wird sexuell übertragen. Nur wenige Serotypen, wie 16, 18, 31, 33, 35, 45 verursachen den Großteil aller Zervixkarzinome. Der Prozess beginnt mit einer chronischen Infektion des Zervix-Plattenepithels, die die Zellproliferation antreibt. Während das Virus normalerweise episomal bleibt, findet man es bei Zervixkarzinomen ins Genom integriert. Dies ist anscheinend eher ein Unfall als ein typischer Teil der Virusfunktion wie bei Retroviren oder Hepatitis B Virus. Jedenfalls führt die Integration zu den höchsten E7-Spiegeln, da das Gen des Gegenspielers E2 dabei häufig inaktiviert wird. Impfung gegen die häufigsten Hochrisiko-HPV-Typen verhindert die chronische Infektion und sollte daher die Entstehung eines Zervixkarzinoms verhindern, wenn Mädchen vor dem Beginn sexueller Beziehungen immunisiert werden. Der Impfstoff besteht aus dem rekombinant hergestellten Kapsidprotein des L1-Gens (*late*), das spontan so genannte *virus like particles* bildet. Papanicolaou-Abstriche müssen trotzdem gemacht werden, da die gegenwärtigen Präparate (z. B. Gardasil[®], Cervarix[®]) nicht alle relevanten Virustypen abdecken.

Die Erstinfektion mit dem der Herpesgruppe angehörenden Epstein-Barr-Virus (infektiöse Mononukleose oder Pfeiffersches Drüsenfieber) betrifft meist Jugendliche, da es mit dem Speichel übertragen wird (*kissing disease*). Das Virus befällt zunächst die Epithelien von Mundhöhle und Rachen, danach die unter den Schleimhäuten befindlichen B-Lymphozyten. B-Zellen werden durch den Virusbefall aktiviert und beginnen zu proliferieren. Ein System von mehreren viralen Proteinen fixiert die Zellen in diesem expandierenden Zustand; die Zellen reifen nicht aus und gehen auch von sich aus nicht mehr in Apoptose. Gewöhnlich werden Viruserkrankungen über zytotoxische T-Zellen kontrolliert, die mit ihrem T-Zellrezeptor virusbefallene Zellen an den auf MHC-I präsentierten Fremd(Virus-)peptiden erkennen und abtöten. Auf diese Weise wird über Wochen auch die infektiöse Mononukleose bekämpft, so dass die Lymphknotenschwellungen allmählich zurückgehen. Das EBV-Virus wird allerdings nicht mehr komplett eliminiert. Restliche infizierte Zellen können nach Jahren zum Ausgangspunkt für Burkitt-Lymphom, Mb. Hodgkin oder nasopharyngeale Karzinome werden. Im Afrika südlich der Sahara ist das Burkitt-Lymphom wesentlich häufiger, die Beziehung zwischen EBV-Virus und Burkitt-Lymphom wesentlich ausgeprägter als in Europa. Ein Erklärungsversuch sieht die Ursache dafür in einem Kombinationseffekt zwischen der EBV-Infektion und der verbreiteten Malaria, welche die zytotoxische T-Zellantwort bremst und die B-Zellstimulation weiter steigert. Diese verstärkte, chronische Stimulation wäre der Nährboden für die durch Fehlrearrangement entstandenen, für das

Burkitt-Lymphom typischen Translokationen, die zur Überexpression des c-MYC-Gens führen.

Über die Mechanismen der Förderung der Entstehung von Leberzellkarzinomen durch **Hepatitis B und –C Viren** besteht noch keine endgültige Klarheit. Da in der Mehrheit der Fälle chronische Hepatitis und Zirrhose um Jahre vorausgehen, dürften reaktive Verbindungen, die in Zusammenhang mit der chronischen Entzündung entstehen, vermehrt Mutationen auslösen. Die Auswirkungen dieser Mutationen werden verstärkt durch den Tumorpromoter-Effekt chronischer Regenerationsversuche. Im Fall des HBV, dessen Genom zwar aus DNA besteht, das dem Lebenszyklus nach allerdings eher ein Retrovirus darstellt, werden noch zwei weitere Mechanismen diskutiert: eine Rolle der Integration des Virus in das Genom der Wirtszelle (z. B. durch Inaktivierung eines Antionkogens) sowie eine Rolle des X-Proteins. Das X-Protein ist das Produkt des vierten Gens des winzigen HBV. Sein Name rührt daher, dass seine Funktion im Gegensatz zu den drei anderen Genen (für HBs-Antigen, HBc-Antigen und Polymerase) unklar war. Diese Unklarheit hält an: zahlreiche Arbeiten haben verschiedenen Mechanismen vorgeschlagen, mittels derer das X-Protein vermeintlich die Entstehung von Leberzellkarzinom begünstigt; eine allgemein akzeptierte Lösung zeichnet sich allerdings noch nicht ab.

Das bei AIDS-Patienten häufiger, sonst sehr selten auftretende Kaposi-Sarkom wird eigentlich durch das **humane Herpesvirus Typ 8 (HHV-8)** ausgelöst. Allerdings ist dieses Virus bei normaler Immunabwehr nicht pathogen; erst bei massiv kompromittiertem Immunstatus wie eben in Kombination mit dem HIV-Virus wirkt es auf Endothelzellen onkogen. Wahrscheinlich tragen mehrere Gene des Virus zu diesem Effekt bei; darunter zwei, die für Homologe zu humanem Bcl-2 und Cyclin D kodieren.

Das Merkelzell-Karzinom ist ein seltener neuroektodermaler Hauttumor, der vom sensorischen Merkelzell-Organ ausgeht und offenbar häufig durch das **Merkel cell polyoma virus (MCV)** ausgelöst wird. Ähnlich SV40 exprimiert es ein *large T*-Protein, von dem man annehmen kann, dass es pRb und p53 inaktiviert. In den Tumorzellen findet man in der Regel eine Helicase-defiziente, ins Wirtsgenom integrierte Kopie des Virus. Auch dieses häufige Virus wird gewöhnlich durch das Immunsystem unter Kontrolle gehalten.

HTLV-1 (*human T-cell leukemia virus* oder *human T-lymphotropic virus*) ist ein Retrovirus, das in Südwestjapan, der Karibik, Teilen Südamerikas und Zentralafrikas endemisch ist und sexuell sowie mit der Muttermilch übertragen wird. Es trägt zur Entstehung der adulten T-Zelleukämie bei, indem es die Population von T-Zellen expandiert und damit die Wahrscheinlichkeit des Auftretens weiterer Mutationen in T-Zellen erhöht.

Die klassischen tumorauslösenden (Tier-) Retroviren

Die klassischen Retroviren spielen zwar keine direkte Rolle für die Entstehung maligner Neoplasien beim Menschen, hatten aber außerordentliche Bedeutung für die Identifikation zahlreicher für die menschliche Krebsentstehung relevanter Moleküle. Retroviren sind RNA-Viren, die nach Infektion einer Zelle ihr eigenes Genom mit Hilfe einer reversen Transkriptase in DNA umschreiben. Nach Vervollständigung des zweiten Stranges durch DNA-Polymerase der Wirtszelle inseriert diese provirale Genomform in das Wirtsgenom. Durch Transkription dieser Einheit entstehen einerseits die mRNAs für die benötigten

Virusproteine, andererseits genomische RNAs zur Bildung neuer Viren. Die Transkription dieser proviralen Einheit wird aktiviert durch eine an beiden Enden gelegene regulatorische Sequenz, die als LTR (*long terminal repeat*) bezeichnet wird. Die dazwischen gelegenen Strukturgene werden in die Gruppen gag, pol und env gegliedert. Gag (*group-specific antigen*) kodiert die Proteinbestandteile des Nukleokapsids, pol die Polymerase/ reverse Transkriptase, env die Hüllproteine (*envelope*) des Virus.

Retroviren können die Tumorentstehung durch zwei prinzipielle Mechanismen fördern: durch insertionale Mutagenese oder durch die Aufnahme eines Onkogens.

Insertionale Mutagenese bedeutet eine genetische Veränderung durch den Zufallsprozess der Virusinsertion. Insetiert das Virus z. B. in der Nähe eines Gens für einen Wachstumsfaktor oder einen Transkriptionsfaktor, wirken die LTRs des Virus auch auf dieses Gen transkriptionsverstärkend. Das Mäuse befallende Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV) enthält kein Onkogen. Es führt aber zur Überexpression des Wachstumsfaktors Wnt, wenn es nahe des Wnt-Gens in das Chromosom inseriert. Diese autoendokrine Form der Aktivierung des Wnt-Signaltransduktionweges trägt bei Mäusen zur Mammakarzinom-Entstehung bei.

Die zweite Art, wie Retroviren zur Tumorentstehung beitragen können, ist durch **Aufnahme eines Onkogens** in das Virusgenom. Dieses Ereignis ist selten; die bekannten Viren dieses Typs sind nur durch mehrere unabhängige Rekombinationsereignisse inklusive einer reversen Transkription der mRNA des wachstumsfördernden Gens zu erklären. Ist jedoch einmal ein replikationsfähiges Virus dieses Typs entstanden, überexprimieren alle virusinfizierten Zellen dieses Gen. Wegen ihrer tumorfördernden Wirkung wurden solche "Virusgene" zu einer Zeit, als noch wenig über die Wachstumsregulation in Wirbeltierzellen bekannt war, "Onkogene" genannt. Erst später erkannte man die Beziehung dieser viralen Onkogene zu normalen, in die Wachstumsregulation von Wirbeltieren eingebundenen Genen, die man deswegen als "Protoonkogene" bezeichnete. Die in Tumor-Retroviren aufgenommenen Onkogene liegen in der Regel in einer mutierten Form vor, so dass sie nicht abschaltbare, daueraktive Proteine kodieren.

8. HYPOXIE UND TUMOR-ANGIOGENESE

Die bisher besprochenen genetischen Veränderungen beziehen sich auf die Entwicklung bis zur "ersten" malignen Zelle. Diese stellt jedoch keinen Endpunkt dar. Eine kritische Bedingung für die weitere Tumorentwicklung ist die Versorgung der proliferierenden Zellen mit Energieträgern und Sauerstoff. Mit dem autonomen Wachstum der Tumorzellen wird bald der Punkt erreicht, an dem die Diffusionsstrecken zu lange sind, um zentral lokalisierte Zellen hinreichend zu versorgen. Der so entstehende Sauerstoffmangel setzt zwei für die weitere Entwicklung des Tumors bedeutsame Mechanismen in Gang.

Die erste Folge der Hypoxie stellt die Induktion von p53 dar. Falls der betroffene Zellklon bezüglich p53 noch intakt ist, führt dieser normale Regulationsmechanismus zum G1-Arrest, bei längerem Einwirken zur Apoptose der Zellen im zentralen, unterversorgten Gebiet des Tumors. Das bedeutet, dass in diesem Gebiet ein starker Selektionsdruck gegen funktionelles p53 entsteht: eine Zelle, die p53 verliert, kann sich als einzige gegen die stillgelegten

Konkurrenten behaupten und einen neuen, nunmehr um den Verlust von p53 maligneren Zellklon bilden. Die entsprechenden Zellen haben damit den *DNA-damage-checkpoint* verloren, zeigen chromosomale Instabilität und akkumulieren wesentlich rascher weitere kritische Mutationen. Dieser Mechanismus, durch den Hypoxie den Verlust von p53 begünstigt, könnte die Ursache dafür sein, dass p53 das am häufigsten mutierte Molekül in der Krebsentstehung ist.

Der zweite Mechanismus wird über die bereits am Beginn dieses Skriptums besprochene sauerstoffabhängige Hydroxylierung, Ubiquitinierung und Degradation des Transkriptionsfaktors HIF-1 vermittelt. HIF-1 wirkt in allen Zellen bei Sauerstoffmangel als Transkriptionsfaktor. Während es nur in der Niere nennenswert Erythropoetin induziert, induziert es in vielen Geweben eine Reihe anderer Gene, die der Zelle in Summe eine sinnvolle Antwort auf die Hypoxie-Situation ermöglichen. Induktion von NO-Synthase führt über Stickstoff-Monoxid-Produktion zu einer maximalen Weitstellung der Blutgefäße. Anaerobe Glykolyse wird durch Induktion der Glucose-Transporter GLUT1 und GLUT3 sowie der Enzyme Hexokinase und Lactat-dehydrogenase (LDH) gefördert. Bei Sauerstoffmangel im zentralen Tumorgebiet führt die Akkumulation von HIF-1 zur Induktion des Signalmoleküls VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Sezerniertes VEGF diffundiert entlang der extrazellulären Matrix radial in alle Richtungen, erreicht das Endothel der nächstgelegenen Blutgefäße und regt dieses zur Sprossung an, so dass neue Gefäßabzweigungen in Richtung des VEGF-Konzentrationsgradienten und damit in Richtung des unterversorgten Gebiets entstehen. Die einwachsenden Gefäße erreichen so das zentrale Tumoreal und verbessern die Versorgung dieser Zellen, die inzwischen eventuell p53 verloren haben. Sie erfüllen damit eine notwendige Bedingung für den nächsten Schritt in der Entwicklung eines malignen Tumors: nur, wenn der Tumor mit Gefäßen versorgt ist, kann er auf dem Blutweg metastasieren.

Die Überlegung, diesen Weg der Tumorprogression zu blockieren, führte zur Entwicklung des humanisierten monoklonalen anti-VEGF-Antikörpers Bevacizumab (Avastin®), der z. B. zur Therapie des metastasierenden kolorektalen Karzinoms und nicht-kleinzelligen Bronchuskarzinoms eingesetzt wird. Zu erwartende Nebenwirkungen der Interferenz mit der Gefäßneubildung sind notwendigerweise Wundheilungsstörungen –kritisch bei Tumorpatienten, die oft unvorhergesehen operiert werden müssen--, Blutungen und Teratogenität.

9. INFILTRATION UND METASTASIERUNG

Die bisher besprochenen Veränderungen des Zellgenoms durch Mutationen konzentrierten sich auf Gene, die das Proliferationsverhalten der Zellen beeinflussen. Verstärkte Proliferation bedeutet aber noch nicht Malignität oder Metastasierung, sondern nur benigne lokale Ausbreitung und Tumorbildung. Allerdings wirken dieselben Mutationsarten, die für wachstumsrelevante Gene bereits besprochen wurden, auch auf Gene, die für die Verankerung, die Migrationsfähigkeit sowie die Überlebensfähigkeit von Zellen wichtig sind. Diese Veränderungen verschieben die Charakteristik eines Tumors z. B. vom *Carcinoma in situ* über ein lokal infiltrierendes und destruierendes Stadium zur Fernmetastasierung.

Infiltration und Metastasierung wird durch folgende Veränderungen von Zellen gefördert:

- Verminderte Expression oder direkte Mutation von Adhäsionsmolekülen wie N-CAM oder E-Cadherin, sowie von β -Catenin, das E-Cadherin am Zytoskelett verankert, ermöglichen das Ablösen von Einzelzellen aus einem Zellverband.
- Verlust der Zellpolarität und veränderte Affinität zu Komponenten der extrazellulären Matrix. Normale Epithelzellen sind polarisiert: sie haben nur basal Rezeptoren für Laminin und Fibronectin, mit denen sie an die extrazelluläre Matrix in Form der Basalmembran binden. Wie ein Boot auf dem Wasser, "schwimmen" die Zellen auf der Oberfläche der extrazellulären Matrix; sie haben keine Tendenz, in diese "einzutauchen". Diese ungleiche Verteilung der Rezeptoren wird durch Sortierungs- und Transportproteine im Inneren der Zelle aufrechterhalten. Änderungen in der Expression dieser Rezeptoren und Sortierungsproteine können dazu führen, dass die Rezeptoren gleichmäßig über die gesamte Zelloberfläche verteilt werden; die Zelle taucht damit in das subepitheliale Bindegewebe ein.
- Aktivierung der Fähigkeit zum Abbau extrazellulärer Matrix. Invasion der extrazellulären Matrix wird erleichtert durch vorherigen lokalen Abbau. Dieser wird durch verschiedene Familien von Proteasen bewirkt, unter denen die Matrix-Metalloproteinasen wie Kollagenase oder Stromelysin von besonderer Bedeutung sind. MT1-MMP (*membrane-type matrix metalloproteinase*) wird z. B. sekundär durch Verlust des APC-Antionkogens oder durch Überexpression von β -Catenin exprimiert (siehe Abschnitt Kolonkarzinom), da die Transkription dieses Gens, wie jene von c-Myc, durch den β -Catenin/Tcf4-Komplex aktiviert wird.
- Verstärkte Tendenz zur Lokomotion. So, wie es extrazelluläre Signalmoleküle gibt, die das Wachstum von Zellen fördern, existieren auch Signalmoleküle, die die Wandertendenz von Zellen beeinflussen. Einer von diesen ist *hepatocyte growth factor*, dessen Rezeptor durch das c-Met-Protonkogen kodiert wird. Tumorzellen, die c-Met überexprimieren, zeigen verstärkte Beweglichkeit.
- Autonomie von den sonst für das Überleben einer Zelle notwendigen Gewebssignalen. Die molekulare Basis dieser Autonomie wird noch nicht hinreichend verstanden, doch ist klar, dass Zellen nicht nur für ihre Proliferation, sondern auch für ihr bloßes Überleben auf extrazelluläre Information angewiesen ist, die den weiter bestehenden Bedarf nach dieser Zelle signalisiert. Dieses Signal ist im Ursprungsgewebe normalerweise vorhanden, fehlt aber, sobald die Zelle dieses verlässt (*anoikis*), so dass die auswandernde Zelle automatisch z. B. durch Induktion eines ähnlich wie Bax wirkenden Proteins, Bmf, in Apoptose geht. Aus experimentellen Befunden ist bekannt, dass für jede Zelle, der es gelingt, in einem Fremdgewebe eine Metastase zu etablieren, tausende im Blutstrom verschleppte Zellen zugrunde gehen. Neben dem Verlust Apoptose-induzierender Proteine findet man auch zu hohen Prozentsätzen Überexpression des Apoptose-hemmenden Proteins Bcl-2, z. B., wie erwähnt, beim folliculären Lymphom, beim Hormon-refraktären Prostata-Karzinom (90-100%), beim malignen Melanom (90%), oder beim Östrogen-Rezeptor-positiven Mammakarzinom (80-90%).

Diese Liste an Veränderungen bedeutet nicht, dass für jede einzelne Veränderung eine eigene Mutation benötigt wird. Das Auswandern von Zellen aus einem epithelialen Verband ist ein in bestimmten Situationen notwendiger, physiologischer Vorgang. So lösen sich in der Embryonalentwicklung Vorläufer von Melanozyten und peripheren Neuronen aus dem epithelialen Neuralrohr und wandern in die Peripherie. Diese so genannte Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) wird auch beim Erwachsenen zur Wundheilung verwendet. Bei einer Verletzung wird beispielsweise ein kleiner Schnitt der Haut zunächst durch einen Fibrinpfropf verschlossen. Aus dem Epithelverband der benachbarten Epidermis lösen sich dann Zellen per EMT, wandern als morphologisch mesenchymale Zellen im Bindegewebe unter den Fibrinpfropf ein und verwandeln sich dort zurück in eine epitheliale Zellschicht. Die Rückverwandlung bezeichnet man als Mesenchymal-Epitheliale Transition (MET). Mit anderen Worten: von einem epithelialen Gewebe ausgehende lokale Infiltration ist am richtigen Ort und zur richtigen Zeit ein komplexes physiologisches Programm, das ein- und ausschaltbar ist. Ein "Hauptschalter" in diesem Programm ist beispielsweise der Transkriptionsfaktor Twist, der im Experiment epitheliale Zellen in mesenchymale Zellen umprogrammieren kann. Bei der lokalen Infiltration eines Karzinoms wird dieses Programm zur Unzeit aktiviert. Die Ursachen dieser Aktivierung sind noch nicht ausreichend klar; Interaktionen mit Zellen des Bindegewebes scheinen eine große Rolle zu spielen; auch Mutationen, die sich auf die Aktivität der Hauptschalter auswirken, sind als Ursache vorstellbar.

10. IMMUNANTWORTEN GEGEN TUMOREN

Erfolgreiches Bekämpfen eines Tumors mittels einer Immunantwort ist möglich

Zu dieser Aussage führt folgendes experimentelle System: Zellen aus dem Tumor einer Maus werden in ein anderes Individuum desselben Mausstamms übertragen. Wenn die zweite Maus vorher mit bestrahlten Tumorzellen der ersten Maus geimpft wurde, ist sie in der Lage, eine Dosis injizierter Tumorzellen niederzukämpfen, die für nicht vorbehandelte Mäuse letal wäre.

Dieser Schutz ist T-Zell-abhängig: er existiert nicht in T-Zell-defizienten Mäusen, kann aber durch *adoptive transfer* von T-Zellen übertragen werden.

Dieser Schutz ist auch Antigen-abhängig, da er nicht gegen einen anderen Tumortyp desselben Mausstamms wirkt. Tumoren exprimieren also antigene Peptide, die zum Ziel einer Tumor-spezifischen T-Zellantwort werden können. Solche Peptide werden auf MHC-I präsentiert und werden als *tumor rejection antigens* bezeichnet.

Solche *tumor rejection antigens* wurden auch für menschliche Tumoren definiert: als Peptide in MHC-I, die von aus Patienten isolierten T-Zellen erkannt werden. In jedem Fall gibt es eine Erklärung dafür, dass die entsprechenden T-Zellklone nicht schon ausgeschaltet (eliminiert oder tolerisiert) wurden:

1. *unique*: mutiertes Peptid
2. ektopisch exprimierte Antigene aus der Fetalperiode oder aus immunologisch privilegierten Zonen (z. B. Hoden)
3. Zell-spezifische Differenzierungsantigene (Melanozyten: Enzyme für Melanin)
4. stark überexprimierte Proteine (z. B. HER-2/neu im Mammakarzinom)

5. Proteine mit abnormalen posttranslationalen Modifikationen (z. B. hypoglykosyliertes Mucin)
6. Virusproteine (z. B. HPV E6 und E7)

Obwohl solche Immunantworten gegen Tumoren nicht selten gefunden werden, führen sie nur in seltenen Ausnahmefällen zur Elimination des Tumors (seltene spontane Remissionen von malignen Melanomen treten auf), zumindest, wenn der Tumor bereits diagnostiziert wurde. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass solche Eliminationen in einem frühen Stadium stattfinden, allerdings wird der Tumor dann nicht bemerkbar. Daher die Frage: ist das Immunsystem gegen maligne Zellen wirksam?

Gibt es *immune surveillance* für neoplastische Zellen?

Der Ausdruck "*immune surveillance*" wurde von Frank MacFarlane Burnet (1899-1985, Selektionshypothese) in den frühen Tagen der Immunologie (1967) geprägt und drückt die Erwartung/Hoffnung aus, dass das Immunsystem in der Lage sei, neu entstehende entartete Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Andererseits ist es vollkommen klar, dass maligne Tumoren die zweithäufigste Todesursache darstellen; falls es also eine *immune surveillance* gibt, hat ihre Wirkung offensichtlich Grenzen.

Zunächst einige einschränkende Beobachtungen: Die Inzidenz der häufigsten Tumoren ist in Mäusen oder Menschen mit T-Zell-Defekten nicht wesentlich verändert. Jene Tumoren, die in dieser Situation tatsächlich häufiger auftreten, sind Virus-induziert. Der Unterschied ist leicht dadurch zu erklären, dass Viren "fremde" Peptide kodieren, die T-Zellen stimulieren. Diese Ergebnisse aus genetisch bedingten Immundefizienzsyndromen korrelieren gut mit Befunden bei AIDS-Patienten. Die bei diesen Patienten erhöhte Frequenz von Analtumoren lässt sich auf sexuell erworbene HPV-Infektionen zurückführen; die Häufigkeit kolorektaler Karzinome anderer Lokalisation ist unverändert. Auch das im AIDS-Vollbild gehäuft auftretende Kaposi-Sarkom ist viral, nämlich durch humanes Herpesvirus Typ 8 (HHV-8), induziert. Andererseits haben Individuen mit T-Zell-Defekten natürlich eine massiv erniedrigte Lebenserwartung durch Infektionen, was die Verlässlichkeit der Beobachtung bezüglich Neoplasien einschränkt.

Andere Daten sprechen dafür, dass das Immunsystem, zumindest gegen einige spezielle Tumortypen, eine starke Wirkung entfaltet:

- In Patienten mit Organtransplantaten, im speziellen Lebertransplantaten, die über lange Zeit immunsupprimiert werden, treten Hauttumoren im Lauf der Jahre häufiger auf. Das betrifft in erster Linie Plattenepithelkarzinome, aber auch Basaliome und Maligne Melanome.
- Mehrere Knockout-Mausstämme, bei denen Gene mit zentralen Funktionen für das Immunsystem ausgeschaltet wurden, zeigen erhöhte Tumorzinzenz nach einer Exposition gegen das chemische Karzinogen Methylcholanthren, z. B. RAG2, IFN γ , IFN γ -R, STAT1 und Perforin. In einem anderen Mausmodell wurde gezeigt, dass eine Immunantwort über CD4⁺T-Zellen und Makrophagen prä-maligne seneszente Hepatozyten eliminiert, bei denen eingebrachtes onkogenes Ras eine p53-Antwort ausgelöst hat.
- In einer retrospektiven Untersuchung der Krankheitsverläufe von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom ergab sich ein wesentlicher Einfluss von Tumor-

infiltrierenden T-Lymphozyten. Patientinnen mit zahlreichen Tumor-infiltrierenden Lymphozyten hatten einen wesentlich günstigeren Krankheitsverlauf.

- Am überzeugendsten spricht der eindrucksvolle Erfolg der *immune checkpoint blockers* in der Behandlung vieler Tumortypen dafür, dass das Immunsystem in der Lage ist, maligne Zellen auch *in vivo* erfolgreich zu bekämpfen. Gleichzeitig zeigt dieses Beispiel allerdings, dass maligne Zellen regelmäßig in der Lage sind, diese Immunantwort zu unterdrücken.

Kein valides Argument gegen eine effiziente *immunosurveillance* ist die Tatsache, dass überhaupt Tumoren auftreten, und dass bei bestehenden Tumoren histologisch meist keine Immunreaktion zu beobachten ist. Auch bei einer funktionierenden *immune surveillance* wären beobachtbare Tumoren solche, die eben dadurch selektiert sind, dieser Überwachung entkommen zu sein.

Wenn wir von einem effizienten *immune surveillance*-Mechanismus gegen maligne Zellen ausgehen, existieren mehrere Möglichkeiten, diesem zu entkommen. Voraussetzung, eine effiziente zytotoxische T-Zellantwort in Gang zu bringen, ist die Präsentation von *non-self*-Peptiden in MHC-I auf der Tumorzelle, in Kombination mit kostimulatorischen Molekülen, wie B7, die notwendig sind, um naive T-Zellen zu stimulieren. Ohne Kostimulation bewirkt das präsentierte Peptid periphere Anergie, also eine Tolerisierung, in naiven T-Zellen. Die T-Zell-stimulatorische Kombination ist selten gegeben, da die überwiegende Mehrzahl der Peptide *self* repräsentiert und Tumorzellen in der Regel nicht über kostimulatorische Moleküle verfügen. Sollte eine vollständige Konstellation einmal eine T-Zellantwort in Gang bringen, haben solche Zellen einen Selektionsvorteil, die durch Mutation einen wesentlichen Teil dieser Konstellation (z. B. das spezifische MHC-I-Molekül, das das kritische Peptid bindet) verlieren. Auch wenn bereits Anti-Tumor-T-Zellen vorhanden sind, gibt es für den Tumor noch Auswege. Manchmal produzieren Tumorzellen immunsuppressive Zytokine, z. B. TGF- β oder IL-10, die T-Zellen direkt hemmen. Eine häufige und erfolgreiche Strategie für Tumorzellen besteht darin, hemmende Transmembran-Proteine auf aktivierten infiltrierenden T-Zellen zu betätigen ("der T-Zelle auf den *off-button* zu hauen"). Darunter fallen die als *immune checkpoints* bezeichneten CTLA-4 und PD-1, die beide strukturell mit CD28 verwandt sind (Achtung: ein solcher *immune checkpoint* hat nichts mit einem Zellzyklus-Checkpoint zu tun). Wird PD-1 durch seinen Ligand PD-1L aktiviert, unterbindet PD-1 die Signalübertragung durch den T-Zell-Rezeptor. Viele Zelltypen exprimieren PD-1L konstitutiv, ebenso viele Tumorzellen. Durch Betätigung von PD-1 kann sich die Tumorzelle also im letzten Augenblick vor der zytotoxischen T-Zelle schützen, auch wenn diese einen passenden Rezeptor hat.

Ein zusätzliches, experimentell intensiv untersuchtes, aber in seiner Bedeutung für die *in vivo*-Situation unklares Modell für eine mögliche frühzeitige Elimination von Tumorzellen ist die Aktivierung von NK-Zellen. Eine solche Aktivierung kann einerseits durch das Fehlen von NK-hemmenden MHC-I-Molekülen ausgelöst werden, andererseits auch durch Stress-induzierte Liganden wie MICA, die nach Zellstress-Situationen auf der Oberfläche von Zellen exprimiert werden und direkt NK-aktivierende Funktion haben.

Das maligne Melanom als Modell für erfolgreiche Immunintervention

Im Jahr 2003 (New Engl. J. Med. 348: 567) wurde ein spektakulärer Fall berichtet: zwei Nierentransplantatempfänger entwickelten ein sekundäres malignes Melanom, das offensichtlich mit dem Transplantat übertragen worden war. Der Spenderin war 16 Jahre vor

ihrem Tod aus anderen Ursachen ein Melanom entfernt worden. Offensichtlich war ihr Immunsystem über all diese Jahre in der Lage gewesen, die über ihren Körper verteilten Mikrometastasen unter Kontrolle zu halten.

Intervention zur Enthemmung einer bestehenden Anti-Tumor-Immunantwort:

Ebenfalls am Modell Melanom erwiesen sich Versuche als außerordentlich erfolgreich, Tumorzellen daran zu hindern, die "*immune checkpoints*" CTLA-4 und PD-1 zu betätigen, wenn cytotoxische Antitumor-T-Zellen bereits vorhanden sind. Das Konzept hat *response rates* bis zu 60% bei Melanom und ist seither auf viele andere Tumoren ausgedehnt worden.

Pharmakologische Querverstrebung: Zu den *immune checkpoint blockers* gehören die folgenden drei Antikörper, die gegen malignes Melanom zugelassen wurden und in unterschiedlichen Phasen der klinischen Testung gegen zahlreiche weitere Tumorarten sind:

- **Ipilimumab** bindet an CTLA-4 und blockiert so dessen Interaktion mit B7.
- **Nivolumab** bindet an PD-1 und verhindert so dessen Aktivierung durch Tumor-exprimierten PD-1L.
- **Pembrolizumab** blockiert PD-1 in gleicher Weise.

Die Strategie kann offensichtlich nur dann Erfolg haben, wenn bereits eine T-Zell-Antwort vorhanden ist. Ist das nicht der Fall, kann man versuchen, eine solche zu induzieren:

Intervention zur Induktion einer Anti-Tumor-Immunantwort:

Beim Melanom wurde eine Reihe von *tumor rejection antigens* definiert:

- MAGE-Antigene (*Melanoma AntiGen Encoding gene*- nicht exprimiert in normalen adulten Geweben außer dem Hoden)
- Peptide des Enzyms Tyrosinase (1. Schritt der Melaninproduktion)
- gp100 (Differenzierungsantigen von Melanozyten)
- MART1 (*Melanoma Antigen Recognized by T cells*; Differenzierungsantigen von Melanozyten)
- gp75 (Differenzierungsantigen von Melanozyten)

Melanompatienten wurden mit diesen Antigenen in vielen verschiedenen Spielarten immunisiert. Zwei Protokoll-Typen zeigen in manchen Studien ermutigende Ergebnisse: einerseits eine direkte Immunisierung mit den Antigenen oder Peptiden daraus in Kombination mit verschiedenen Adjuvantien und/oder Zytokinen (GM-CSF, IL-2, IL-12); andererseits die Immunisierung mit autologen dendritischen Zellen, die *in vitro* mit diesen Antigenen beladen wurden: Kostimulatorisch wirkende Moleküle wie B7 helfen so, naive T-Zellen zu stimulieren. Für beide Strategien gibt es Studien, die *response rates* in der Größenordnung von 20 bis 30 % zeigen, jedoch auch Studien, die keinerlei Effekt finden.

Eine kritische Möglichkeit für Nebenwirkungen, die im Auge behalten werden muss, ist das Auslösen einer Autoimmunreaktion gegen das Ursprungsgewebe des Tumors. Am Beispiel Melanom wird dies illustriert durch in einigen Fällen auftretende Vitiligo.

Pharmakologische Querverstrebung: In den USA ist mit Sipuleucel-T eine analoge Therapie gegen Prostatakarzinom zugelassen, in der EU wurde sie wieder zurückgezogen.

Antigenpräsentierende Zellen werden vom Patienten entnommen und mit einem Fusionsprotein aus GM-CSF und prostataspezifischer saurer Phosphatase stimuliert/beladen. Die APC, welche Peptide der aufgenommenen Phosphatase auf ihren MHC-Molekülen präsentieren, werden dem Patienten wieder infundiert und regen eine prostatazellspezifische Immunantwort an.

11. RESISTENZMECHANISMEN: GENETISCHE PLASTIZITÄT VON TUMOREN UNTER THERAPIE

Dieselben Mutationsmechanismen, die zur Entstehung der ersten malignen Zelle geführt haben, wirken unverändert in der weiteren Entwicklung der Neoplasie. Sie sind bestimmend für die Fähigkeit bestimmter Subklone des Tumors, Resistenz gegen Chemotherapie zu entwickeln.

Eine in der Chemotherapie häufig eingesetzte Substanzklasse stellen die Alkylantien dar. Musterbeispiel ist Cyclophosphamid (Endoxan®). Das Prinzip ihrer Wirksamkeit liegt in ihrer Fähigkeit, kovalente Bindungen mit Atomen in Makromolekülen einzugehen, die über freie Elektronenpaare verfügen. Sehr ähnlich der schon besprochenen Wirkung von Aflatoxin, binden sie z. B. an das O6 oder N7-Atom von Guanin. Einer der möglichen Mechanismen der Resistenzentwicklung gegen Alkylantien beruht darauf, dass Zellen sich zu einem gewissen Grad vor dieser Art von Molekülen schützen, indem sie ein Abwehrmolekül produzieren, Glutathion, das ein Schwefelatom mit vielen freien Elektronenpaaren beinhaltet. Jedes Alkylantienmolekül, das durch ein Glutathionmolekül abgefangen wird, steht nicht mehr zur Schädigung der DNA zur Verfügung. Glutathion wird durch Glutathion-S-transferase an das alkylierende Molekül gekoppelt. Ein Mechanismus, mit dem Tumorzellen Resistenz gegen Alkylantien erreichen können, besteht darin, dieses Enzym überzuexprimieren.

Methotrexat, aus der Substanzklasse der "Antimetaboliten", entfaltet seine Antitumorwirkung durch Hemmung der Nukleotidsynthese. In der Purinsynthese, sowie bei der Synthese von Thymin aus Uracil, ist die Übertragung einzelner Kohlenstoffatome notwendig. Für diese C1-Gruppenübertragungen ist als Kofaktor Tetrahydrofolsäure notwendig, das sich bei der Reaktion zu Dihydrofolsäure verbraucht. Um dieses wieder zu Tetrahydrofolsäure zu regenerieren dient das Enzym Dihydrofolatreductase (DHFR, bereits als E2F-Zielgen erwähnt). Methotrexat ist ein Folsäureanalogon, das sich an das Enzym bindet und es blockiert. Tumorzellen können resistent gegen Methotrexat werden, wenn es ihnen gelingt, die Zahl an DHFR-Molekülen so weit zu steigern, dass die in der Zelle befindlichen Methotrexat-Moleküle nicht mehr jedes DHFR-Molekül blockieren können. Dies gelingt ihnen durch Amplifikation des DHFR-Gens.

Vinca-Alkaloide wie Vincristin (Oncovin®) sind pflanzliche Produkte aus der rosafarbenen Catharanthe (*Catharanthus roseus*, früher *Vinca rosea*). Vincristin bindet an Tubulin-Monomere und verhindert damit dessen Polymerisierung zu den Microtubuli der mitotischen Spindel. Eine Möglichkeit der Resistenzentwicklung besteht darin, Tubulin durch Austauschmutation so zu modifizieren, dass es einerseits immer noch funktioniert, andererseits aber nicht mehr Vincristin bindet. Eine andere Möglichkeit der Resistenzentwicklung ist äußerst negativ für die Behandlungsaussichten: Amplifikation des

MDR1-Gens (*multi-drug resistance*). Das MDR1-Gen kodiert ein Membranprotein, P-Glykoprotein, das als unspezifische Pumpe fungiert, die Fremdmoleküle aus der Zelle hinauspumpt. Eine diese Pumpe überexprimierende Tumorzelle ist nicht nur gegen Vincristin resistent, sondern auch gegen z. B. das Streptomyces-Produkt Doxorubicin (Adriamycin®) und mehrere andere Chemotherapeutika.

Ein wichtiger Bestandteil von Chemotherapien gegen Lymphome und lymphatische Leukämien sind Glucocorticoide, die in diesen Zellen Apoptose induzieren. Zellen werden gegen Glucocorticoide resistent, indem der Glucocorticoid-Rezeptor durch Mutationen seine Funktion verliert oder kaum mehr exprimiert wird.

Diese Beispiele sollen folgende Prinzipien illustrieren:

- Der Prozess von Mutation und Selektion, der ursprünglich zur Entstehung der malignen Neoplasie geführt hat, dauert unter chemotherapeutischer Behandlung an und führt zur Resistenzentwicklung des Tumors.
- Polychemotherapie ist eine unbedingte Notwendigkeit. Da Zellen durch Mutation grundsätzlich gegen jede einzelne Substanz Gegenmittel "erfinden" können, senkt die Kombination von chemotherapeutischen Prinzipien die Wahrscheinlichkeit, dass der Tumor resistent wird. Nur eine Zelle, der es gelingt, gleichzeitig Glutathion-S-transferase zu amplifizieren, MDR zu amplifizieren und den Glucocorticoid-Rezeptor zu inaktivieren, überlebt eine Kombinationstherapie mit Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon (das klassische CHOP-Protokoll gegen Lymphome). Dies ist wesentlich weniger wahrscheinlich als die Entwicklung einer Resistenz gegen eine Monotherapie.
- Gleichzeitig bedeutet das, dass der Tumor im Fall eines Rezidivs genetisch vollkommen andere Eigenschaften hat als sein ursprünglich diagnostizierter Vorläufer. Insbesondere sind die Behandlungsaussichten besonders schlecht, da das Rezidiv bereits gegen die meisten gängigen Chemotherapieklassen Resistenzen entwickelt hat.

12. KOLON-KARZINOM: MOLEKULARE BESONDERHEITEN

Der Tumorsuppressor APC

APC steht für Adenomatöse Polyposis Coli. Mitglieder von Familien mit dieser erblichen Erkrankung entwickeln hunderte Kolonpolypen, von denen einzelne nach Jahren schließlich in Malignität münden. Das Genotyp/Phänotyp-Muster ist eine Parallele zu erblichem Retinoblastom und Li-Fraumeni-Syndrom: betroffene Patienten erben ein defektes APC-Allel. APC spielt jedoch nicht nur bei dieser relativ seltenen genetischen Erkrankung eine Rolle: in etwa 60% aller Fälle von Kolonkarzinom ist die APC-Funktion durch Mutation verloren gegangen.

Der Ausfall von APC fördert die Entstehung einer malignen Neoplasie durch verschiedene Mechanismen, die auf mehrere getrennte biologische Funktionen des Moleküls zurückzuführen sind.

In seiner ersten Funktion wirkt APC antagonistisch auf das Molekül β -Catenin in einem Signaltransduktionsweg, der wesentlich für die Aufrechterhaltung der Population der Kolonepithelzellen ist und durch den Wachstumsfaktor *Wnt* aktiviert wird. β -Catenin "kettet"

das Adhäsionsmolekül E-Cadherin, das Zell-Zellkontakte vermittelt, an das Zytoskelett. Überschüssiges β -Catenin, das für diese mechanische Aufgabe nicht gebraucht wird, wird in Abwesenheit von *Wnt* durch eine an APC gebundene Kinase (Glykogen Synthase Kinase 3 β ; GSK-3 β) phosphoryliert und damit zum Abbau über den Ubiquitin-Proteasomweg markiert. Bindet *Wnt* an seinen Rezeptor, führt das zur Inaktivierung des APC-Proteinkomplexes, und das überschüssige β -Catenin akkumuliert, wechselt in den Zellkern und entfernt dort einen Hemmer von Transkriptionsfaktor Tcf4 (*T-cell factor 4*). Das führt zur Expression mehrerer proliferationsfördernder Gene wie Cyclin D und c-MYC. Die physiologische Bedeutung dieses Signaltransduktionsweges zeigt sich daran, dass *Tcf4-knockout*-Mäuse kurz nach der Geburt an einem Mangel an Darmepithelzellen sterben.

Im Fall einer mutationsbedingten Inaktivierung beider APC-Allele führt der Wegfall der Möglichkeit, β -Catenin zu phosphorylieren auch in Abwesenheit des Wachstumsfaktors *Wnt* zu einer Dauerakkumulation von β -Catenin und damit zu einer Dauerexpression von Cyclin D und c-Myc. Mit anderen Worten: der Verlust von APC führt zu einem vorgetäuschten *Wnt*-Wachstumssignal.

Das Vortäuschen eines *Wnt*-Wachstumssignals wäre bei intaktem APC auch durch eine Überexpression oder mutationsbedingte Stabilisierung von β -Catenin denkbar. Tatsächlich findet man eine solche in etwa 10% aller Kolonkarzinome. β -Catenin hat in diesen Fällen also Onkogen-Funktion.

Dieses Beispiel zeigt, dass eine wesentliche Tumor-fördernde Veränderung in der Aktivierung eines für die Proliferation der spezifischen Zellart ausschlaggebenden Signalwegs liegt. Dies ist sowohl über den Verlust von bremsenden Elementen (Inaktivierung von Antionkogenen) als auch über die Aktivierung Signal-fördernder Elemente (Aktivierung von Protoonkogenen zu Onkogenen) möglich.

APC hat noch eine weitere zelluläre Funktion in der Metaphase der Zellteilung: es koppelt die Enden der Microtubuli der entstehenden Spindel auf der einen Seite an die Kinetochoren der Chromosomen, auf der anderen Seite des Spindelpols an eine definierte Stelle der Zellmembran. Bei einem Ausfall von APC verringert sich die Präzision des Auseinanderziehens und Verteilens der Chromosomen auf die entstehenden Tochterzellen. Die Folge ist, wie beim Ausfall von p53, chromosomale Instabilität (CIN), die den Grundstein für einen raschen Verfall der Genomqualität bildet.

Außerdem gibt es Hinweise dafür, dass APC über die Anheftung der Spindel an der Zellmembran die Zellteilungsachse einstellt, die wesentlich für die asymmetrische ("heteromorphe") Charakteristik der Stammzellteilung ist. Fehlt APC in einer Stammzelle, verläuft die Teilung symmetrisch und resultiert in zwei Zellen mit uneingeschränktem Teilungspotential. Die Fehleinstellung der Zellachse könnte so eine Ursache für die Differenzierungsstörung des Zellklons sein. Diese Anheftungsfunktion von APC mag der Grund sein, warum der Verlust von APC-Aktivität häufig der erste Schritt in der *multi-step*-Entwicklung des Kolonkarzinoms ist.

"HNPCC"-Antionkogene

Neben der Adenomatösen Polyposis Coli gibt es eine zweite, häufigere Form der genetisch bedingten Prädisposition für Kolonkarzinom, die morphologisch nicht mit der Ausbildung von Schleimhautpolypen einhergeht: *hereditary non-polyposis colorectal cancer* oder HNPCC. Die klinischen Kriterien für eine HNPCC sind das Auftreten von Kolonkarzinom bei drei Mitgliedern einer Familie, wobei zwei Generationen betroffen sind und zumindest einer der Tumoren vor dem 50 Lebensjahr auftritt. Von der Entartungsneigung sind auch andere Gewebe betroffen, speziell das Endometrium: in manchen Familien steht das gehäufte Auftreten von Endometriumskarzinom im Vordergrund. Etwa 5% der Gesamtheit der Fälle von Kolonkarzinom gehen auf HNPCC zurück. Diese entwickeln sich häufig im *Colon ascendens*, während Kolonkarzinome sonst eher im Sigmoid und Rectum auftreten. Im Gegensatz zu Familiärer Polyposis Coli entwickeln nicht 100% der Betroffenen einen malignen Tumor, jedoch immer noch 80%. Ist das Prädispositionssyndrom einmal diagnostiziert, ist es daher nötig, engmaschige Kontrollen von Kolon und Uterus vorzunehmen. Der HNPCC zugrunde liegende Defekt betrifft nicht ein Gen, sondern das *mismatch repair*-System als solches. Die am häufigsten betroffenen Gene sind MLH1 und MSH2, doch können auch die anderen Komponenten betroffen sein. Wie bei APC hat der Defekt nicht nur für die hereditäre Form des Kolonkarzinoms Bedeutung, sondern wird auch als somatische Mutation in sporadischen Fällen von Kolonkarzinom, Endometriumkarzinom und Magenkarzinom gefunden.

Defekte im *mismatch repair*-System kann man an einer Sonderform der genetischen Instabilität erkennen: *microsatellite instability (MIN)*. Wiederholungen von einzelnen oder wenigen Basen, wie z. B. TTTTTTTT oder ATATATATATATATAT, so genannte Mikrosatelliten, sind offensichtlich besonders schwierig in gleich bleibender Anzahl zu replizieren. Bei Defekten im *mismatch repair*-System findet man von Zellgeneration zu Zellgeneration häufig Veränderungen in der Zahl solcher Wiederholungen: man spricht deshalb von *microsatellite instability*. Der Begriff hat deshalb Bedeutung, weil es technisch wesentlich leichter ist, *MIN* zu diagnostizieren als alle in Frage kommenden Gene des komplexen Reparatursystems auf Mutationen abzusuchen.

Überexpression von Glutathion-S-Transferase als Resistenzmechanismus gegen Alkylantien wurde bereits dargestellt. Auch Defekte im MMR-System können zu Resistenz gegen in der Chemotherapie eingesetzte Alkylantien führen. Alkylantien führen zur Methylierung oder Chloroethylierung von Guanin auf dem Sauerstoff O6, was, wie erwähnt, in der nächsten Replikation einen *mismatch* mit T zur Folge hat. Es existiert im Prinzip ein spezielles Molekül, um die auch unter physiologischen Umständen auftretende O6-Methylierung wieder zu beseitigen: Methyl-Guanin-Methyltransferase. Nach Aufnahme der Methylgruppe kann sich dieses Molekül jedoch nicht mehr regenerieren; unter den Bedingungen einer Chemotherapie ist dieser Mechanismus sofort überlastet, so dass viele O6-Methylguanine oder Chloroethylguanine bestehen bleiben. Diese werden nach der DNA-Replikation durch ihren *mismatch* mit T erkannt und "repariert"; das MMR-System ist in dieser Situation allerdings offensichtlich nicht in der Lage, alten und neuen Strang voneinander zu unterscheiden, da es den *mismatch* häufig in die "falsche" Richtung ausbessert. Das hat derart massive Punktmutationen zur Folge, dass die Zelle daran zu Grunde geht –der eigentliche Wirkmechanismus von Alkylantien. Anders ausgedrückt: die Wirkung von Alkylantien setzt ein intaktes MMR-System voraus. Zellen entkommen dieser Wirkung, wenn Mutationen

frühzeitig das MMR-System lahm legen –es entsteht ein MMR-defekter, Alkylantien-resistenter Zellklon.

13. MAMMA-KARZINOM: MOLEKULARE BESONDERHEITEN

Defekte der Tumorsuppressoren BRCA-1 und -2 tragen wesentlich zur Entstehung von Mamma- und Ovarialkarzinomen bei. Sie sind notwendige Bestandteile mehrerer DNA-Reparaturmechanismen, z. B. eines Systems zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen. Menschliche Zellen haben zwei Systeme zur Wiederherstellung der Kontinuität nach einem Doppelstrangbruch: *non-homologous end joining* (NHEJ) und homologe Rekombination (HR). Der Unterschied zwischen diesen beiden Systemen besteht darin, dass NHEJ nicht zur vollständigen Wiederherstellung des ursprünglichen Zustands führt, die eigentlich "bessere" HR jedoch nur möglich ist, wenn die DNA bereits repliziert wurde.

Non-homologous end joining

Bei NHEJ werden zunächst die Enden der Chromosomen/DNA-Fragmente erkannt und anschließend als Voraussetzung zur Wiedervereinigung prozessiert: das den Strangbruch auslösende Ereignis —z. B. die Energie ionisierender Strahlung— hat die betroffenen Nukleotide in der Regel chemisch verändert. Durch das "Zurechtstutzen" der Enden gehen zwangsläufig einige Nukleotide verloren: dieser Reparaturmechanismus ist ein wesentlicher Verursacher kleiner Deletionen. Da der Großteil des menschlichen Genoms nicht kodiert, ist die Wahrscheinlichkeit, funktionelle Schäden zu erzeugen, trotzdem um vieles geringer als wenn der Bruch unrepariert bliebe.

Der zu NHEJ führende Signaltransduktionsweg wurde im Prinzip bereits bei p53 besprochen. Durch den Strangbruch werden Chromatinänderungen ausgelöst, die die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase aktivieren. In der Folge werden einige Proteine des Reparatursystems, wie XRCC4, direkt, andere, wie p53, die *checkpoint*-Kinase CHK-2 und NBS1 indirekt über die verwandten Kinasen ATM und ATR phosphoryliert. (XRCC steht für *X-ray Repair Complementing defective repair in Chinese hamster cells*; NBS für *Nijmegen breakage syndrome*.) Damit wird einerseits, wie im Abschnitt über p53 ausgeführt, die Zelle in G1 arretiert, andererseits der Reparaturapparat aktiviert. Zur "Glättung" der Enden dient ein Komplex aus den Proteinen MRE11-RAD50-NBS1, der Endo- und Exonucleaseaktivität besitzt. (Bezeichnungen für Moleküle aus Reparatursystemen stammen vielfach aus dem Hefesystem, in dem Mutanten mit auffälligen Defekten isoliert wurden, wie z. B. *radiation-sensitive-RAD* oder *Meiotic REcombination deficient- MRE*.)

Der letzte Schritt im NHEJ-Reparaturprozess wird durch eine DNA-Ligase katalysiert, die durch das Adapterprotein XRCC4 an den Ku-Komplex bindet und die Kontinuität des DNA-Strangs wieder herstellt. Auf diese Weise können die meisten Doppelstrangbrüche unter Hinterlassung einer kleinen Deletion repariert werden.

Homologe Rekombination

Es gibt jedoch Situationen, in denen *NHEJ* nicht ausreicht, DNA-Strangbrüche zu reparieren. Das stärkste Argument für diese Aussage stammt von Experimenten mit einem Protein,

RAD51, das eine zentrale Rolle im Prozess der homologen Rekombination spielt. Zellen, in denen das *NHEJ*-System intakt ist, RAD51 jedoch experimentell ausgeschaltet wurde, sind nicht mehr viabel: beim Versuch, ihre DNA zu replizieren, entstehen so viele Fehler, dass die Zellen absterben. Man schließt daraus, dass homologe Rekombination ein notwendiger "Nachbesserungsmechanismus" des DNA-Replikationssystems ist. Im Fall der DNA-Replikation treten Doppelstrangbrüche häufig im *lagging strand* kurz nach der Gabel auf; wenn die diskontinuierlichen Okazaki-Fragmente z. B. auf einen Einzelstrangbruch im Gegenstrang stoßen. Diese Situation ist günstig für homologe Rekombination, da ein identischer Strang —das gerade entstandene Schwesterchromatid— räumlich unmittelbar benachbart ist. Homologe Rekombination beruht darauf, dass sich ein überhängendes Einzelstrang-Ende des gebrochenen Doppelstrangs an einen identischen, intakten Doppelstrang anlagert und sich mit Hilfe von spezialisierten Proteinen wie RAD51 an die Stelle seiner Kopie setzt. Mit der neu gefundenen Matrize kann der gebrochene Strang nun elongiert bzw. repariert werden. Diese Form der Reparatur behebt Doppelstrangbrüche, ohne Deletionen zu generieren.

Nach einem Strangbruch in der Nähe einer Replikationsgabel beginnt der Prozess der HR mit einer Verkürzung des Strangs mit dem 5'-Phosphat-Ende durch 5'->3'-Exonukleaseaktivität des bereits erwähnten MRE11-RAD50-NBS1-Komplexes. Das 3'-Ende des anderen Strangs gewinnt damit die Bewegungsfreiheit zur sogenannten *strand-invasion*, für die es die Proteine RAD51 und RAD52, die Antionkogene BRCA (*breast cancer*)-1 und BRCA-2 sowie noch einige andere Moleküle benötigt. Das 3'-Ende des invadierenden Strangs wird nun unter fortschreitender Verdrängung des autochthonen Strangs durch eine DNA-Polymerase verlängert. Die beiden ineinander verwobenen Doppelstränge können schließlich entweder durch voneinander-Lösen oder durch Schneiden getrennt werden; die restlichen Lücken werden durch DNA-Ligase I geschlossen. Damit kann die Replikationsgabel weiterlaufen.

Verlust von BRCA1 oder -2-Funktion vermindert die Effizienz von HR-Reparatur beträchtlich. Es ist wahrscheinlich, dass bestehende Replikationsprobleme dann notdürftig mit anderen, weniger geeigneten Mechanismen behoben werden (z. B. NHEJ oder *error-prone repair*), die Mutationen oder Chromosomenveränderungen nach sich ziehen. Mit der Entwicklung eines Organismus ist das jedoch offensichtlich nicht vereinbar: *knock-out* von BRCA-1 oder BRCA-2 in Mäusen wirkt bereits im Embryonalstadium letal.

Pharmakologische Querverstrebung: Eine Strategie, Karzinome zu behandeln, bei denen die BRCA-Funktion verloren gegangen ist, besteht darin, weitere Reparaturmechanismen lahmzulegen. Wenn nicht nur homologe Rekombination nicht funktioniert, sondern auch die Ersatzreparaturmechanismen, kumulieren so viele DNA-Probleme, dass die Zelle nicht mehr lebensfähig ist. Die Substanz **Olaparib** hemmt das Enzym PARP (Poly ADP Ribose Polymerase), das hilft, DNA-Brüche an Reparatursysteme zu melden. Es kommt bei rezidivierendem Ovarialkarzinom auf Grund von BRCA-Mutationen zur Anwendung, wenn andere Formen der Chemotherapie keinen Erfolg haben.

Die Bedeutung von Defekten in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen für die Krebsentstehung zeigt sich darin, dass viele Tumoren, besonders Kolonkarzinom, Mammakarzinom, Prostatakarzinom und Pankreaskarzinom, ausgeprägte chromosomale Instabilität mit *loss of heterozygosity* auf zahlreichen Allelen zeigen. Ursache für diese Instabilität sind häufig solche Reparaturdefekte, jedoch nicht ausschließlich: Mutationen in

Genen, deren Produkte eine Rolle in Zellzyklus-Checkpoints und Chromosomen-Organisation und -Transport haben, führen zum selben Phänotyp.

Antionkogene BRCA-1 und BRCA-2

BRCA-1 und -2 sind nicht nur an homologer Rekombination, sondern auch noch an anderen Reparaturmechanismen beteiligt. Die beiden Moleküle waren schon vor dieser Erkenntnis durch ihre Rolle in der Entstehung des Mammakarzinoms entdeckt und benannt worden.

Betrachtet man die Altersverteilung der Inzidenz von Mammakarzinomen, fällt auf, dass diese nicht, wie jene vieler anderer Tumoren, einer einfachen exponentiellen Funktion entspricht. Es gibt "zu viele" früh auftretende Fälle. Diese untypische Inzidenzverteilung hat zu einer Einteilung in *early-onset* und *late-onset*-Formen von Brustkrebs geführt. Man schätzt, dass genetische Faktoren nur zu etwa 5% aller Brustkrebsfälle beitragen, jedoch zu etwa 25% der vor dem Alter von 30 Jahren auftretenden Fälle. Segregationsanalysen in gehäuft von Brustkrebs betroffenen Familien führten zur Identifikation der beiden Antionkogene BRCA1 und BRCA2, für deren Funktion man zunächst keinerlei Anhaltspunkte hatte. Analog der Situation beim erblichen Retinoblastom weisen die betroffenen Frauen in allen Körperzellen ein *loss-of-function*-Allel auf; in den entstehenden malignen Tumoren ist zusätzlich meist das zweite, gesunde Allel verloren gegangen (Verlust der Heterozygotie). So erklärt sich auch das erhöhte Risiko dieser Patientinnen, in der zweiten Brust ein weiteres Mammakarzinom zu entwickeln. Beide BRCA-1 und BRCA-2 verhalten sich also wie typische Antionkogene. Das Vorhandensein eines *loss-of-function*-Allels in Mitgliedern einer betroffenen Familie ist diagnostizierbar und stellt die Frauen vor die schwierige Entscheidung, sich einer prophylaktischen Mastektomie zu unterziehen oder anderen prophylaktischen Maßnahmen, wie Ovariectomie, Tamoxifen und engmaschigen Kontrollen zu vertrauen.

Vererbte Mutationen in BRCA1 fördern nicht nur die Entstehung des Mammakarzinoms, sondern auch des Ovarialkarzinoms. Auch Männer mit einem defekten BRCA-1-Allel haben ein etwas erhöhtes Risiko für Brustkrebs, sowie eine mäßige Erhöhung des Risikos für Prostatakarzinom, Pankreaskarzinom und Melanom. Da die Risikoerhöhung eines heterozygoten Mannes wesentlich geringer ist als jene einer heterozygoten Frau, wird nach einem Mechanismus gesucht, der diese Geschlechtsspezifität erklären könnte. Es gibt Hinweise, dass BRCA1 eine Rolle bei der Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms der Frau spielt. Neben der Beeinträchtigung der DNA-Reparatur hätte ein Verlust der BRCA1-Funktion damit —nur bei der Frau und nicht beim Mann!— die Verdoppelung der Aktivität aller X-kodierten Gene zur Folge. Es ist noch nicht klar, welche dieser Gene die Entstehung eines Mamma- oder Ovarialkarzinoms fördern. Ein weiteres Modell ergibt sich aus der neuen Erkenntnis, dass BRCA1 auch eine Rolle als E3-Ubiquitin-Ligase für den Östrogenrezeptor α hat. Fehlende ER α -Inaktivierung könnte erklären, warum der Effekt besonders Frauen betrifft und hier wieder besonders Gewebe, die Östrogen-abhängig proliferieren.

Genetische BRCA2-Defekte kommen sowohl im hetero- als auch im homozygoten Zustand vor und bringen in beiden Fällen eine erhöhtes Tumorrisiko mit sich. Heterozygot besteht ein erhöhtes Mammakarzinomrisiko sowie ein moderat erhöhtes Risiko für die Ausbildung eines Ovarialkarzinoms. Homozygote BRCA2-Defekte sind eine der möglichen Ursachen der Fanconi-Anämie.

Fanconi-Anämie ist eine rezessiv vererbte Erkrankung, die auf den Verlust der Funktion von einem aus einer Gruppe von mindestens zwölf verschiedenen Genen zurückgeführt werden kann. Die Erkrankung manifestiert sich meist im Kindesalter und beinhaltet ein variables Spektrum an Fehlbildungen, die Entwicklung einer Panzytopenie und häufig die Entwicklung einer AML oder eines Plattenepithelkarzinoms im Kopf/Hals-Bereich. Auch dieses Neoplasie-Prädispositionssyndrom ist auf genetische Instabilität zurückzuführen. Eines der zwölf die Erkrankung verursachenden Gene stellte sich als BRCA2 heraus. Dies scheint ein Widerspruch zur Situation in der Maus zu sein, die ohne BRCA2 nicht lebensfähig ist, doch haben die beide Allele betreffenden Mutationen bei Patienten mit Fanconi-Anämie die Charakteristik, dass noch ein Teil des Proteins gebildet wird. Die Expression dieses Teils könnte also für das Überleben genügen.
