

durchschnittlich im Alter von 42 Jahren diagnostiziert. Ein Patient mit einem vererbten Defekt im DNA-Reparatursystem hat rein rechnerisch ein ungefähr 116-fach höheres Risiko als ein Patient ohne Defekt, an Darmkrebs zu erkranken [74]. Dies belegt, dass die Mutationsrate die Länge des Zeitraums beeinflusst, in dem die am malignen Phänotyp ursächlich beteiligten Mutationen akkumulieren.

- Berücksichtigt man die Modelle der klonalen Expansion und der Tumorevolution, so ist das Ausmaß des Selektionsvorteils, den eine bestimmte Mutation einem Zellklon verleiht, von Bedeutung. Je größer der Selektionsvorteil, desto mehr Zellen stehen in einem gegebenen Zeitraum für die nächste Mutation und damit auch für die nächste Stufe der klonalen Expansion zur Verfügung. In einem mathematischen Modell ergab sich ein Zeitraum von 5–15 Jahren für den Übergang eines Adenoms von 10^7 Zellen in ein Karzinom, in dem 20 von 100 möglichen Genen eine Mutation erwerben. Hierbei wurde ein konstanter durchschnittlicher Selektionsvorteil von 1 % pro Mutation angenommen [5]. Dieses für kolorektale Karzinome entwickelte Modell kann nicht ohne Überprüfung auf andere Tumoren übertragen werden. Insbesondere bei der Genese frühkindlicher Leukämien unterscheiden sich die Bedeutung einzelner Mutationen und deren zeitliche Abfolge grundlegend von soliden Tumoren des Erwachsenen.

4.7 Genomische Instabilität und DNA-Reparatursysteme

Zusammenfassung



Die Stabilität des Genoms wird durch eine Reihe von Mechanismen gewährleistet. Wenn diese nicht funktionieren, ist das Risiko für Mutationen und damit für eine Tumorerkrankung erhöht. Nach Ursache und Ausmaß unterscheidet man 3 Formen der genomischen Instabilität. Chromothripsis betrifft nur ein oder wenige Chromosomen und wird wahrscheinlich durch ein singuläres fatales Ereignis verursacht. Chromosomale Instabilität äußert sich in Schäden vieler Chromosomen und in Aneuploidie. Mikrosatelliten-Instabilität zeigt sich in Veränderungen einzelner oder weniger Basen, die vor allem in repetitiven Sequenzabschnitten liegen.

4.7.1 Genomische Instabilität

Für die Entwicklung und den Erhalt des Organismus ist entscheidend, dass bei der Zellteilung die genetische Information ohne Fehler von der Mutterzelle auf die Tochterzellen übertragen wird. Von vergleichbarer Bedeutung sind Vorkehrungen, die ungerichtet Veränderungen der Erbinformation durch externe oder interne Einflüsse ausschließen oder rückgängig machen. Denn wenn ein DNA-Schaden nicht erkannt wird oder es nicht gelingt, eine Zelle mit einem identifizierten Schaden auszuschalten, wird der genetische Defekt auf die Tochterzellen übertragen. Im Verlauf des Zellzyklus einer Körperzelle gibt es Checkpoints, an denen überprüft wird, ob die vorangegangenen Prozesse ordnungsgemäß abgelaufen sind (Kap. 7.3.1). Wird ein Fehler erkannt, dann wird der Zellzyklus gestoppt, um die Reparatur der Defekte zu ermöglichen und so die Weitergabe einer fehlerhaften Information zu verhindern. Falls die Reparatur des Fehlers nicht möglich ist oder die Reparatur fehlerhaft verlief, hat die Zelle die Möglichkeit, sich selbst durch Apoptose zu eliminieren. Im Englischen werden die Reaktionen auf eine Schädigung der DNA als „DNA-Damage Response Pathways“ (DDR-Pathways) bezeichnet.

Diesen scheinbar einfachen Abläufen liegen komplexe Regulationsmechanismen zugrunde. Ein genomicscher Schaden wird durch einen Sensor erkannt. Der Sensor aktiviert seinerseits Signalwege in Richtung Reparatur, Zellzykluskontrolle und eventuell Apoptose. Durch die Signalwege werden die entsprechenden Effektorsysteme aktiviert. Im Verlauf oder nach abgeschlossener Reparatur muss wiederum durch einen Sensor deren korrektes Ergebnis überprüft werden. Vom Sensor verlaufen Signalwege in Richtung zu Effektoren, die bei korrekter Reparatur die Pause im Zellzyklus beenden bzw. bei erfolgloser oder fehlerhafter Korrektur Apoptose oder Seneszenz auslösen (► Abb. 4.27).

Durch den Defekt in einem Gen, das eine der an diesem System beteiligten Komponenten kodiert, wirkt sich der entsprechende Fehler bei jeder Zellteilung aus. Dies führt dazu, dass die Fehlerursache und die hierdurch bewirkten genetischen Veränderungen von einer auf die nächste Zellgeneration übertragen werden. Dadurch nimmt die Instabilität der genetischen Information zu.

Je nach betroffener Komponente in den Systemen zur DNA-Schadenserkennung und -reparatur kann sich der Defekt in unterschiedlicher Weise bemerkbar machen. In menschlichen Tumoren un-

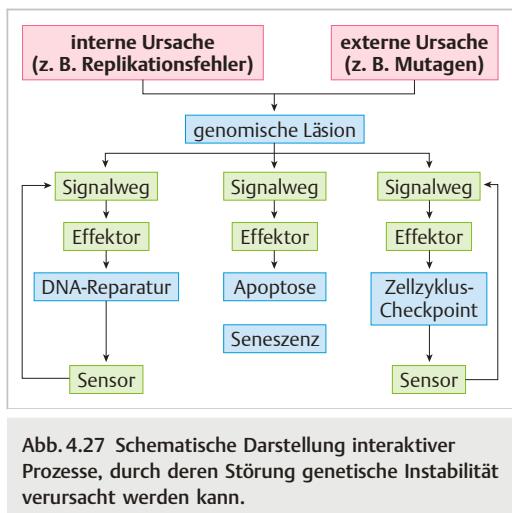


Abb. 4.27 Schematische Darstellung interaktiver Prozesse, durch deren Störung genetische Instabilität verursacht werden kann.

terscheidet man 3 Formen der genomischen Instabilität (► Abb. 4.28). Diese lassen sich in fast allen Tumortypen identifizieren.

Chromothripsis

Peter Campbell und seine Mitarbeiter detektierten durch Genomsequenzierung von Tumor-DNA und Chromosomenkartierung der sequenzierten Abschnitte hunderte chromosomal Rearrangements. Das Besondere an diesen Ergebnissen waren nicht die chromosomalen Schäden als solche und auch nicht deren hohe Anzahl, sondern die Entdeckung, dass die Schäden in manchen Tumoren nur ein oder wenige Chromosomen betrafen [70]. So viele Schäden eines oder nur weniger Chromosomen können nicht das Resultat einer stufenweisen Entwicklung sein, sondern müssen vielmehr gleichzeitig durch ein einziges katastrophales Ereignis entstanden sein. Aufgrund dieser Befunde wurde diese Form der genomischen Instabilität Chromothripsis (thriptis: altgriech. für „Zertrümmerung“) genannt. In einer weiteren breit angelegten Analyse wurde Chromothripsis in mehr als 50% der menschlichen Tumoren nachgewiesen [7]. Als mögliche Ursachen werden Fehler bei der mitotischen Chromosomensegregation, eine vorzeitig abgebrochene Apoptose oder auch massive Schäden durch ionisierende Strahlung vermutet.

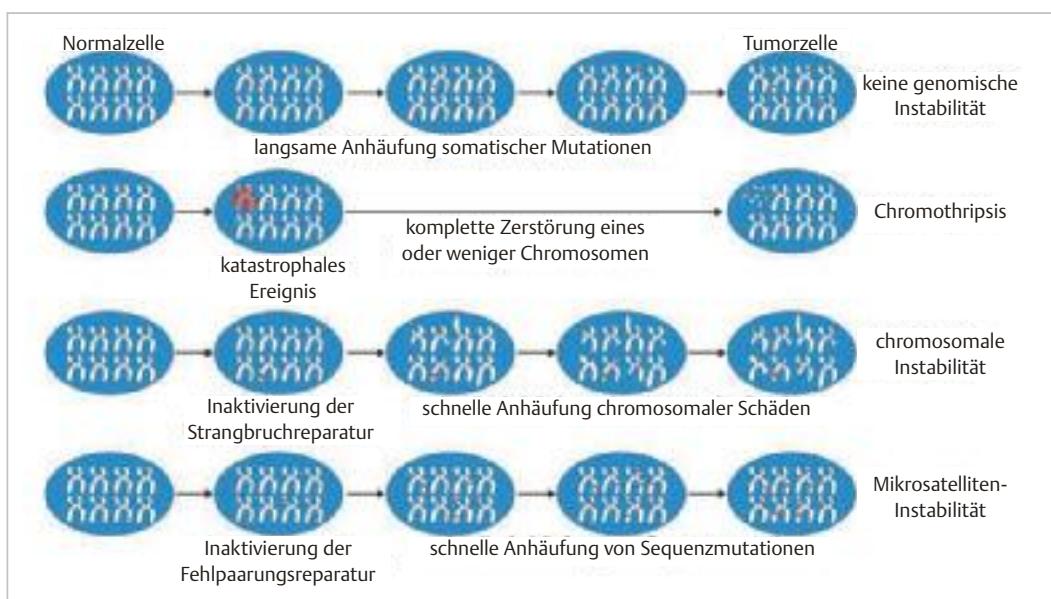


Abb. 4.28 Genomische Instabilität. Schematische Darstellung der verschiedenen Formen der genomischen Instabilität, die von einer Normalzelle ohne Mutation (links) zu einer Tumorzelle mit vielen Mutationen (rechts) bzw. mit Chromosomenschäden führen. Chromosomen (weiß) und Mutationen (rot) sind symbolisch dargestellt.

Chromosomal Instabilität

Die chromosomale Instabilität (CIN) kann sich in einer numerischen (Poly- oder Aneuploidie) oder einer strukturellen Instabilität der Chromosomen äußern. Im Gegensatz zur Chromothripsis betrifft die CIN immer mehrere Chromosomen. Wichtigste Ursachen der CIN sind inaktivierende Mutationen in Genen, die für die Reparatur von DNA-Strangbrüchen verantwortlich sind, wie z.B. im Gen *BRCA1*. Weitere Ursachen sind Fehler bei der mitotischen Segregation bzw. bei der Rekombination.

Mikrosatelliten-Instabilität

Die Mikrosatelliten-Instabilität (MIN) ist die seltenste Form der genomischen Instabilität. Ursachen der MIN sind die Inaktivierung der Gene, die einzelne DNA-Fehlpaarungen detektieren und reparieren, wie z.B. *MSH2* oder *PMS2*. Ausdruck der MIN sind häufige diskrete sequenzielle Veränderungen der DNA wie Punktmutationen sowie kleinere Deletionen und Insertionen. Die Bezeichnung Mikrosatelliten-Instabilität beruht auf dem Befund, dass diese Form der Instabilität bevorzugt repetitive Sequenzabschnitte, wie z.B. Mikrosatelliten, betrifft.

4.7.2 DNA-Reparatursysteme

In der menschlichen Zelle gibt es mehrere Systeme zur Reparatur von DNA-Schäden. Welches System zum Einsatz kommt, hängt vor allem vom zu reparierenden Schaden ab (► Tab. 4.13). Im Folgenden werden die wichtigsten DNA-Reparatursysteme beschrieben und auf Störungen der Systeme im Rahmen der menschlichen Karzinogenese hingewiesen.

Basen-Exzisionssystem

Das Basen-Exzisionssystem besteht aus einer Reihe spezifischer monofunktioneller Glycosylasen, die definierte modifizierte Basen, wie z.B. Uracil, Hypoxanthin, Formamidopyrimidin sowie 3-Methyl-Adenin und 7-Methyl-Guanin, erkennen und von der Desoxyribose abspalten. Ein gut charakterisiertes Enzym dieses Reparatursystems ist die Uracil-DNA-Glycosylase. DNA-Glycosylasen erkennen und entfernen fehlerhafte Basen, auch wenn sie nur minimale Veränderungen der Basenpaarung mit dem Gegenstrang und horizontaler Stapelung der Basen (engl. „Stacking“) bewirken. Der abasi-

Tab. 4.13 Die verschiedenen DNA-Reparatursysteme in menschlichen Zellen.

Reparatursystem	DNA-Schaden
Basen-Exzisionssystem	modifizierte Basen, Basenaddukte, Uracil
Nukleotid-Exzisions-system	große Basenaddukte, Intrastrang-Crosslinks (UV-Schäden)
Mismatch-Reparatursystem	Fehlpaarungen
homologe Rekombination	Einzel-, Doppelstrangbrüche
Non-homologous End Joining	Einzel-, Doppelstrangbrüche
Crosslink-Reparatursystem	Interstrang-Crosslinks

sche Zucker wird in einem zweiten Schritt durch sog. AP-Endonukleasen entfernt. Diese Endonukleasen sind auch für die Entfernung von Zuckern nach spontanem Verlust von Purin-Basen verantwortlich. Die Bezeichnung AP (engl. „apurinic“ oder „apyrimidic“) bezieht sich auf diese Aktivität.

Im Gegensatz zu 7-Methyl-Guanin ist O⁶-Methyl-Guanin mutagen und zytotoxisch. Da diese Base sehr häufig durch Einwirkung endogener Sauerstoffradikale entsteht, hat sich für die Entfernung dieser Läsion ein eigenständiges Reparatursystem entwickelt. Bemerkenswerterweise wurden bisher Veränderungen von Enzymen des Basen-Exzisionssystems nicht als Ursachen menschlicher Tumoren beschrieben [66].

DNA-Mismatch-Reparatursystem

Erkennung und Reparatur von Basenfehlpaarungen

Das System zur Mismatch-Reparatur (MMR) verhindert die Entstehung von Mutationen aus Basenfehlpaarungen und kleineren nicht gepaarten DNA-Schleifen (engl. „Loops“) sowie die Rekombination nicht homologer DNA-Stränge [46].

Die Mechanismen des MMR-Systems wurden zuerst im Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) und dem Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae* auf-

geklärt. Die Prinzipien des ersten Schritts, nämlich der Erkennung von Fehlpaarungen und ungepaarten Loops, sind beim Menschen ähnlich. Dagegen scheint es im weiteren Ablauf des Reparatursystems deutliche Unterschiede zwischen den Spezies zu geben. Die Bezeichnung der beteiligten Proteinkomponenten ist komplex und wird auf homologe Proteine von *E. coli* und Hefe zurückgeführt.

MMR-System in Säugerzellen

In Säugerzellen gibt es mindestens 3 Proteine, die an der primären Erkennung von Basenfehlpaarungen und kleinen ungepaarten DNA-Loops von bis zu 4 Basen beteiligt sind: Msh2, Msh3 und Msh6 (► Abb. 4.29). Die Abkürzungen leiten sich von der Bezeichnung „MutS Homolog“ ab. Zurzeit ist noch unklar, welches Signal in Säugerzellen der Hemimethylierung bei *E. coli* entspricht. Sicher binden die Proteine an eine DNA-Heteroduplex, wenn der zu reparierende DNA-Strang in Nachbarschaft der Fehlpaarung einen Schnitt aufweist. Wie und nach welchen Regeln dieser Schnitt erfolgt, ist ebenfalls noch offen.

Die 3 genannten Proteine lagern sich zu 2 verschiedenen Heterodimeren zusammen. Der als MutS α bezeichnete Komplex besteht aus Msh2 und Msh6, der als MutS β bezeichnete Komplex aus Msh2 und Msh3. Das MutS α -Dimer, das 80–90% der Gesamtmenge des zellulären Msh2 enthält, bindet bevorzugt an Basenfehlpaarungen und kurze Loops von 1–2 Nukleotiden Länge, es kann jedoch auch größere Insertionen bzw. Deletionen

erkennen, allerdings mit geringerer Affinität. MutS β erkennt Loops von 2–10 Nukleotiden, einzelne Basenfehlpaarungen werden nur schwach gebunden. Während *E. coli* nur ein *MutL*-Gen besitzt, gibt es beim Menschen mindestens 16 Gene, die MutL-ähnliche Proteine kodieren. Hierbei handelt es sich um *MLH1*, *PMS1–8* und *PMSR1–7*. Die Bezeichnung *MLH* steht für „MutLHomolog“. PMS leitet sich von einem Hefeprotein ab, das mit Mlh1 ein Heterodimer bildet (Post meiotic Segregation-increased Protein), PMSR ist schließlich die Abkürzung für PMS-related. Nach der primären Erkennung der DNA-Heteroduplex durch die MutS α - und MutS β -Komplexe lagert sich an den jeweiligen Komplex ein Heterodimer aus Mlh1 und Pms2 an (MutL α). Für den in geringer Konzentration vorkommenden Mlh1-Mlh3-Komplex wurde ebenfalls eine Beteiligung an der Mismatch-Reparatur beschrieben. Wie Rekonstitutionsexperimente ergaben, wird das MMR-System durch Antikörper gegen das DNA-Einzelstrang-bindende Protein RPA (Replication Protein A) gehemmt. RPA ist an verschiedenen DNA-Reparatursystemen beteiligt und schützt u.a. den DNA-Einzelstrang vor Abbau durch Endonukleasen. In menschlichen Zellen wurde mit der Exonuclease 1 eine Nuklease identifiziert, die für die Reparatur von Fehlpaarungen einzelner Basen und Ein-Basen-Insertionen/Deletionen erforderlich ist. Ob und wenn ja, welche weiteren Exonukleasen an der Reparatur beteiligt sind, ist noch nicht bekannt.

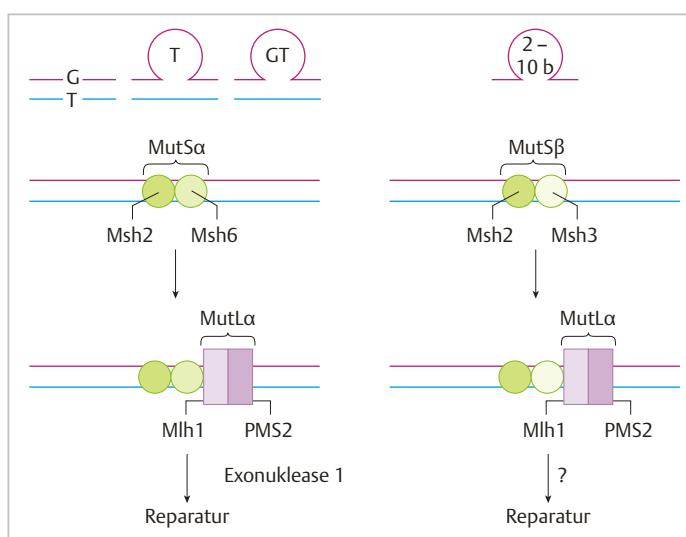


Abb. 4.29 Mismatch-Reparatursystem beim Menschen. Das Msh2/Msh6-Heterodimer (MutS α) bindet bevorzugt Fehlpaarungen einzelner Basen sowie Loops mit 1–2 Nukleotiden Länge. Loops aus 2–10 Nukleotiden werden eher vom Msh2/Msh3-Heterodimer (MutS β) gebunden. Sowohl MutS α als auch MutS β binden das Mlh1/PMS2-Heterodimer (MutL α).

Verschiedene Knock-out-Mäuse wurden hergestellt, in denen verschiedene Komponenten des MMR-Systems durch gezielte Ausschaltung der kodierenden Gene deletiert wurden. Die entsprechenden Phänotypen zeigt ▶ Tab. 4.14.

Tab. 4.14 Phänotypen von Mäusen nach gezielter homozygoter Ausschaltung von Genen des Mismatch-Reparatursystems [44].

Gen	Phänotyp
<i>Msh2</i>	verkürzte Lebensspanne, T-Zell-Lymphome, Adenome und Karzinome des Darms mit hoher MSI
<i>Msh3</i>	niedrige Inzidenz spät auftretender gastrointestinaler Tumoren mit mäßiger bis hoher MSI
<i>Msh6</i>	reduzierte Lebensspanne, gastrointestinale Tumoren, B- und T-Zell-Lymphome, keine MSI
<i>Mlh1</i>	wie <i>Msh2</i>
<i>Pms2</i>	Lymphome, Sarkome, keine Tumoren des Gastrointestinaltrakts
MSI: Mikrosatelliten-Instabilität	

Instabilität repetitiver DNA-Sequenzen

In Tumoren von Patienten mit HNPCC lassen sich durch PCR und anschließender gel- oder kapillarelektrophoretischer Analyse multiple Mutationen einfacher repetitiver DNA-Sequenzen nachweisen [4]. Diese kurzen, nicht kodierenden DNA-Sequenzmotive werden in Analogie zu Minisatelliten-DNA, die aus langen repetitiven Abschnitten besteht, als Mikrosatelliten (MS) bezeichnet. Oftmals konzentrieren sich viele Wiederholungen eines kurzen Sequenzmotivs am selben Locus. Die wiederholte Sequenz in einem MS-Abschnitt ist sehr einfach. Sie besteht aus 2–4 Nukleotiden und kann 10- bis 100-mal wiederholt auftreten, wie etwa der häufige Mikrosatellit (TAG)₂₅. Mikrosatelliten sind die häufigste Form repetitiver DNA. Die Mikrosatelliten in HNPCC-Tumoren können sowohl verlängert (expandiert) als auch verkürzt (kontrahiert) sein (▶ Abb. 4.30). Die Mutationen sind nicht auf einen Genlocus beschränkt, sondern liegen im gesamten Genom verstreut. Dieser Befund spricht dafür, dass die DNA der Tumorzellen während der Replikation eine erhöhte Mutationsrate aufweist. Die Instabilität einfacher repetitiver Sequenzen ist somit als Phänotyp eines basalen genetischen Defekts zu deuten, der auch als „Mutator-Phänotyp“ bezeichnet wird. Tumoren mit einer Instabilität von Mikrosatelliten werden als MIN⁺ gekennzeichnet.

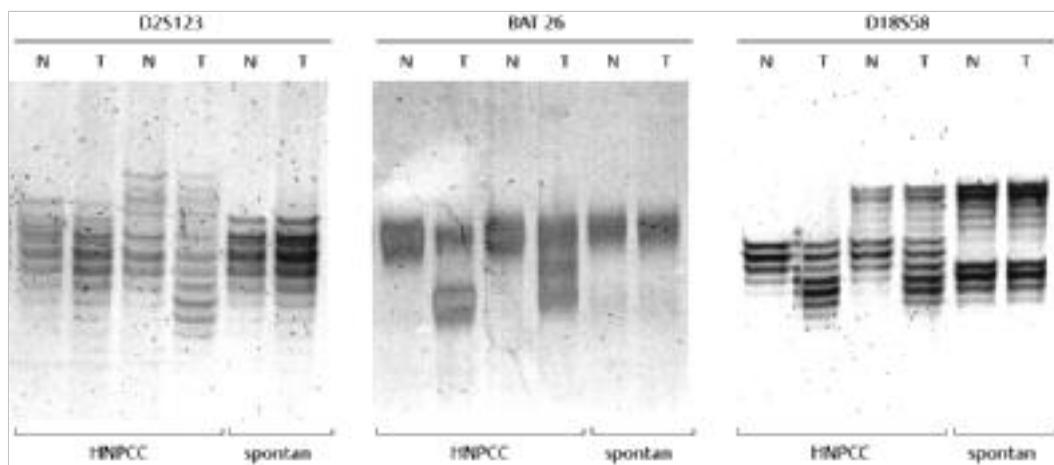


Abb. 4.30 Detektion der Mikrosatelliten-Instabilität in Tumoren von Patienten mit HNPCC mittels Elektrophorese von PCR-Fragmenten. Die Bezeichnungen über den Elektropherogrammen beziehen sich auf die mittels PCR amplifizierten Mikrosatelliten-Sequenzen (N: DNA aus Normalgewebe; T: DNA aus Tumorgewebe; HNPCC: hereditäres nicht polypöses kolorektales Karzinom).

Mutationen in MIN⁺-Tumoren

Die veränderte Länge repetitiver DNA-Sequenzen in MIN⁺-Zellen kommt wahrscheinlich dadurch zu stehen, dass sich im Verlauf der Replikation der neu synthetisierte gegen den abgelesenen DNA-Strang im Bereich von DNA-Repeats verschiebt. In einem neu gebildeten DNA-Strang, der in 5'-Richtung zurückrutscht, resultiert eine Insertion; bewegt sich der Strang in 3'-Richtung, ergibt sich eine Deletion (► Abb. 4.31). Die nicht gepaarten DNA-Basen werden normalerweise durch das MMR-System entfernt. Ist dies nicht der Fall, resultieren Expansionen und Kontraktionen der tandemartig angeordneten DNA-Repeats.

Expansionen und Kontraktionen repetitiver DNA-Sequenzen können auch durch ungleiches Crossing over oder durch ungleichen Austausch zwischen Schwesterchromatiden entstehen. Da sich diese Vorgänge bevorzugt in der ersten meiotischen Zellteilung und damit bei der Keimzellbildung abspielen, ist noch offen, welche Bedeutung dieser Mechanismus für somatische Mutationen repetitiver DNA-Sequenzen in Tumoren hat.

In MIN⁺-Tumoren können repetitive DNA-Sequenzen in kodierenden oder regulatorischen Sequenzen von Genen verändert sein. Hierdurch kommt es in der Regel zur Inaktivierung des Genprodukts. Einerseits kann es sich um Gene han-

deln, die auch in Tumoren ohne Mikrosatelliten-Instabilität inaktiviert sein können. So fanden sich beispielsweise im APC-Gen eines Patienten mit einem MIN⁺-Tumor insgesamt 6 Mutationen, wobei 3-mal ein Exon betroffen war. Im TP53-Gen wurden in 3 Exons und in einem Intron Mutationen nachgewiesen. In einem anderen MIN⁺-Tumor waren 3 Exons und 1 Intron des APC-Gens mutiert [43].

Aber auch Gene können betroffen sein, die in MIN⁻-Tumoren nicht verändert sind. In 90% der MIN⁺-Tumoren finden sich Mutationen im Gen des TGF-β-Rezeptors (TGF: Transforming Growth Factor), Typ II (*TGFRB2*-Gen) [48]. Insertionen oder Deletionen in kodierenden repetitiven DNA-Sequenzen können zu Frameshift-Mutationen führen (► Tab. 4.15). Weiterhin kann durch eine Veränderung von Mikrosatelliten die mRNA des *TGFRB2*-Gens destabilisiert werden. Durch die Mutationen wird die proliferationshemmende Wirkung von TGF-β aufgehoben.

Auch Mutationen im Gen *BAX* findet man häufig in Tumoren mit MS-Instabilität. Das Protein *BAX* ist an der Auslösung der Apoptose beteiligt. Im dritten Exon des *BAX*-Gens liegen 8 Guanin-Reste hintereinander. In mehr als 50% der Tumoren mit Mikrosatelliten-Instabilität ist diese Sequenz durch Insertion oder Deletion eines Guanin-Rests verändert, was eine Rasterverschiebung und den

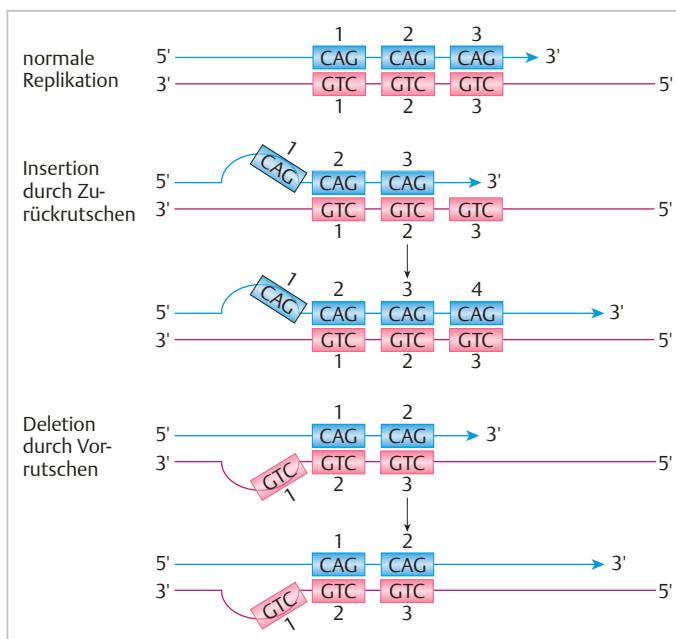


Abb. 4.31 Modell zur Entstehung von Insertionen und Deletionen in repetitiven DNA-Sequenzen durch Verschiebung des neu synthetisierten DNA-Strangs gegen den abgelesenen DNA-Strang.