

“Krebs” entsteht nicht wie manche andere Krankheiten unvermittelt und als Folge eines einmaligen Ereignisses. Der mehrstufige Vorgang der Krebsentstehung beginnt mit dem Auftreten von Fehlern in der molekularen Steuerung der betroffenen Zellsysteme - lange bevor eine Tumorerkrankung diagnostizierbar wird. Oftmals ist dabei das zelluläre Fehlverhalten auf Wechselwirkungen der Zellen mit “krebserrregenden” Umweltfaktoren zurückzuführen.

Ein Prozeß in vielen Schritten

Die Entstehung von Krebserkrankungen nach Einwirkung exogener und endogener Kanzerogene / Von Manfred F. Rajewsky

Mehr als zweihundert verschiedene, deutlich unterschiedliche Krankheitsbilder werden zur Zeit unter den Begriff “Krebs” zusammengefaßt - eine leider allzu vereinfachende Bezeichnung für das vielgestaltige Spektrum der bösartigen, *malignen* Erkrankungen. Die einzelnen Krebsarten werden in erster Linie nach den Körperzellen unterschieden, von denen die Krankheit ausgeht. Dabei nehmen über 90 Prozent aller malignen Zellneubildungen ihren Ausgang von *epithelialen* Zellen, also von denjenigen Zellschichten, die als Gewebeoberflächen in Kontakt mit der Umwelt stehen. Diese

Tumoren werden als *Karzinome* bezeichnet. Der Rest verteilt sich auf Tumoren des Knochen-, Knorpel-, Muskel- oder Bindegewebes (*Sarkome*) und Leukämien (Abb. 2). Das Entstehen maligner Tumoren in den verschiedenen Geweben und von Leukämien im blutbildenden System oder im Immunsystem nimmt seinen Ausgang von Fehlern in der molekularen Steuerung der Zellvermehrung (*Proliferation*) und -differenzierung zu spezialisierten Zelltypen, der Erkennung der “Mikro-Umgebung” durch die Zelle und damit der strengen Einhaltung ihrer Gewebeexposition.

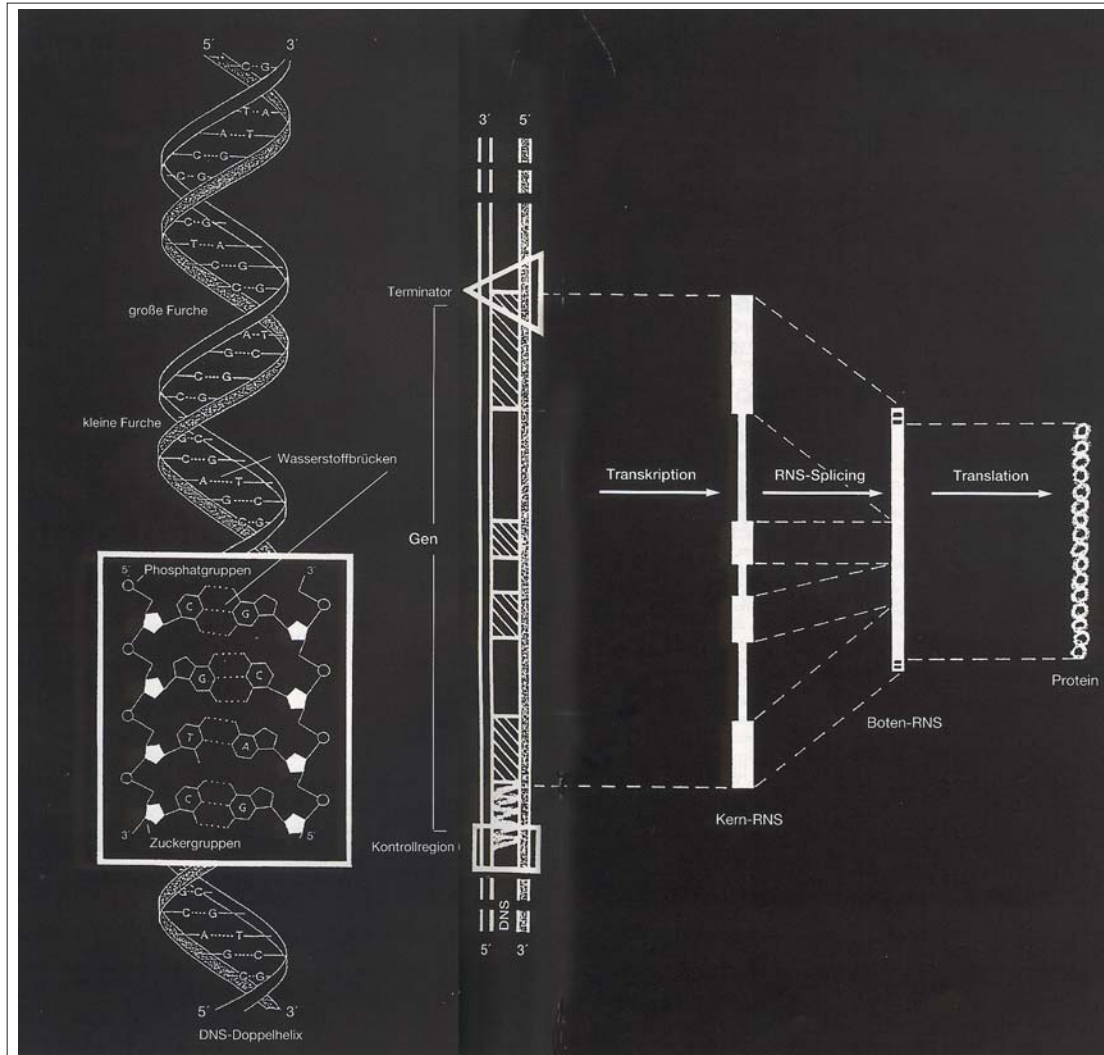
Diese Fehler führen zu einem atypischen Verhalten der Zelle im Zellverband und einer unkontrollierten Zellteilung.

Das Wachstum maligner Tumoren geht meist von einer einzelnen veränderten Zelle aus, mit dem Ergebnis einer *klonalen* Proliferation tumoriger Zellen. Diese ist verbunden mit dem unerlaubten und destruktiven Einwandern (*Invasion*) von Tumorzellen in benachbarte Gewebereiche und ihrer Ansiedlung in vom Primärtumor entfernt liegende “Organe”, der *Metastasierung*. So entwickeln sich - zunächst mikroskopisch klein

und kaum diagnostizierbar - Sekundärtumoren (*Metastasen*), die eine effektive Therapie erheblich erschweren. Lebensbedrohend an einer Tumorerkrankung ist zumeist nicht so sehr der Primärtumor, sondern vielmehr seine multiplen Metastasen. Daher ist der Therapieerfolg besonders abhängig von einer möglichst frühen Erkennung maligner Zellen, solange diese noch in geringer Zahl und zumeist an einem Ort im Organismus vorliegen. Selbst den modernsten bildgebenden Diagnostikverfahren entgehen in der Regel maligne Neubildungen in inneren Organen, wenn der Tumordurchmesser unter einem halben bis einem Zentimeter liegt. Ein Tumor enthält in diesem Stadium bereits zwischen 100 Millionen und einer Milliarde (10^8 bis 10^9) Tumorzellen, die es zu eliminieren gilt. Nicht nur die unterschiedlichen molekularen Mechanismen der Krebsentstehung, sondern auch das

(1) Ein DNS-Molekül besitzt zwei Stränge aus miteinander verbundenen Zucker- (Desoxyribose) und Phosphatgruppen; an jedem Zuckerrest hängt jeweils eine der vier Basen Guanin (G), Cytosin (C), Thymin (T), oder Adenin (A). Die Phosphatgruppe verbindet das 5'-Kohlenstoffatom des einen mit dem 3'-Kohlenstoffatom des folgenden Zuckers. Im "Inneren" der Doppelhelix (B-Form) paaren sich jeweils die Basen Thymin und Adenin (über zwei Wasserstoffbrücken) und Guanin und Cytosin (über drei Wasserstoffbrücken). Um die in der Basensequenz eines Gens - d.h. eines durch die enthaltene Information definierten Abschnitts der DNS - codierte Information weiterzugeben, wird der codierende Strang der DNS (schwarz) zunächst in die sogenannte Kern-Ribonukleinsäure (Kern-RNS) abgeschrieben (*transkribiert*), wobei der komplementäre DNS-Strang als Matrize dient. Im nachfolgenden Prozeß des *RNS-Splittings* werden die *Introns* - RNS-Abschnitte die im Gegensatz zu den *Exons* keine Informationen für den Bau von Genprodukten enthalten - aus der Kern-RNS herausgeschnitten. Im anschließenden Vorgang der Translation wird die Information dieser Boten-RNS umgesetzt: Als Genprodukte entstehen Proteine.

Die Abstände zwischen den Atomen sind nicht maßstabgetreu.
 Quellen: Spektrum der Wissenschaft (1988), Moleküle des Lebens/
 Albert: Das Bakterium *E. coli* (unpubliziertes Forum 8/22)/Kajewsky,
 Grafik: Universität GH Essen/LKM&S



Verhalten und die spezifische Erkennung maligner Zellen im Organismus bilden daher wichtige Problemstellungen der Krebsforschung und zugleich der molekularen Zellbiologie und Zellsystembiologie - besonders im Hinblick auf neue Ansätze für eine erfolgreiche Therapie.

Zusammenspiel und Interdependenz der Zellsysteme

Aus der befruchteten Eizelle des Menschen entwickelt sich durch genau abgestimmte Vermehrung von Vorläuferzellen für viele unterschiedliche Zelltypen ein komplexer Organismus, bestehend aus der kaum vorstellbaren Zahl von nahezu 100 Billionen (dies entspricht 100.000 Milliarden oder 10^{14}) Zellen. Für diese Entwicklung und zum Ausgleich ständiger Zellverluste ist im Laufe eines Lebens die noch weniger faßbare Anzahl von etwa 10 Billionen (10.000 Billionen oder 10^{16}) Zellteilungen erforderlich. Dabei entstehen reife, sogenannte *differenzierte* Zellen aus zunächst noch *pluripotenten*, später dann zur Ausprägung bestimmter Zelltypen determinierten "Stammzellen", deren Teilungsaktivität während einer fortgeschrittenen Phase des Differenzierungsprozesses erlischt. Diese Abschaltung der Proliferation ist in vielen Fällen unumkehrbar, sie kann aber auch reversibel sein - etwa bei Geweben, die nach Schädigung, also Zellverlusten, zur Regeneration befähigt sind.

Das Ensemble von Form, Struktur und Funktion bildet den *Phänotyp* der Zelle. Dieser ist innerhalb einer gewissen, zur Adaptation an wechselnde Umgebungsbedingungen erforderlichen Variationsbreite präzise festgelegt und charakteristisch für den entsprechenden Zelltyp und seine unterschiedlichen Differenzierungsstadien. Der Phänotyp der Zelle resultiert aus dem jeweiligen Muster makromolekularer Zellbausteine, vor allem dem der Proteine. Letztere sind spezifisch

Zelltyp	Häufigkeit
Karzinome, entstanden aus äußeren Epithelzellen, die in direktem Kontakt mit der Umwelt stehen (Haut, Magen-Darm-Trakt, Lunge, Cervix uteri)	56 %
Karzinome, entstanden aus inneren Epithelzellen (Brustdrüse, Prostata, Ovar, Blase, Pankreas)	36 %
Sarkome und Leukämien, entstanden aus Stützgeweben und blutbildenden Zellen	8 %

(2) Häufigkeit der Krebsentstehung aus unterschiedlichen, normalen Zelltypen.
 Quelle: J. Clemons, Statistical studies in malignant neoplasms. Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl. 174 (1964), 259 (1969), 247 (1974). Cited by J. Cairns (1978).

sche Produkte individueller Abschnitte (*Gene*) der als fadenförmige Doppelhelix wohlbekanntes Desoxyribonukleinsäure (DNS), also der in den 46 Chromosomen des menschlichen Zellkerns lokalisierten "Erbsubstanz".

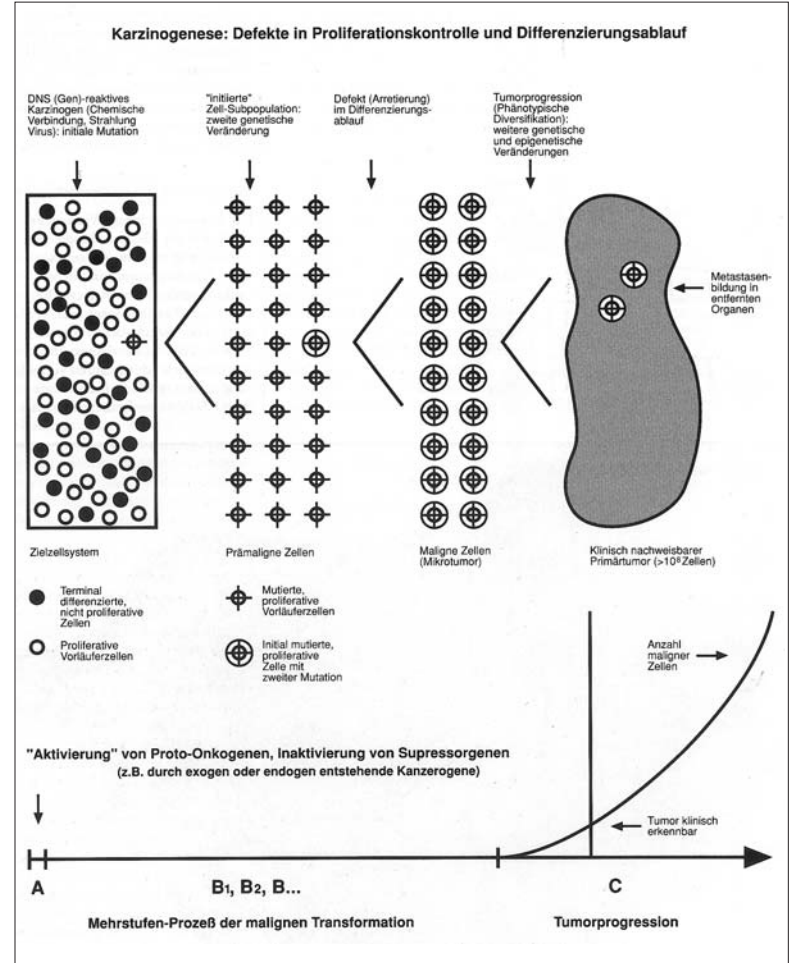
Das doppelsträngige DNS-Molekül besteht aus vier für den "genetischen Code" verantwortlichen Grundelementen, nämlich den Basen Guanin (G), Adenin (A), Cytosin (C) und Thymin (T), deren Sequenz entlang eines DNS-Stranges variiert und die über Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Strängen der DNS-Doppelhelix zu den Basenpaaren Guanin-Cytosin und Adenin-Thymin verbunden sind. Die Reihenfolge der Basen (die *Basensequenz*) bestimmt die Reihenfolge der Aminosäuren (die *Aminosäuresequenz*) im zugehörigen Protein: Zur Ablesung der Information (*Expression*) eines Gens wird zunächst die Basensequenz des Gens in einen Ribonukleinsäure-Strang umgeschrieben (*transkribiert*). Diese Boten-RNS (*mRNS*) dient als Vorlage für die Synthese eines bestimmten Proteins: Ihre Basensequenz wird in die Aminosäuresequenz des Proteins übersetzt. Die Proteine ihrerseits steuern die Vielzahl der biochemischen Reaktionen, die zusammen den Stoffwechsel einer Zelle ausmachen. Auf diese Weise *kodieren* jeweils drei der vier Basen - nach Umschreibung in die komplementäre Boten-RNS - für eine der 20 verschiedenen Aminosäuren, aus denen alle Proteinmoleküle zusammengesetzt sind (Abb. 1). Die fast zwei Meter lange DNS einer diploiden menschlichen Zelle enthält etwa 10 Milliarden (10^{10}) Basenpaare und - nach heutiger Schätzung - etwa 100.000 Gene, die in wechselnden Kombinationen entweder für spezifische Proteine kodieren (aktive Gene) oder "abgeschaltet" und damit inaktiv sind.

Nur schwer vorstellbar ist die wohlorganisierte, räumliche "Verpackung" der chromosomalen DNS im Zellkern. Vergrößerte man den

Durchmesser des Zellkerns, der etwa ein Tausendstel Zentimeter beträgt, auf einen Meter, so würde das fadenförmige DNS-Molekül eine Länge von etwa 160 Kilometern annehmen. Allein um die täglich verbrauchten roten Blutkörperchen (*Erythrozyten*) durch Vermehrung ihrer Vorläuferzellen - und der damit verbundenen identischen Verdopplung ihrer DNS - zu ersetzen, müssen mit Hilfe des Enzyms *DNS-Polymerase* etwa 400 Millionen Kilometer DNS möglichst fehlerfrei synthetisiert werden, was etwa der tausendfachen Länge der Strecke von der Erde zum Mond entsprechen würde. Die Fehlerquote bei diesem, mehrere Schritte umfassenden Synthesevorgang ist mit einer falschen Basenpaarung pro einer bis 100 Milliarden ($10^9 - 10^{11}$) replizierten Basen extrem niedrig. Hierfür sorgt neben der Präzisionsarbeit der DNS-Polymerase die Erkennung und Elimination fehlgepaarter Basen durch DNS-Reparaturproteine (*mismatch-Reparatur*).

Im Gegensatz zu autonomen einzelligen Organismen wie etwa Bakterien, deren Vermehrung im wesentlichen unkontrolliert erfolgt, "erkauft" sich die Zellen eines Säugerorganismus ihre Spezialisierung auf bestimmte Funktionen an genau definierten Orten durch einen hohen Grad an gegenseitiger Abhängigkeit und Unselbständigkeit. Dabei garantieren direkte Zell-Zell und Zell-Grenzflächen (*Matrix*-) Kontakte sowie die über lösliche "Signalmoleküle" vermittelte Kommunikation zwischen Zellen gleichen oder unterschiedlichen Typs eine präzise Steuerung des Gesamtsystems und die Erhaltung seiner Architektur.

Je komplexer eine Apparatur konzipiert und gebaut ist, umso abhängiger ist sie hinsichtlich Funktion und Lebensdauer von einer über lange Zeiträume gleichbleibenden Qualität und Funktion ihrer unterschiedlichen Bestandteile. Mit anderen Worten: Mit der Komplexität des Systems wächst sowohl die



(3) Der Prozess der Karzinogenese. A: Ein Karzinogen interagiert mit epithelialen Zielzellen. B₁, B₂, B...: Aufeinanderfolgende Schritte der Zellveränderung. Proliferative Vorläuferzellen sind durch die Interaktion mit dem Karzinogen initial mutiert und bilden eine Subpopulation von prä-malignen Zellen. Nach weiteren genetischen und epigenetischen entsteht zunächst eine kleine Subpopulation maligner

Zellen ("Mikrotumor"). C: Stadien des Tumorwachstums. Erst ab einem Durchmesser von 0,5 bis 1 cm wird ein Tumor diagnostisch erfassbar. Zu dieser Zeit sind bereits 100 Millionen bis eine Milliarde (10^8 bis 10^9) maligne Zellen entstanden. Krebskrankungen entwickeln sich in der Regel über Jahre, ohne daß sie in frühen Stadien bemerkt werden.

Quelle/Grafik: Universität GH Essen/Rajewsky/MSK&L

Fehlerwahrscheinlichkeit als auch die Vielfalt der Fehlerformen. Daher mag der Säugerorganismus in Anbetracht seiner Eigenschaften - der komplizierten, zur ordnungsgemäßen Funktion der Zelle erforderlichen molekularen Maschinerie und dem präzisen Zusammenspiel vieler verschiedener Zellsysteme - geradezu als Inbegriff einer überzüchteten "Luxusapparatur" mit extremer Störanfälligkeit erscheinen. Daß dem nicht so ist, verdanken wir dem außerordentlich hohen, im Verlauf der Evolution über Jahrmillionen erreichten Optimierungsgrad biologischer Systeme, die auch den größten "Wunderwerken" unserer modernen Technik bei weitem überlegen sind.

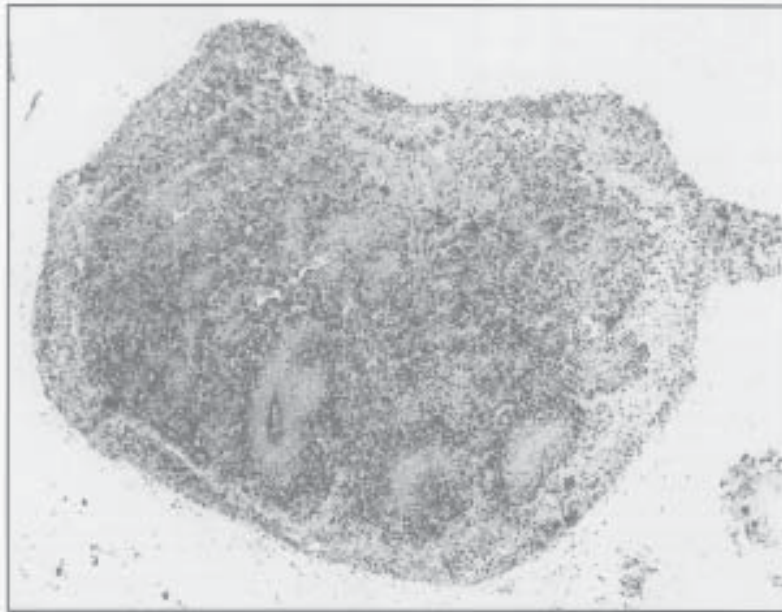
Trotzdem kann es - wenngleich mit geringer Häufigkeit - zu qualitativen und quantitativen Verände-

rungen in der Struktur und der Funktion von Zellen kommen, die dann entweder ihr Absterben, eine verminderte Leistung oder aber ein Fehlverhalten im Verband der entsprechenden Gewebe zur Folge haben. Das Ergebnis sind degenerative Vorgänge, Alterungsprozesse und bestimmte Erkrankungen.

Mechanismen der Krebsentstehung

Die Krebsentstehung (*Kanzero-genese*), d.h. die Umwandlung von normalen in maligne Zellen (*maligne Transformation*) und deren nachfolgende unkontrollierte Vermehrung (*Tumorprogression*), verläuft in der Regel über mehrere Stufen (Abb. 3). Bei diesem "Mehrschrittprozess" durchlaufen vermehrungsfähige (*proliferationskompetente*) Zellen eine Reihe von Verän-

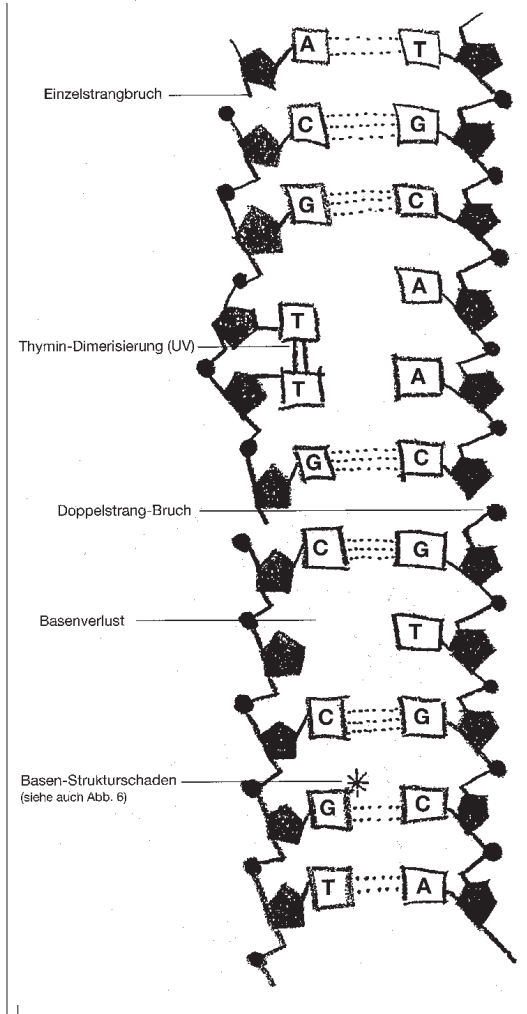
(4) Autoradiogramm (Dünnschnitt) eines primären Brustdrüsenkarzinoms (Maus). Schwarze Punkte (Silberkörner nach Entwicklung der Photoemulsion): $[^3\text{H}]$ -Thymidin-markierte, DNS-synthetisierende (d.h. proliferierende) Zellen. Deutlich sichtbar ist deren inhomogene Verteilung innerhalb des Tumorgewebes.
Foto/Quelle: Universität GH Essen/Rajewsky MF, Biophysik 3: 65-93 (1966) Springer Verlag, Heidelberg



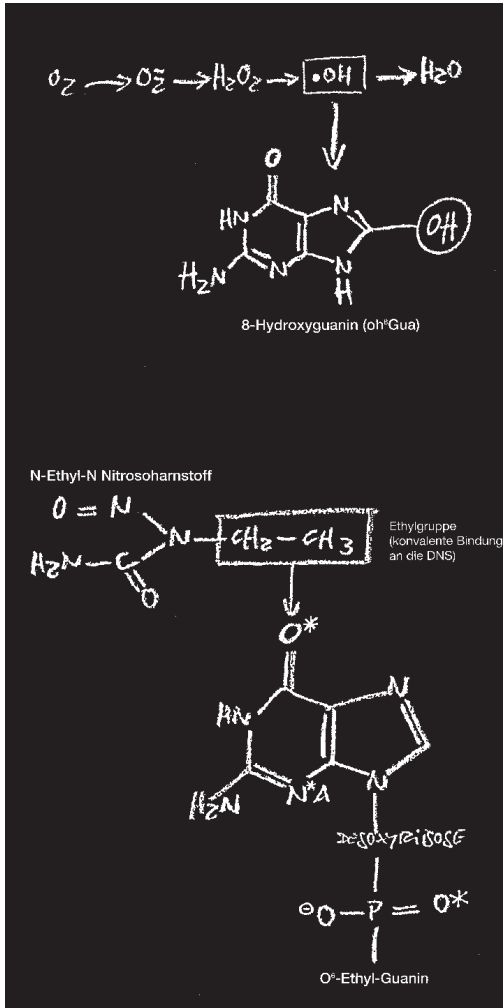
derungen, denen Modifikationen in der Struktur und Expression verschiedener Gene zugrundeliegen, und an deren Ende die Ausprägung maligner Phänotypen steht. Unglücklicherweise sind maligne Zellen besonders gekennzeichnet durch genetische Instabilität und phänotypische Heterogenität - auch innerhalb des gleichen Tumors (Abb. 4). Sie sind daher nur bedingt geeignet, um an ihnen diejenigen molekularen Veränderungen eindeutig "abzulesen", die für die maligne Transformation ihrer Ursprungszellen verantwortlich waren. Die Anzahl der einzelnen Schritte der Kanzerogenese und ihre molekularen Charakteristika, vor allem die jeweils kausal beteiligten Gene und Genprodukte, sind aus diesem Grund bisher nur bruchstückhaft bekannt; sie sind jedoch abhängig von der Art der auf die Zelle einwirkenden Faktoren: vom Typ und Differenzierungsstadium - dem *Genexpressions-Muster* - der betroffenen Zelle sowie von den Wechselwirkungen mit ihrer "Mikro-Umgebung" im Verlauf des Prozesses.

Mindestens zwei Kategorien von Genen sind heute bekannt, die bei der malignen Transformation der Zelle eine wichtige Rolle spielen: sogenannte *Proto-Onkogene* und *Suppressorgene*. *Proto-Onkogene* sind Gene, deren unkontrollierte Expression, Expression in veränderter Form oder Überexpression, beispielsweise in Folge einer Änderung der Basensequenz (*Mutation*) oder einer Vermehrung der Anzahl der Genkopien (*Gen-Amplifikation*) die maligne Transformation begünstigen. Von diesen Genen wurden bereits mehr als 40 identifiziert. Gegensinnig zu den Proto-Onkogenen begünstigt im Falle der Suppressorgene die Ausschaltung des Gens eine maligne Transformation der Zelle. Zu den Suppressorgenen können gerechnet werden:

- *Regulatorgene*, die die Expression anderer Gene kontrollieren;
- *DNS-Reparaturgene*, deren Produkte (Reparaturproteine, bzw.



(5) Einige Grundtypen der Schädigung doppelsträngiger DNS-Moleküle durch DNS-reaktive Agentien (Mutagenen, Kanzerogenen).



(6) Anhängen einer OH-Gruppe (Hydroxylierung) in der C-8 Position der DNS-Base Guanin durch Sauerstoffradikale (oben). Struktur der durch das alkylierende Kanzerogen N-Ethyl-N-Nitrososoharnstoff modifizierten DNS-Base Guanin (unten).
Grafik: Universität GH Essen/Rajewsky/LKMSS

-enzyme) in der Lage sind, DNS-Schäden zu reparieren, die unrepariert zu Genmutationen oder zur Geninaktivierung führen würden;

- Gene, deren Produkte Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakte vermitteln und damit das korrekte Verhalten der Zelle im Rahmen der Gewebearchitektur sichern und schließlich
- Gene, deren Produkte für den Empfang und den intrazellulären Transfer von proliferationshemmenden Signalen verantwortlich sind.

Äußere Einflüsse

Offenbar können unterschiedliche exogene Faktoren, aber auch spontan auftretende genetische Veränderungen, den Prozeß der Kanzerogenese durch Modifikation des Genexpressions-Musters der Zelle in "schrittspezifischer" Weise vorantreiben. Umgekehrt resultiert aus der Mehrschrittnatur der Kanzerogenese die - vorläufig nur theoretische - Möglichkeit, den Prozeß auf einer "prämaligen" Stufe anzuhalten, wenn es gelingt, die entsprechenden Zellen aufgrund spezifischer molekularer Frühveränderungen diagnostisch zu erfassen.

Faktoren, deren Einwirkung auf den Organismus zur Entstehung maligner Tumoren oder Leukämien führt - etwa chemische Verbindungen exogener und endogener Herkunft, UV-Licht, natürliche oder künstlich erzeugte ionisierende Strahlen - werden als *Kanzerogene* bezeichnet; Faktoren, die den Prozeß der Kanzerogenese in intakten Zellen zwar nicht auslösen (*initieren*), den einmal in Gang gesetzten Prozeß aber weitertreiben und beschleunigen können, nennt man auch *Promotoren*.

Der Nachweis der Kanzerogenität, wenn auch nicht in allen Fällen verbindlich für den Menschen, muß im Tierversuch geführt werden. Nur in wenigen Fällen ist eine Kanzerogenität bestimmter Faktoren beim Menschen epidemiologisch so eindeutig gezeigt, daß sie

als sicher gelten kann: etwa beim Tabakrauch, einem Gemisch aus vielen chemischen Verbindungen unterschiedlicher Art, bei Asbest, UV-Licht, Radon-222-Zerfallsprodukten und einer Reihe anderer synthetischer Verbindungen. Ein wichtiger Promotor ist auch eine über das natürliche Maß hinausgehende Zahl an Zellteilungen (*DNS-Replikationsrunden*), weil sie naturgemäß das Risiko einer bereits initiierten Zelle für weitere DNS-Veränderungen (Mutationen) erhöht. Die meisten chemischen Verbindungen sind - dosisabhängig - auch zellschädigend (*cytotoxisch*) oder zellabtötend (*cytotoxisch*). Sie können bei hierzu befähigten Zellpopulationen zur reparativen Zellproliferation führen, besonders ausgeprägt bei chronischer Einwirkung. Proliferationsfördernd können sich auch bestimmte Kanzerogen-induzierte Mutationen von Genen auswirken, die für die Zelloberflächen-Rezeptoren proliferationskontrollierender, löslicher Moleküle (*Liganden*) kodieren. Hierdurch kann das Rezeptorprotein strukturell so verändert werden, daß es dem Zellkern permanent "grünes Licht" für den Betrieb der Proliferationsmaschinerie signalisiert. In diesem Falle kann ein initiiertes Ereignis, die Kanzerogen-induzierte Mutation, gleichzeitig auch eine promovierende Wirkung haben.

Anders als Promotoren reagieren die meisten kanzerogenen chemischen Verbindungen (ebenso wie ionisierende Strahlen oder UV-Licht) mit der zellulären DNS. Dies geschieht, nachdem die nicht reaktiven Ausgangsverbindungen im Organismus entweder durch spontanen Zerfall oder durch (häufig zellspezifischen) enzymatischen Abbau (*Bioaktivierung*) in reaktive Moleküle umgewandelt wurden. Die entstehenden Strukturveränderungen der DNS können entweder die Ausprägung modifizierter Proteine mit veränderten Eigenschaften bewirken oder aber die funktionelle Inaktivierung spezifischer Gene. Im

ersten Fall handelt es sich häufig um *Punktmutationen*, um den Austausch eines bestimmten Basenpaares im DNS-Doppelstrang gegen ein anderes (beispielsweise Adenin-Thymin anstelle von Guanin-Cytosin) mit der möglichen Folge des Einbaus einer falschen Aminosäure in das entsprechende Protein. Eine solche Punktmutation kann in der DNS einer proliferationskompetenten Zelle hervorgerufen werden, die durch Reaktion mit einem Kanzerogen strukturell modifiziert wurde. Bei der nächstfolgenden DNS-Replikation bewirkt diese Modifikation (durch Irreführung der DNS-Polymerase) dann eine Fehlkodierung. Im letzteren Fall, bei der Inaktivierung von Genen, können ebenfalls Punktmutationen die Ursache sein; häufig liegt hier jedoch eine Elimination längerer Basensequenzen oder sogar ganzer Chromosomenabschnitte zugrunde (Abb. 5).

Sauerstoffradikale

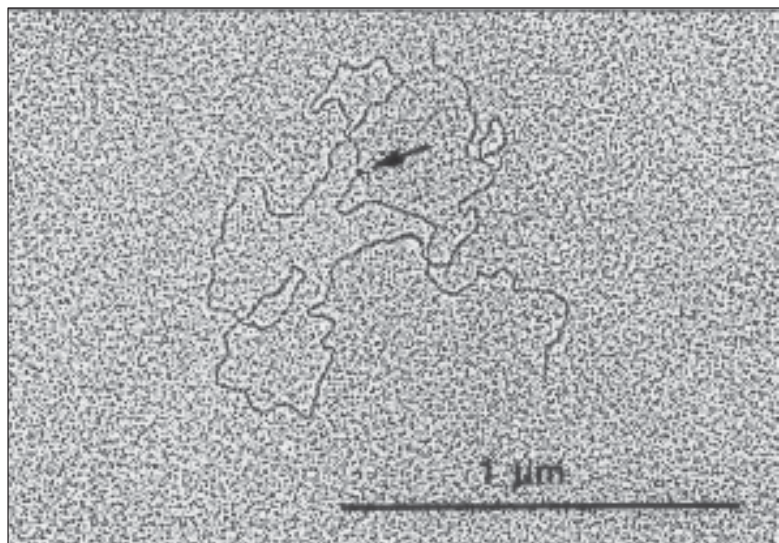
Ionisierende Strahlen bewirken Strukturmodifikationen im Genom der Zelle nicht nur durch Freisetzung energiereicher Elektronen unmittelbar im DNS-Molekül sondern vor allem auch über reaktive freie Radikale, die als Folge von Kollisionen ionisierter Wassermoleküle in der Nachbarschaft der DNS entstehen. Besonders wichtig sind dabei Sauerstoffradikale (etwa OH[•]), die - wie andere reaktive Sauerstoffmoleküle - ständig als Nebenprodukte des endogenen Stoffwechsels des Sauerstoffs entstehen und die normalerweise durch DNS-Enzyme wie die Superoxid-Dismutase oder Antioxidantien wie reduziertes Glutathion, Vitamin C und Vitamin E unschädlich gemacht werden. Hinzu kommen Stoffwechselprodukte einer Reihe chemischer Verbindungen - unter anderem auch solche, die im Tabakrauch enthalten sind. Eine Anzahl oxidativ veränderter DNS-Bausteine sind bekannt, so etwa das in das mutagene *8-Hydroxyguanin* umgewandelte

Guanin (Abb. 6), das aufgrund seiner einfachen Nachweisbarkeit auch als Indikator molekül zum Monitoring oxidativer DNS-Schäden dienen kann.

UV-Strahlung

Die UV-Strahlung der Sonne und aus künstlichen Quellen - also Photonen eines Wellenlängenbereichs von 200 - 400 Nanometern - führt im Bereich < 310 Nanometern zu einer Vielzahl verschiedener DNS-Veränderungen. Bisher wurde ein großer Teil dieser Strahlung von der stratosphärischen Ozonschicht abgefangen. Ihre Schutzfunktion läßt jedoch infolge steigender atmosphärischer Verschmutzung in jüngster Zeit zunehmend nach. Amerikanische und schwedische Wissenschaftler konnten kürzlich in menschlichen Haut-Karzinomen UV-spezifische Mutationen in einem Gen (*p53*) nachweisen, dessen Veränderungen häufig mit der entsprechenden Krebsentstehung assoziiert ist.

Die beiden häufigsten, durch UV-Strahlung bewirkten DNS-Veränderungen, sogenannte *Cyclobutan-Pyrimidindimere* und das *Pyrimidin-Pyrimidon-(6-4)-Photoprodukt*, werden an einem Tag mit durchschnittlicher Sonnenbestrahlung mit einer Frequenz von etwa 10⁶ pro Hautzelle gebildet. Beide Produkte sind mutagen und somit potentiell kanzerogen. Hautzellen sind daher mit einem äußerst effektiven enzymatischen DNS-Reparatursystem ausgestattet, um UV-modifizierte Basen sofort nach ihrer Entstehung wieder aus dem DNS-Molekül "herauszuschneiden" (*Exzisions-Reparatur*). Bei einer seltenen erblichen Erkrankung, *Xeroderma pigmentosum*, ist eines der an der Exzisions-Reparatur beteiligten Gene defekt. Entsprechend weisen Patienten mit dieser Erkrankung ein etwa 1000-fach erhöhtes Hautkrebsrisiko auf - ein Beleg für die große Bedeutung spezifischer DNS-Reparatursysteme zur Verhinderung von Mutatio-



(7) Erkennung einer Kanzerogen-induzierten Basenmodifikation (O^6 -Ethylguanin) in einem DNS-Molekül durch einen spezifischen monoklonalen Antikörper, an den ein zweiter, Ferritin-gekoppelter Antikörper gebunden ist. Der Pfeil deutet auf die Antikörper-Bindungsstelle. Das DNS-Molekül wurde mit Hilfe der Immun-Elektronenmikroskopie sichtbar gemacht.
Foto: Universität GH Essen/Nehls/Rajewsky

nen, gleichzeitig aber auch für das Risiko, das für die Zelle mit einer Funktionsminderung dieser Systeme verbunden ist.

Chemische Kanzerogene

Die bisher bekannten chemischen Kanzerogene gehören sehr unterschiedlichen Stoffklassen an und finden sich in Pilzen (beispielsweise das Pflanzengift Aflatoxin B₁, pflanzliche Pyrrolizidinalkaloide), unter den Pyrolyseprodukten vieler organischer Substanzen (etwa in stark gebratenem Fleisch), sowie unter den synthetischen Verbindungen: in erster Linie aromatische Kohlenwasserstoffe oder N-Nitroso-Verbindungen – beide auch Bestandteile des Tabakrauchs. Es ist daher nicht verwunderlich, wenn epidemiologische Daten das Rauchen, verstärkt vor allem in der Kombination mit Alkohol, neben der fettreichen Überernährung als besonders signifikante Ursachen

menschlicher Krebserkrankungen ausweisen. Dies paßt zu der Tatsache, daß der weitaus größte Anteil maligner Tumoren epithelialen Ursprungs ist (Abb. 1), da exogene kanzerogene Verbindungen, wie solche aus Tabakrauch oder Nahrung, zunächst epitheliale Zellschichten treffen und dort zu einem beträchtlichen Teil auch reagieren.

N-Nitroso-Verbindungen

Eine große und sehr gut untersuchte Gruppe meist hochwirksamer Kanzerogene sind die N-Nitroso-Verbindungen. Aufgrund ihrer Reaktivität mit der DNS sind diese Kanzerogene stets auch mutagen. So ist der als prototypische kanzerogene N-Nitroso-Verbindung besonders eingehend analysierte *N-Ethyl-N-Nitrosoharnstoff* (EtNH; Abb. 6) eines der stärksten bekannten Punktmutagene. Aufgrund ihrer zytotoxischen Wirkung, die ebenfalls auf einem primären Angriff an

der DNS basiert, finden eine Reihe von N-Nitroso-Verbindungen auch in der Krebstherapie Verwendung.

Im Gegensatz zu anderen kanzerogenen N-Nitroso-Verbindungen (wie Nitrosaminen) bedarf das Nitrosamid EtNH einer Bioaktivierung durch zelluläre Enzyme nicht, sondern es zerfällt im Gewebe spontan. Dabei wird ein hochreaktives elektrophiles Ethyldiazonium-Ion freigesetzt, das mit nukleophilen Atomen in der zellulären DNS reagiert, was zur kovalenten Bindung von Ethylresten an diese Atome führt. Nach Applikation einer Einzeldosis von EtNH ist diese Reaktion *in vivo* schon nach weniger als einer Stunde abgeschlossen (*Kanzerogen-Puls*). Bereits eine einzige Applikation von EtNH führt etwa bei der Ratte zur Entstehung maligner Tumoren, so daß hier der Ablauf des Mehrstufen-Prozesses der Kanzerogenese ohne störende Überlagerung durch weitere "Initialereignisse" analysierbar wird.

"Fingerabdrücke" im Genom der Zelle

Am Modell von EtNH und anderer N-Nitroso-Verbindungen mit unterschiedlich großen Alkylgruppen sind die spezifischen Reaktionsprodukte von N-Nitroso-Kanzerogenen mit der zellulären DNS inzwischen vollständig charakterisiert worden. Auch die Analyse der DNS-Sequenzabhängigkeit der Entstehung spezifischer Alkylierungsprodukte, ihrer Mutagenität sowie der Fähigkeit unterschiedlicher - auch maligner - Zellen zu ihrer selektiven Reparatur durch verschiedene DNS-Reparaturproteine ist - verglichen mit dem Stand der Forschung bei anderen Klassen chemischer Kanzerogene - bereits weit vorangetrieben worden. Hierzu, sowie zur kritischen Bedeutung prämutagener DNS-Alkylierungsprodukte (vor allem des O^6 -Alkylguanins, Abb. 6) und ihrer unterschiedlich effizienten enzymatischen Reparatur für das zelluläre

Transformationsrisiko, hat die Arbeitsgruppe I des Instituts für Zellbiologie (Tumorforschung), IFZ, am Universitätsklinikum Essen wichtige Beiträge geleistet.

So wurde in Zusammenarbeit mit der Laboreinheit "Monoklonale Antikörper" in den Henry-S.-Kaplan-Laboratorien des IFZ eine Kollektion hochaffiner monoklonaler Antikörper (MAK) aufgebaut, die gegen spezifische DNS-Alkylierungsprodukte gerichtet sind. Eine ultrasensitive Immunanalytik unter Verwendung dieser MAK ermöglicht den Nachweis auch geringster Mengen eines Alkylierungsprodukts - bis zu wenigen Molekülen pro diploidem Genom. Dabei können quantitative Messungen durchgeführt werden an:

- DNS aus Geweben oder Zellkulturen,
- an Einzelzellen (über fluoreszenzmarkierte MAK) oder
- an DNS-Sequenzen bekannter Gene - über Immun-Elektronenmikroskopie (Abb. 7) oder durch MAK-Bindung an DNS-Alkylierungsprodukte in definierten Gensequenzen und nachfolgende Amplifikation der MAK-gebundenen DNS-Fragmente mit Hilfe der *Polymerase-Kettenreaktion* (PCR).

Diese Analytik eröffnet nicht nur die Möglichkeit, die "Fingerabdrücke" bestimmter Kanzerogene im Genom einzelner Zellen zu erkennen (*molekulargenetische Epidemiologie*), sondern erlaubt auch die Messung der Kapazität verschiedener Typen von Zellen zur Reparatur spezifischer Kanzerogen-DNS-Addukte. Solche Messungen geben Auskunft über genetische Unterschiede einzelner Individuen hinsichtlich der Expression definierter DNS-Reparaturgene und besonders hinsichtlich möglicher DNS-Reparaturdefekte, die für ein erhöhtes Risiko der Krebsentstehung prädisponieren. Die gleiche Analytik wird im onkologischen Bereich verwendet, und zwar zur Quantifizierung definierter Alkylierungsprodukte in der DNS maligner Zellen bei der The-

rapie mit alkylierenden zytotoxischen Agentien (*Therapie-Monitoring*) und zur prätherapeutischen Messung der DNS-Reparaturkapazität von Tumorzellen (*reparaturbedingte Therapieresistenz*) als Hilfe bei der Auswahl geeigneter Therapeutika.

Der Prozeß der malignen Transformation

Das experimentelle System der *Puls-Kanzerogenese* durch N-Nitroso-Verbindungen erlaubt es bei entsprechender Wahl der Versuchsbedingungen Informationen über initiale und nachfolgende genetische (und epigenetische) Veränderungen im Verlauf des Prozesses der malignen Transformation unterschiedlicher Zelltypen zu gewinnen. Bisher wurden solche Untersuchungen an zwei Modellen durchgeführt.

Im ersten Modell wurde die Beobachtung genutzt, daß bei zwei Tage alten weiblichen Ratten eine Einzeldosis des Nitrosamids *N-Me-thyl-N-Nitrosoharnstoff* (MeNH) nach einer Latenzzeit von etwa vier Monaten zur Entwicklung von Brustdrüsenkarzinomen führt, also zu malignen Tumoren, die von epithelialen Brustdrüsenzellen ausgehen. In diesem System wurden bereits wenige Wochen nach dem Kanzerogen-Puls in der DNS aus 11 von 70 Brustdrüsen ein "aktiviertes" (mutiertes) *H-ras*- bzw. *K-ras*-Gen nachgewiesen. Dagegen enthielt keine der aus 39 Brustdrüsen unbehandelter Kontrollratten isolierten DNS diese mutierten Gene.

Zu diesem Zeitpunkt hat die Brustdrüse der Ratte einen Durchmesser von 1 - 2 mm und enthält $1 - 5 \times 10^4$ epitheliale Zellen, von denen jedoch nur etwa 50 - 100 Zellen proliferationskompetente Vorläuferzellen für die ausgereifte Brustdrüse sind. Da auch in der Mehrzahl der MeNH-induzierten Brustdrüsenkarzinome aktivierte *ras*-Gene nachweisbar waren, kann man annehmen, daß die Mutation des

ras-Gens bei epithelialen Vorläuferzellen der Rattenbrustdrüse häufig die initiale genetische Veränderung im Prozeß der MeNH-induzierten Kanzerogenese darstellt. Die nach der initialen Mutation des *ras*-Gens zur Ausprägung maligner Phänotypen notwendigen Sekundärveränderungen sind im Detail nicht geklärt. Jedoch erfolgt eine endgültige maligne Transformation erst und nur dann, wenn die mutanten Zellen die Östrogen-abhängige Reifung (Stimulation der Zellproliferation) der Brustdrüse (im Alter von 1 - 2 Monaten) durchlaufen. Wird die Östrogenzufuhr durch Ovariektomie oder durch das Antioestrogen Tamoxifen unterbunden, so kommt es nicht zur Tumorentstehung. Eine initiale Mutation des *ras*-Gens allein genügt also nicht.

Das zweite Modell macht sich den Befund zunutze, daß eine Einzeldosis des Nitrosamids EtNH bei der Ratte zur Entstehung eines Spektrums verschiedener maligner Tumoren im zentralen Nervensystem (ZNS: Gehirn, Rückenmark) und im peripheren Nervensystem (PNS) führt. Dabei sind die Tumorausbeute und die relativen Anteile von Tumoren des ZNS und PNS abhängig vom Entwicklungsstadium des Nervensystems zum Zeitpunkt der Kanzerogen-Exposition; die maximale kanzerogene Wirkung stellt sich ein, wenn das Kanzerogen während der späten Pränatal- bis frühen Postnatalperiode appliziert wird. Dieses Modellsystem wird von der Arbeitsgruppe II des IFZ verwendet, um kritische Schritte der zelltypspezifischen Kanzerogenese zu klären. Nach einem EtNH-Puls am Postnataltag 1 und einer Tumorinduktionszeit von etwa 180 Tagen findet sich eine Punktmutation in der Transmembranregion des *neu*-(*erbB-2*)-Gens - eines Gens, das für ein rezeptorähnliches Zelloberflächenprotein vom Typ des *epithelial growth factor* (EGF)-Rezeptors kodiert - in den Zellen aller induzierten Tumoren des PNS (maligne Nervenschweidnetumoren; *Schwannome*). Diese Mutation fehlt

dagegen in allen analysierten ZNS-Tumoren der gleichen Tiergruppe.

Bei diesem Versuchsansatz wird das "Entwicklungsfenster" für den Kanzerogen-Puls so gewählt, daß der Hauptanteil der PNS-Tumoren Schwannome des *N. trigeminus* sind. Das Vorkommen *neu*-Gen-mutanter Zellen konnte daher mit Hilfe hochempfindlicher Methoden (mutantenspezifische Restriktionsfragment-Längenanalyse und asymmetrische PCR) innerhalb eines kleinen intrakranialen Abschnitts des *N. trigeminus* in Richtung des Kanzerogen-Pulses zeitlich zurückverfolgt werden. Am Postnataltag 1 enthält dieser Abschnitt des *N. trigeminus* - neben dem Nervenstrang - eine nahezu reine Population von etwa 10^6 zumeist proliferativen Schwann-Vorläuferzellen. Schwann-Zellen des PNS sind das Äquivalent der Gliazellen des ZNS. Die Ausreifung des *N. trigeminus* ist etwa am Postnataltag 30 abgeschlossen.

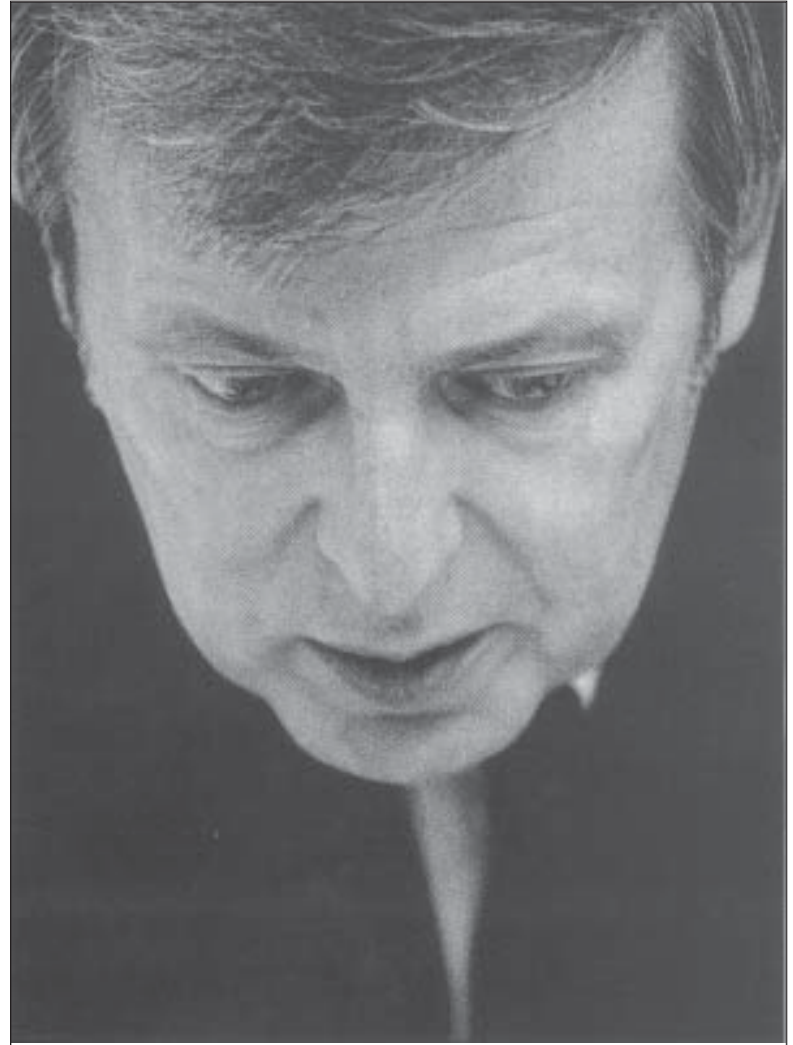
Die Analysen zeigten, daß *neu*-Gen-mutante Schwann-Vorläuferzellen im untersuchten Abschnitt des *N. trigeminus* bereits 7 Tage nach dem EtNH-Puls nachzuweisen sind. Ihre initiale Zahl wurde zu $10^4 - 100$ von 10^6 Zellen abgeschätzt. Diese kleine Ausgangspopulation *neu*-Gen-mutanter Zellen besitzt gegenüber den umgebenden *Wildtyp*-Zellen einen ausgeprägten proliferativen Vorteil. Im Gegensatz zu den *Wildtyp*-Zellen stellen die mutanten Zellen ihre proliferative Aktivität zum Zeitpunkt der Ausreifung des *N. trigeminus* nicht ein. Sie haben zu dieser Zeit bereits eine Zellzahl von etwa 10^8 erreicht und stellen aufgrund ihrer unkontrollierten Proliferation eine Zellsubpopulation mit erhöhtem Risiko für das Auftreten weiterer Veränderungen (beispielsweise Mutationen) dar, die schließlich zur Ausprägung maligner Phänotypen führen (Abb. 3). Auch für dieses System, bei dem kaum Zweifel daran bestehen, daß die Mutation des *neu*-Gens das initiale Ereignis im Prozeß der malignen Transformation von

Schwann-Vorläuferzellen durch EtNH darstellt, bleiben die molekularen Details der nachfolgenden Schritte zu klären. Jedoch sind die *neu*-Gen-mutanten Zellen der malignen Schwannome in nahezu allen geprüften Fällen für das mutante Gen *homozygot*. Sie müssen also zu einem noch unbekanntem Zeitpunkt auf dem Wege zur malignen Transformation das intakte *Allel* verloren haben. Dieser Verlust der *Heterozygotie* könnte ein kritisches Zweitereignis im Prozeß der Entstehung maligner Schwannome darstellen.

Die experimentellen Ergebnisse der jüngsten Zeit zeigen einerseits, wie sehr die Bemühungen um ein Verständnis der molekularen Grundlagen aller Aspekte der Krebsentstehung noch am Anfang stehen. Andererseits belegen sie aber auch die großen Möglichkeiten und Hoffnungen, die sich aus der raschen Entwicklung der Molekulargenetik und Zellbiologie für die Krebsforschung und klinische Onkologie der kommenden Jahre ergeben.

Summary

The term "cancer" describes a broad spectrum of pathological alterations (*malignant disorders*) the common denominator of which is the uncontrolled multiplication (*proliferation*) of transformed cells whose atypical, often destructive behavior subverts the highly ordered structures of organs and tissues. More than 90% of cancers are solid tumors (*carcinomas*) originating from epithelial cells; other forms of cancer are tumors derived from mesenchymal cells (*sarcomas*) or from the *hemopoietic* (blood-forming) system (*leukemias*, fig. 2). With present diagnostic methodology, most malignant tumors remain undetectable before they have grown to a cell number of $10^8 - 10^9$. Subsets of variant cells arising during tumor development cause



Prof. Dr. med. Manfred F. Rajewsky, Gründungsdirektor des Essener Instituts für Zellbiologie (Tumorforschung), IFZ.

increasing genetic and phenotypic diversity within the tumor cell population (fig. 4), and cells resistant towards therapeutic anti-cancer agents are favored by selective pressure. Moreover, spread of malignant cells (via blood or lymph vessels) frequently occurs from the primary tumor to multiple sites in distant organs (*metastasis*). Both metastasis and drug resistance represent major obstacles to successful therapy. In either case more sensitive methods for the early detection of malignant (and pre-malignant) cells would be beneficial.

Embryonal and postnatal development, and the proliferative activity, maturation, and expression of specialized functions of different types of cells, and the maintenance of tissue architecture, all require delicately balanced, interactive networks of controls at the level of molecules, individual cells, and cell systems. The pathway of cell differentiation - from the pluripotent "stem cell", via proliferative precursor states (with the commitment to a distinct cell lineage), to the ultimate mature type of cell - is controlled and directed by the information encoded in specific base sequences (*genes*) of the cell's chromosomal (*genomic*) DNA. Diploid cells contain two copies (*alleles*) of each of an estimated 50,000 - 100,000 genes. Transcriptionally active genes, in different combinations, are translated into distinct protein molecules, thus specifying a given cell type and its phenotypic changes in the course of differentiation. To ensure the genetic identity of dividing cells, about 10^{12} bases arranged along the DNA molecule in defined sequence must be replicated precisely, i. e. with an error frequency low enough to be handled by corrective mechanisms. Moreover, genomic DNA is monitored by a multi-membered set of proteins (*enzymes*) designed for the recognition and repair of specific forms of damage caused by endogenously produced or exogenous DNA-reactive agents.

Carcinogenesis, i. e. the process culminating in the appearance of clonally proliferating (*tumorigenic*) malignant cells, is associated with defective molecular controls of cell proliferation and phenotypic expression (*differentiation*) and involves multiple and synergistic genetic and epigenetic alterations (up to seven "steps", according to current estimates, fig. 3). Both the cumulative nature of the process and the generally extended "latency period" are in agreement with the observation that cancer is predominantly a disease of older age. Available evidence indicates that carcinogenesis is usually initiated in proliferation-competent cells, e. g. in immature precursor cells rather than in terminally differentiated cells whose replication machinery has been switched off. At the onset of the process, subsets of cells often exhibit excessive proliferative activity, indicative of defective control of proliferation and/or aberrant (or blocked) differentiation. The resulting amplified populations of proliferative cells bear an increased risk of undergoing further alterations required for the expression of fully malignant phenotypes. While the initial and probably important further steps in carcinogenesis appear to be due to genetic alterations, epigenetic mechanisms driven by "promoting" agents not directly interacting with DNA must not be neglected. Genes whose inappropriate expression (*proto-oncogenes*) or inactivation (*suppressor genes*) is associated with critical steps of carcinogenesis in specific types of cells, and the physiological role of these genes in the control of proliferation and differentiation, are currently the subject of intensive investigations. More than 40 proto-oncogenes, several suppressor genes, and a number of genes encoding *transcription factors* (proteins) involved in the positive or negative regulation of gene expression, have thus far been characterized, and the list of transformation-associated genes is growing steadily.

Structural alterations of genomic DNA (fig. 5, 6, 8) can be of various kinds and may either inactivate genes or affect gene expression in different ways. Thus, point mutations (single base changes) may "activate" the transforming potential of proto-oncogenes (through the production of altered forms of proteins), and gene rearrangements, translocations or amplification may lead to inappropriate gene expression, whereas deletion of extended DNA sequences or gross chromosomal damage usually results in gene inactivation (as required in the case of suppressor genes). Genetic defects may be transmitted through the germ-line, thus potentially predisposing individuals to various diseases including cancer. While the overall importance for carcinogenesis of spontaneously occurring mutations and other genetic alterations is difficult to assess, it is likely that a considerable contribution also comes from endogenous (e. g. *oxygen radicals*, *N-nitroso compounds*) and exogenous (environmental) DNA-reactive agents (chemicals, ionizing radiation, UV-light). Many exogenous agents with known carcinogenic activity in laboratory animals, and in some cases in man (e. g. components of tobacco smoke, asbestos), are "bio-activated" by cellular enzymes or decompose spontaneously, yielding DNA-reactive derivatives.

DNA reaction products have been identified and structurally clarified for a number of potent chemical carcinogens; notably for the large class of N-nitroso compounds (fig. 7). Ultrastructural immunanalytical methods using monoclonal antibodies have been developed for the low-level detection of specific carcinogen-DNA adducts. These can now be quantified even in single cells or in individual genes by combining immunanalysis with image intensification or with the polymerase chain reaction, respectively. It has thus become possible (i) to analyze cells or isolated DNA molecules for the

"finger prints" of specific carcinogens of DNA-reactive anti-cancer agents (*molecular epidemiology and disimetry*), and (ii) to measure the capacity for the enzymatic repair of specific DNA lesions in different types of cells (including malignant cells), and to determine cell-cell and inter-individual variations regarding the expression of specific genes involved in DNA repair. These analyses will be important for two reasons: (i) the capacity of cells to remove carcinogen-induced, potentially mutagenic lesions from DNA is inversely correlated with their risk of malignant conversion (and genetically defective DNA repair thus predisposes to cancer) and (ii) the relative capacity of the cells of (and within) individual tumors to repair specific cytotoxic DNA lesions may critically influence their drug resistance and hence the choice of DNA-reactive agent.

Der Autor:

Nach seiner Promotion zum Dr. med. an der Universität Freiburg i. Br. (1960) arbeitete Manfred F. Rajewsky zunächst an den Max-Planck-Instituten für Biophysik (Frankfurt a. M.) und Virusforschung (Tübingen), am Institute of Cancer Research (London) und an der Stanford Universität, Kalifornien. Im Jahre 1971 habilitierte er sich an der Universität Tübingen, wurde dort 1974 außerplanmäßiger Professor und erhielt 1975 den Ruf zum ordentlichen Professor an die Medizinische Fakultät der Universität - Gesamthochschule - Essen, wo er die Leitung des neugegründeten Instituts für Zellbiologie (Tumorforschung), IFZ, übernahm. Seine Arbeitsgebiete, zu denen er über 170 Veröffentlichungen vorgelegt hat, sind molekulare und zelluläre Mechanismen der Krebsentstehung, DNS-Reparaturprozesse sowie experimentelle Grundlagen der Krebsdiagnostik und -therapie. Neben seiner Tätigkeit in Essen war M. F. Rajewsky 1983 Visiting Professor an der Harvard Universität, Boston, und 1986 am Institute of Cell Biology der Academia Sinica in Shanghai, China. Er ist unter anderem Mitglied der European Molecular Biology Organization, korrespondierendes Mitglied der American Association for Cancer Research und Ehrenmitglied der Japanese Cancer Association.

Von 1980 bis 1983 war M. F. Rajewsky Gründungsvorsitzender der Abteilung Experimentelle Krebsforschung (AEK) der Deutschen Krebsgesellschaft, von 1982 bis 1987 Sprecher des DFG-geführten Sonderforschungsbereichs "Experimentelle und klinische Leukämie- und Tumorforschung" an der Universität GH Essen und von 1985 bis 1991 Koordinator des DFG-Schwerpunktprogramms "Molekulare und klassische Tumortypogenetik". Von 1983 bis 1991 hatte er den Vorsitz der Senatskommission für Krebsforschung der DFG inne; von 1987 bis 1990 leitete er das Programm-Komitee "Grundlagenforschung" für den erstmals nach Deutschland vergebenen 15. Internationalen Krebskongress (Hamburg 1990), und war von 1988 bis 1991 Vorsitzender des Research Branch der European Organization for Research and Treatment of Cancer. Prof. Rajewsky gehört den Herausgebergruppen verschiedener nationaler und internationaler wissenschaftlicher Zeitschriften an. Nach anderen Wissenschaftspreisen in den vorausgegangenen Jahren erhielt er 1989 den Deutschen Krebspreis (Grundlagenforschung).

Anmerkungen:

^{*) 1. Allel:} Die gleiche Form, oder unterschiedliche Formen eines bestimmten Gens an selben Gen-Locus zweier homologer Chromosomen. 2. *Homozgotie:* Ein Paar identischer Allele eines bestimmten Gens. 3. *Heterozgotie:* Ein Paar verschiedener Allele eines bestimmten Gens (z.B. entstanden durch Mutation eines der beiden Allele).

Literatur:

Adamkiewicz J, Drosdzioł W, Eberhardt W, Langenbrun U, Rajewsky MF (1982) High-Affinity Monoclonal Antibodies Specific for DNA Components Structurally Modified by Alkylating Agents. In: Bridges BA, Butterworth BE, Weinstein IB (Eds.): Indicators of Genotoxic Exposure. BANBURY REPORT 13, pp. 265-276; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1990) Molekularbiologie der Zelle (2., Auflage); VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim

Bourne HR (1991) Suppression with a Difference. NATURE (Lond.) 353: 696-698

Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, Halperin AJ, Pontén J; (1991) A Role for Sunlight in Skin Cancer: UV-Induced p53 Mutation in Squamous Cell Carcinoma. PROC NATL ACAD SCI USA 88: 10124-10128

Cairns J (1978) Cancer: Science and Society; W. H. Freeman, San Francisco

Cooper CS, Grover PL (Eds.) (1990) Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis (Volumes I and II); Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

Cox PM, Goding CR (1991) Transcription and Cancer. BRIT J CANCER 63: 651-662

Foulds L (1975) Neoplastic Development (Volumes I and II); Academic Press, New York

Friedberg EC (1985) DNA Repair; W. H. Freeman, New York

Harris CC (1991) Chemical and Physical Carcinogenesis: Advances and Perspectives for the 1990s. CANCER RES (Suppl.) 51: 5023s-5044s

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC (1991) p53 Mutations in Human Cancers. SCIENCE (Wash.) 253: 49-53

Loeb LA (1991) Mutator Phenotype May Be Required for Multistage Carcinogenesis. CANCER RES 51: 3075-3079

Nikitin AYU, Ballering LAP, Lyons J, Rajewsky MF (1991) Early Mutation of the *new (erbB-2)* Gene During Ethylnitrosourea-Induced Oncogenesis in the Rat Schwann Cell Lineage. PROC NATL ACAD SCI USA 88: 9939-9943

Pienta KJ, Partin AW, Coffey DS (1989) Cancer as a Disease of DNA Organization and Dynamic Cell Structure. CANCER RES 49: 2525-2532

Priest HC (1986) Fundamentals of Oncology; Marcel Dekker, New York, Basel

Ponder BAJ (1991) Genetic Predisposition to Cancer. BRIT J CANCER 64: 203-204

Rajewsky MF (1989) Formation, Distribution, and Enzymatic Repair of Specific Carcinogen Adducts in Genomic DNA: Relevance for Malignant Transformation. In: Fortner JG, Rhoads JE (Eds.): Accomplishments in Cancer Research 1988, pp. 273-283; J. B. Lippincott, Philadelphia

Rajewsky MF (for the Scientific Advisory Board of the European Organization for Research and Treatment of Cancer) (1991) Towards Improved Cancer Diagnosis and Treatment Founded on Current Developments in the Basic Sciences: Options for Intensified European Efforts. EUROP J CANCER 27: 936-939

Rajewsky MF, Auegnicht LH, Biessman H, Guth R, Hücker DF, Lauerum OD, Lomakina LYa (1977) Nervous System-specific Carcinogenesis by Ethylnitrosourea in the Rat: Molecular and Cellular Aspects. In: Hiatt HH, Watson JD, Winsten JA (Eds.): Origin of Human Cancer, pp. 709-726; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Starbuck E (1990) Human Tumor Suppressor Genes. ANNU REV GENET 24: 615-657

Thomae J, Huh N, Nehls P, Eberle G, Rajewsky MF (1990) Repair of O'-Ethylnitrosourea in DNA Protects Rat 208F Cells from Tumorigenic Conversion by N-ethyl-N-nitrosourea. PROC NATL ACAD SCI USA 87: 9883-9887

Weinstein IB (1991) Cancer Prevention: Recent Progress and Future Opportunities. CANCER RES (Suppl.) 51: 5080s-5085s

Von der Krebsforschung wird in besonderem Maße erwartet, daß neue Erkenntnisse unmittelbar und weltweit zur Diskussion gestellt und rasch in die klinische Diagnostik und Therapie umgesetzt werden. Der Austausch von Informationen und aktuellen Ergebnissen auf internationaler Ebene ist daher zunehmend zu einem entscheidenden Element der Forschungsorganisation geworden.

Zu den Ländern mit einer langen Tradition in der Krebsforschung gehört auch Japan, das nach dem zweiten Weltkrieg neben den USA und einigen europäischen Staaten auch auf diesem Gebiet in eine führende Rolle hineingewachsen ist. Wengleich der Austausch zwischen Japan und Deutschland in den biomedizinischen Wissenschaften früher sehr intensiv war, so verlagerte sich nach Kriegsende das Schwergewicht drastisch zugunsten einer Zusammenarbeit mit den USA. Dies gilt in hohem Maße auch für die Krebsforschung. Hier wurden zwischen beiden Ländern in vorbildlicher Weise sehr erfolgreiche und produktive Beziehungen entwickelt.

Um der japanisch-deutschen Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Krebsforschung die dringend notwendigen neuen Impulse zu verleihen, hat im Jahre 1986 die Senatskommission für Krebsforschung der Deutschen Forschungsgemeinschaft in Abstimmung mit japanischen Krebsforschern und mit Unterstützung des Bundesministers für Forschung und Technologie eine in zwei-Jahresabständen stattfindende Serie von japanisch-deutschen Workshops über *Molekulare und Zelluläre Aspekte der Krebsentstehung* ins Leben gerufen. Diese Workshops werden seit 1987 am Essener Institut für Zellbiologie (Tumorforschung), IFZ, durchgeführt. Sie haben sich inzwischen zu einem von beiden Seiten hochgeschätzten Instrument des informellen Informations- und Gedanken austausches entwickelt.

An diesen dreitägigen Workshops nehmen jeweils 10 - 12 füh-

Bericht

Ergebnisse aus erster Hand

Die japanisch-deutschen Workshops über "Molekulare und Zelluläre Aspekte der Krebsentstehung"

rende japanische und deutsche Krebsforscher sowie einige zur Diskussion eingeladenen jüngere Wissenschaftler teil. Für die Tage vor und nach dem Workshop werden für die japanischen Gäste Laboratoriumsbesuche und Seminarvorträge an anderen Instituten in Deutschland vereinbart. Die Themenbereiche der Workshops und die jeweiligen Teilnehmer werden zuvor vom japanischen (Vorsitz: Prof. Toshio Kuroki, Tokyo) und deutschen Komitee (Vorsitz: Prof. Manfred F. Rajewsky) auf der Grundlage der aktuellen Forschungssituation abgestimmt. So thematisierten der erste und der zweite Workshop - im Oktober 1987 und im September 1989 - die molekularen Wechselwirkungen kanzenogener Verbindungen mit der zellulären DNS, DNS-Reparaturvorgänge, Mechanismen des Mehr-

stufenprozesses der Kanzerogenese sowie neue Erkenntnisse über diejenigen Gene, die an diesem Prozeß synergistisch oder suppressierend beteiligt sind.

Der Ende Oktober 1991 abgehaltene dritte und jüngste Workshop beschäftigte sich in erster Linie mit den Skelett-Strukturen der Zelle und ihren Funktionen, mit Zelladhäsions-Molekülen und deren Bedeutung für die Invasivität maligner Zellen sowie mit der molekulargenetischen und zellbiologischen Analyse der Tumorprogression und Metastasierung¹. Im Einzelnen wurden folgende Themenbereiche diskutiert:

- Strukturelle und funktionelle Eigenschaften von Zytoskeletproteinen in normalem epithelialem Gewebe und in Tumoren epithelialen Ursprungs.
- Die Interaktion normaler und



Dritter Japanisch-Deutscher Workshop 1991: Austausch unter Kollegen

Foto: Universität GH Essen/MSL:KX

maligner Zellen mit extrazellulären Protein-Matrizen und die Charakterisierung von Proteinen, die für die interzelluläre Kommunikation verantwortlich sind.

- Die Rolle von Zelloberflächen-Rezeptoren und intrazellulären Molekülen bei der zellulären Signalübertragung.
- Fragen der molekularen Prozesse, die der malignen Transformation zugrunde liegen und Möglichkeiten der Veränderung bzw. Reversion maligner Zell-Phänotypen.
- Die Charakterisierung von Genen, welche die Invasivität maligner Zellen und die Metastasierung beeinflussen.

Neben den bemerkenswerten Fortschritten, die die auf dem letzten Workshop präsentierten Forschungsarbeiten aus beiden Ländern insgesamt erkennen ließen, zeigten sich allerdings auch, daß die Ent-

wicklung der Gentechnologie - besonders hinsichtlich der Identifikation von Genen und ihren Produkten - viel schneller voranschreitet, als die weitaus schwierigere, aber letztlich für die Krebsforschung entscheidende Klärung der Zelltyp-spezifischen biologischen und biochemischen Mechanismen, die der malignen Transformation von Zellen und der Tumorprogression zugrunde liegen, sowie der Fähigkeit von - insbesondere maligner - Zellen, sich über phänotypische Modulation an wechselnde Bedingungen ihrer Mikro-Umgebung anzupassen (einschließlich tumortherapeutischer Maßnahmen).

Die japanisch-deutschen Workshops, ebenso wie andere hier durchgeführte internationale Tagungen, bilden für die im Westdeutschen Tumorzentrum Essen vereinigten Institutionen eine "Brücke zur

Welt", die für die Aufrechterhaltung eines hohen wissenschaftlichen Standards unverzichtbar ist. Erste Vorbereitungen für den vierten japanisch-deutschen Workshop, der 1993 in Verbindung mit der 5. Internationalen Charles Heidelberger Konferenz über Krebsentstehung, Tumorbiologie und Tumortherapie wiederum in Essen stattfinden wird, sind bereits angelaufen.

Manfred F. Rajewsky

Anmerkung:

1) Vgl. Kuroki T, Rajewsky MF: Third Japanese-German Workshop on Molecular and Cellular Aspects of Carcinogenesis. INT JOURN CANC, May 1992

Ein großer Teil unseres heutigen Wissens über genetische und molekularbiologische Prozesse bei der Entstehung von Tumoren in höheren Organismen ist auf Untersuchungen der Struktur und Interaktionen von Viren mit ihren Wirtszellen zurückzuführen. Bei der Analyse viraler Gene von Tumoviren hat man eine überraschende Beobachtung gemacht: Jede "normale" Körperzelle verfügt in ihrem genetischen Material über Gene, die in ihrer Struktur und Funktion vielen krebsauslösenden, viralen Genen in überraschender Weise ähneln.

Ideale Modell- Systeme für die Grundlagenforschung

Virale Tumorgene und Krebsentstehung

Von Helmut Esche

Erste Hinweise, daß Viren bei der Entstehung von Krebs eine Rolle spielen könnten, haben Experimente ergeben, die schon 1910 von Peyton Rous am Rockefeller Institut für medizinische Forschung durchgeführt wurden. Jungen Hühnern hatten Rous und Kollegen zellfreie Extrakte injiziert, die sie aus Tumoren (sogenannten *Sarkomen*) bestimmter Gewebe von Artgenossen (tumortragenden Tieren) präpariert hatten. Ein großer Teil der infizierten Jungtiere entwickelte daraufhin Sarkome. Der Beweis, daß die von Rous vermuteten Viren tatsächlich für die Entstehung bestimmter Tumore verantwortlich sind, gelang jedoch erst Jahrzehnte später, Anfang der 60er Jahre, durch die Entwicklung neuer physikalischer Reinigungs- und Analysever-

fahren (Ultrazentrifugation, Elektronenmikroskopie). Seither ist eine Vielzahl von Viren isoliert und charakterisiert worden, die bei Nagetieren (Mäusen, Ratten, Hamstern, Kaninchen), Katzen, Rindern und Affen Tumore induzieren können. Eindeutige Beweise, daß auch beim Menschen Tumore durch Viren induziert werden, gibt es bis auf eine Ausnahme (das *human T cell leucemia virus, HTLV*) trotz großer Anstrengungen bis heute nicht. Die Tatsache jedoch, daß man bei verschiedensten Tierarten krebsauslösende Viren nachgewiesen hat, läßt es als wahrscheinlich erscheinen, daß auch menschliche Tumoviren existieren.

Viren, die vor allem wegen ihrer Fähigkeit Erkrankungen in lebenden Organismen zu erzeugen ent-

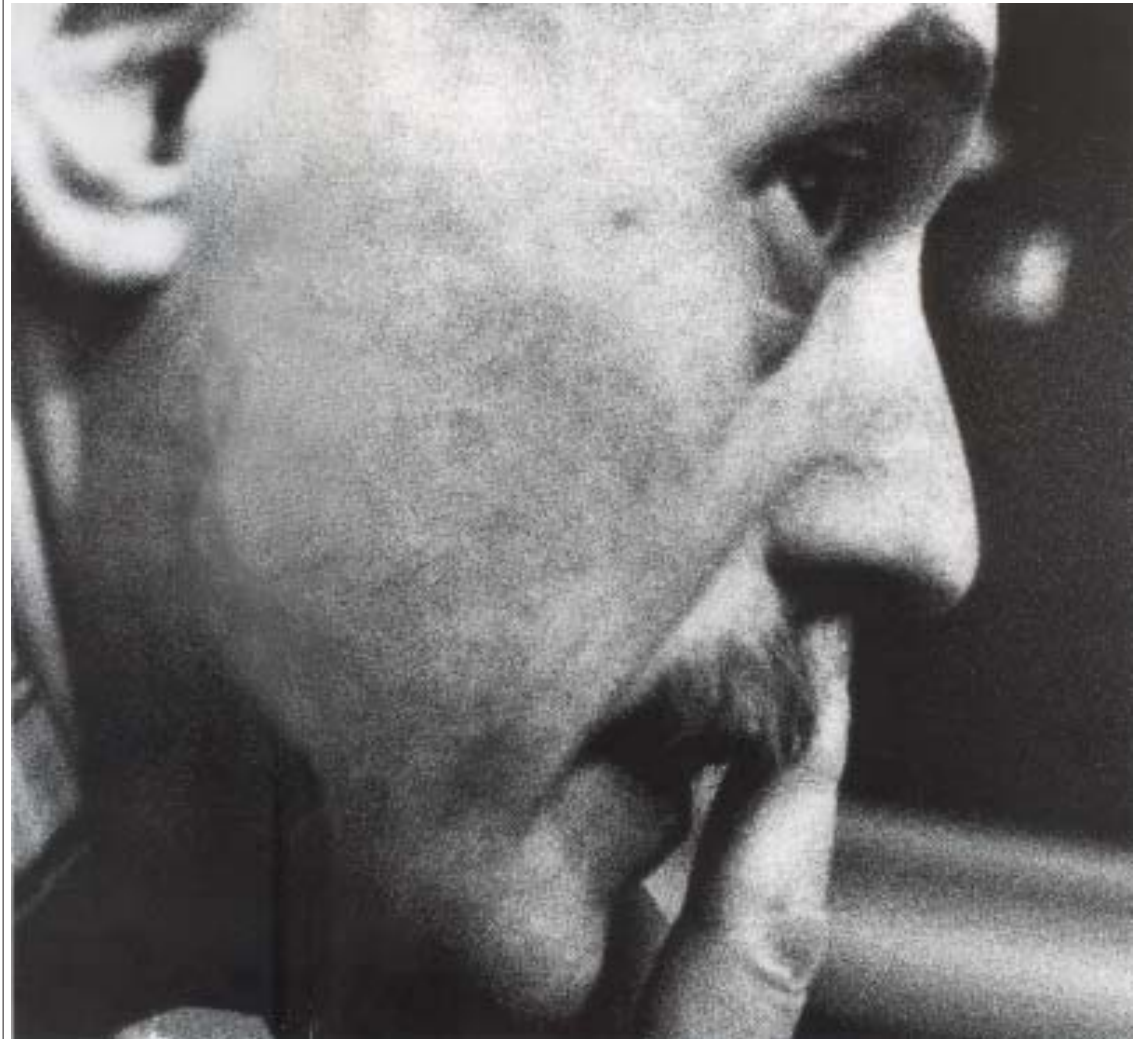
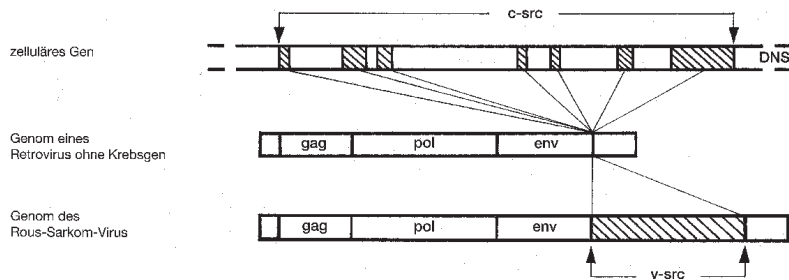


Foto: Universität GH Essen/LS&M

Forschungsschwerpunkt auf der Analyse viraler Onkogene: Prof. Dr. rer. nat. Helmut Esche



(1) Das zelluläre *src*-Gen (oben) setzt sich, wie nahezu alle zellulären Gene, aus den für das Genprodukt kodierenden Bereichen (Exons - *express regions*, in der Graphik schwarz schraffiert) und nicht kodierenden Bereichen (Introns - *intervening regions*, nicht schraffiert) zusammen. In der Vergangenheit wurde irgendwann einmal das zelluläre *src*-Gen von einem Retrovirus (Mitte) aufgenommen, seiner Introns beraubt und via RNS als geschlossener Exonblock in das Virusgenom eingebaut (unten). Die für die Vermehrung eines Retrovirus notwendigen viralen Gene sind *gag*, *pol* und *env*. *Gag* trägt den Bauplan für das Protein der Viruskapsel, *pol* für das Enzym reverse Transkriptase und *env* für ein Glykoprotein, das in die das Virus umgebende Membranhülle eingebaut wird.

Quelle/Graphik: Universität GH Essen/Eache/MKL85

deckt wurden, gehören zu den kleinsten sich replizierenden biologischen Strukturen. Sie besitzen zwar ein Information tragendes Genom-genetisches Material, daß die Bauleitungen für die viralen Eiweißmoleküle enthält - jedoch keinen eigenen Energiestoffwechsel und keine eigenen, kompletten Enzymsysteme, um ihr Genom zu vervielfältigen und die genetische Information auf ihrem Genom zu realisieren. Dies ist nur in Verbindung mit dem Syntheseparat einer Zelle möglich, in die ihre genetische Information über den Prozeß der Infektion gelangen muß. Durch diesen Umstand gehen Untersuchungen der Reproduktion des viralen Genoms und der Realisierung seiner in den Virusgenen festgelegten Information durch die komplexen Syntheseparatoren der Wirtszelle (*Genexpression*) auch Aufschluß über die Art und Weise, wie derartige Prozesse prinzipiell im Wirtsgenom - beispielsweise in einer menschlichen Zelle - ablaufen.

Zu den von vielen Forschern bevorzugten Studienobjekten unter den Viren zählten in den letzten Jahrzehnten die Bakterienviren, da ihre Wirtszellen, die Bakterien, sich leicht auf Nährmedien im Labor vermehren lassen. Erst mit der Etablierung von Zellkulturen höherer

Zellen wurde es möglich auch die Entwicklung von Tier-, Mensch- und Pflanzenviren unter kontrollierten Bedingungen zu studieren. Ein besonderes Interesse fanden dabei tierische (*animale*) Viren, die in der Diskussion stehen an der Entstehung maligner Tumore beteiligt zu sein.

Krebsentstehung: Ursachen und Prozeß

Die Entstehung von Tumoren beruht nach unseren heutigen Erkenntnissen auf einer Akkumulation genetischer Veränderungen (*Defekte*) in spezifischen Genen einer Zelle. Solche genetischen Veränderungen (*Mutationen*) können durch chemische Mutagene (*Kanzerogene*), energiereiche Strahlung (Röntgen-, radioaktive Strahlung), Viren oder durch Fehler bei der Verdopplung des Genoms der Zelle vor der Zellteilung ausgelöst werden. Entstehen die genetischen Defekte in für die Zelle wichtigen Genen mit regulatorischen Funktionen - beispielsweise in solchen Genen, die die *Genexpression*, das Zellwachstum (*Proliferation*), die Zellreifung (*Differenzierung*) oder die Kommunikation zwischen einzelnen Zellen regulieren - so kann dies zu einer Veränderung der

Genfunktionen und damit zur permanenten Zellteilung (*Immortalisierung*) und zur Bildung eines Tumors führen (Abb. 2).

Die Identifikation zellulärer Gene, die aufgrund ihrer genetischen Veränderung an der Tumorentstehung beteiligt sein könnten, gehört heute zu den dringlichsten Problemen in der medizinischen Grundlagenforschung und der Molekular- und Zellbiologie. Die Erfassung solcher Gene ist sehr schwierig - wenn nicht unmöglich - bei Tumoren, die durch chemische Mutagene oder energiereiche Strahlung induziert wurden, da in der Regel durch diese kanzerogenen Einflüsse Defekte an beliebig vielen und verschiedenen Stellen des zellulären Genoms entstehen. Es ist daher kaum möglich herauszufinden, welche der vielen mutierten Gene nun diejenigen sind, die aufgrund ihrer Veränderung an der Entstehung einer Tumorzelle beteiligt waren.

Im Gegensatz dazu wird das genetische Material einer Zelle nach der Infektion durch ein Tumovirus so gut wie nicht verändert. Das Tumovirus bringt durch sein eigenes Genom jedoch zusätzliche genetische Information in die Zelle ein, dessen Aktivität anscheinend die Ursache für die Entstehung der Krebszelle ist. Es liegt daher nahe,

nach jenen viralen Genen zu suchen, deren Funktionen für die Krebsentstehung verantwortlich sind. Für viele animale Tumoviren kennt man inzwischen diese *viralen Onkogene*.

Die Identifikation und biochemische Charakterisierung viralen Onkogene ermöglichte in den letzten Jahren weiterführende Untersuchungen, die zeigen konnten, wo in der Zelle die Produkte (*Proteine*) der viralen Onkogene lokalisiert sind und mit welchen zellulären Strukturen und Funktionen sie zusammenwirken. So wie ein Schlüssel nur zu einem ganz bestimmten Schloß paßt, muß das virale Onkogenprotein die Schaltstelle in der Zelle finden, an der es die normale Regulation spezifischer zellulärer Prozesse wie *Genexpression*, Wachstum, Differenzierung und Zellkommunikation verändern und umprogrammieren kann.

RNS-Tumoviren

Anders als in höheren Zellen kann das Genom bei Viren nicht nur aus Desoxyribonukleinsäure (DNS), sondern auch aus Ribonukleinsäure (RNS) bestehen; Tumoviren lassen sich deshalb in zwei Hauptgruppen einteilen: in RNS- und DNS-Tumoviren. Das RNS-Genom von Retroviren - zu denen das oben erwähnte, von Peyton Rous entdeckte Sarkomvirus gehört - enthält in der Regel nur drei Gene (Abb. 1). Gelangt das Virus in eine Zelle, wird seine RNS, von einem vom Viruspartikel mitgebrachten Enzym (*reverse Transkriptase*), erst einmal in eine doppelsträngige DNS-Kopie, der Art von Genmaterial, das in der Zelle üblich ist, übersrieben (Abb. 2). Diese Rückschreibung von RNS in DNS, die von D. Baltimore (Massachusetts Institute of Technology) und H. Temin (University of Wisconsin) erstmals genauer untersucht wurde, hat den Retroviren ihren Namen gegeben. Die auf diese Weise neu synthetisierte, sogenannte *Provirus-DNS* gelangt in den Zellkern und wird dort in das Genom der Wirts-

zelle eingebaut. Dadurch werden nicht nur die viralen Gene zusammen mit dem zellulären Genom vermehrt und an die Tochterzellen weitergegeben, sondern auch die in den viralen Genen gespeicherte Information von der Zelle durch die Synthese viraler Boten-RNS (*messenger RNS*) und Proteine realisiert.

Wie alle vermehrfähigen Retroviren besitzt das Rous-Sarkom-Virus die für die Virusvermehrung wichtigen Gene *gag*, *pol* und *env*. *Gag* vermittelt die Herstellung eines Strukturproteins, *env* sorgt für die Virushülle, und *pol* für die Herstellung der reversen Transkriptase. Bei der Genomanalyse des Rous-Sarkom-Virus fand man ein weiteres Gen, *src*, dessen Funktion für die Sarkombildung verantwortlich zu sein scheint - was als erste K. Toyoshima, R.R. Friis und P. Vogt (University of Southern California) und G.S. Martin (University of Berkeley) zeigen konnten. Rous-Sarkom-Viren, deren *src*-Gen künstlich entfernt oder durch Mutationen inaktiviert wurde, konnten keine Tumore mehr induzieren, das Virus konnte sich jedoch noch vermehren. Damit war erstmals gezeigt, daß das Rous-Sarkom-Virus ein eigenes Gen in die Zelle mitbringt, dessen Produkt eine bestimmte Art von Krebs induzieren kann. Heute wissen wir darüber hinaus, daß das Onkogen ständig anwesend sein muß, um das Tumorstadium zu erhalten. Ein von erstaunlicher Befund: Ein einzelnes Gen kann darüber entscheiden, ob eine Zelle wie eine Tumorzelle wächst oder nicht.

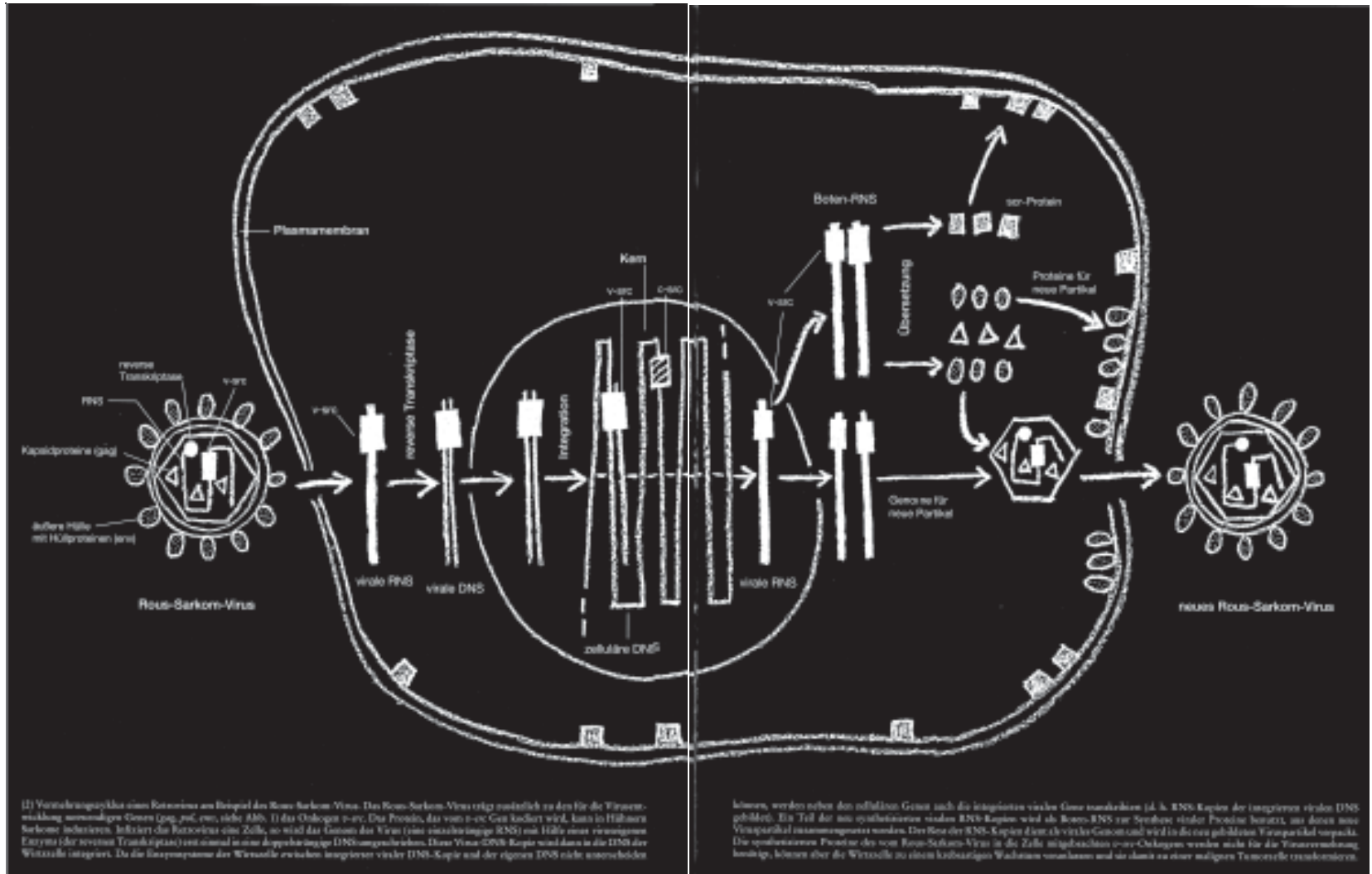
Krebsgene: Veränderte Kopien normaler Gene?

1979 machte H. Hanafusa von der Rockefeller University mit einer Virusmutante, der das *src*-Gen entfernt (*deletiert*) wurde, eine merkwürdige Beobachtung: Er und seine Kollegen injizierten Hühnern diese Virusmutante ohne *src*, und es trotzdem entstanden, wenn auch bei sehr wenigen Tieren, Sarkome. Die Tumore traten in diesem Fall nicht

sofort und direkt in der Umgebung der Injektionsstelle, sondern erst nach Monaten und an entfernten Stellen auf. Zum Erstaunen aller Forscher trugen die aus den Tumoren isolierten RNS wieder das komplette *src*-Gen. Aber woher kam das Gen? Enthielten möglicherweise einige Hühnerzellen inaktive Viren mit *src*, die durch die Infektion mit der Mutante aktiviert wurden?

Um diese Frage abzuklären, stellten D. Stehelin, H.E. Varmus, J.M. Bishop und P. K. Vogt (University of California in San Francisco und Los Angeles) mit gentechnologischen Methoden eine radioaktiv gekennzeichnete *src*-DNS-Sonde her, um durch sogenannte *Hybridisierungsexperimente* zu prüfen, ob das *src*-Gen oder Teile davon eventuell auch außerhalb des Rous-Sarkom-Virus im Genom von normalen Hühnerzellen vorkommen. Das Ergebnis dieses Experimentes war überraschend: Die *src*-Sonde fand fast gleiche Gensequenzen in jeder Hühnerzelle, darüber hinaus lokalisierte man *src*-Sequenzen unter anderem auch im Genom der Maus, des Menschen und vieler wirbelloser Tiere. Enthalten also alle Organismen das *src*-Gen, und damit vermutlich Krebsgene? Einerseits bestätigte diese Nachricht die Überlegung, daß Krebs ein vererbbarer Vorgang ist und Krebsigenschaften über ein oder mehrere Gene von Zelle zu Zelle weitergegeben werden. Andererseits sind es völlig normale Zellen, in denen das Krebsgen *src* gefunden wurde. Wie kann aber ein Onkogen zugleich ein normales Gen sein?

Das Auffinden eines zelleigenen *src*-Gens läßt vermuten, daß die Rous-Sarkom-Virusmutante (ohne das *src*-Gen) in den oben beschriebenen, von Hanafusa durchgeführten Experimenten das *src*-Gen aus der Zelle "aufgepickt" und damit die Eigenschaft, Sarkome zu verursachen, wiedergewonnen hat. Es bleibt aber die Frage, wie das bisher in der normalen Zelle "harmlose" *src*-Gen im Virus zum Krebsgen



werden kann. Gibt es möglicherweise einen Unterschied in der Menge der *src*-Genprodukte, die jeweils vom viralen oder dem zellulären Genom gebildet werden? Das Versetzen eines Gens vom zellulären Genom in das virale Genom könnte die normale Regulation, der das Gen in der Zelle unterliegt, aufheben. Oder wird die Struktur des Gens bei der Aufnahme ins Virusgenom verändert und damit das Genprodukt? Dies sind Kernfragen, mit denen sich die Molekular- und Zellbiologen seit etwa zehn Jahren intensiv beschäftigt haben.

Onkogene und Proto-Onkogene

Heute wissen wir, daß das *src*-Gen im Rous-Sarkom-Virus strukturelle Unterschiede zum zellulären *src*-Gen aufweist, und aufgrund viraler Regulationselemente (*Promotoren für die Transkription*) einer anderen Kontrolle als in der Zelle unterliegt. Das zelluläre *src*-Gen ist wie fast alle Gene höherer Organismen in Abschnitte zerstückelt: In sogenannte *Exons*, die den Bauplan des Genprodukts enthalten und damit ihre Struktur bestimmen. Die Exons werden von intervenierenden Sequenzen (*Introns*, die keine Bauplaninformation tragen), voneinander getrennt. Während der Herstellung einer messenger RNS-Kopie werden die Intron-Anteile aus der RNS-Kopie herausgeschnitten. Bei der reifen, verwendungsfähigen messenger RNS finden sich so alle informationstragenden *src*-Abschnitte (*Exons*) direkt hintereinander angeordnet. Das virale *src*-Gen dagegen enthält keine Introns und hat damit die Struktur der reifen messenger RNS-Kopie des zellulären *src*-Gens. Man vermutet daher, daß die Introns bei der Aufnahme des zellulären *src*-Proto-Onkogens durch das Virus verloren gegangen sind (Abb. 1). Ein exakter Vergleich der Bausteinsequenz der zellulären RNS-Kopie und des viralen *src*-Onkogens haben außerdem gezeigt, daß oft zusätzliche Änderungen in der Bausteinsequenz auftreten: Das

zelluläre und das virale *src*-Gen sind sich zwar sehr ähnlich, doch an einigen Stellen verschieden.

In den Versuchen von H. Hanafusa hatte das Rous-Sarkom-Virus also sein *src*-Gen von der Wirtszelle aufgenommen und es dabei in seiner Struktur verändert. Warum aber gerade das *src*-Proto-Onkogen? Sollte nicht jedes andere Gen der Zelle die gleiche Chance haben, vom Virus aufgenommen zu werden? Wir können auch heute nur spekulieren, daß dem so ist. Zum einen ist die Aufnahme zellulärer Gensequenzen durch ein Virus ein sehr seltenes Ereignis. Zum anderen können wir möglicherweise nur diejenige Viren finden, die Onkogene aufgenommen haben, da sie für uns erst durch ihre Eigenschaft Tumore zu induzieren erkennbar werden. Andere vom Virus aufgenommene Gene zeigen dagegen vermutlich weder keinsichtbaren Effekt oder töten die Zelle, was bei der enormen Anzahl von Zellen höherer Organismen nicht auffallen würde.

Wie bringt aber nun das Proteinprodukt des viralen *src*-Gens eine Zelle dazu, wie eine Tumorzelle zu wachsen? R. L. Erikson und M. S. Collett sowie unabhängig von ihnen - A. R. Levinson und H. E. Varmus entdeckten, daß das *src*-Protein eine *Proteinkinase* ist. Kinasen sind Enzyme, die Phosphat-Reste an bestimmte Aminosäuren eines Eiweißmoleküls heften, ein Vorgang, den man *Phosphorylierung* nennt. T. Hunter und B. M. Sefton vom Salk Institut für Biologie fanden heraus, daß das *src*-Protein spezifisch die Aminosäure Tyrosin phosphoryliert. Damit unterscheidet sich das Enzym von allen bis dahin bekannten Kinasen, die Phosphat-Reste an die Aminosäuren Serin und Threonin hängen. Inzwischen weiß man, daß die Phosphorylierung von Tyrosin eine charakteristische Eigenschaft einer Reihe von onkogenkodierten Proteinen ist, aber auch bei der Wachstumsregulation einer normalen Zelle eine wichtige Rolle spielt.

Doch was unterscheidet nun die

Funktion des viralen *src*-Genprodukts von dem der normalen Zelle, wo doch beide *src*-Proteine andere zelluläre Proteine phosphorylieren können? Zum einen hat man zeigen können, daß die Menge phosphorylierter Tyrosinreste nach Einführung des viralen *src*-Gens in eine normale Zelle etwa um das Zehnfache steigt. Dies kann nur mit der Funktion des zusätzlich in die Zelle gelangten viralen *src*-Enzyms erklärt werden. Die Kernfragen jedoch, *welche* zellulären Proteine von dem *src*-Protein phosphoryliert werden, und ob das leicht modifizierte, virale *src*-Protein möglicherweise *noch andere* zelluläre Proteine phosphorylieren kann als die der normalen Zelle, sind noch unbeantwortet. Die Suche nach den Angriffspunkten des *src*-Enzyms, den vom *src*-Protein phosphorylierten zellulären Proteinen und deren Funktionen in der Zelle ist zur Zeit noch im vollen Gange.

Seit der Isolierung des Rous-Sarkom-Virus in den 60er Jahren sind zahlreiche weitere Tumorerzeugende und Onkogen-tragende Retroviren isoliert worden (s. Tab.). Für nahezu alle in Retroviren gefundenen Onkogene hat man entsprechende äquivalente Gene in der normalen Zelle gefunden. Das heißt zugleich, daß die Forschung in vielen Fällen erst durch die in den Retroviren gefundenen Onkogene wichtige zelluläre Gene mit regulatorischen Funktionen in der Genexpression, Proliferation und Differenzierung von Zellen entdeckt hat. Wie beim *src*-Gen gibt es zwischen den viralen Onkogenen und den Genen ihrer Herkunft (den zellulären Proto-Onkogenen) an einigen Stellen Unterschiede in der DNA-Bausteinsequenz. Bis heute sind auf diese Weise etwa 37 zelluläre Gene (Proto-Onkogene) entdeckt worden, die, werden sie in leicht veränderter Kopie durch Retroviren in die Zelle zusätzlich wieder eingebracht, die verschiedensten Tumore induzieren können.

Wird die Bausteinsequenz und damit die genetische Information

der zellulären Gegenstücke der viralen Onkogene in normalen Zellen durch chemische Karzinogene oder energiereiche Strahlen verändert, kann dies ebenfalls zur Bildung von Krebs führen. Die viralen Onkogene der krebsauslösenden Retroviren sind also tatsächlich nichts anderes als veränderte Versionen normaler Gene, die in jeder Körperzelle vorhanden sind. Die von den veränderten Genen kodierten Proteine lösen möglicherweise Tumore aus, weil sie ihre normalen Funktionen nicht mehr richtig wahrnehmen können. Noch sind nicht alle zellulären Proto-Onkogene bekannt - man schätzt ihre Anzahl auf etwa 50 bis maximal 100 - und noch kennt man nur die Funktionen eines Teils der isolierten viralen Onkogen- und zellulären Proto-Onkogenprodukte. Trotzdem läßt sich schon erkennen, daß die normalen zellulären Gene, deren veränderte Kopien man in Tumoren findet, wichtige Aufgaben in einem Netzwerk haben, welches

die Genexpression in den Zellen, das Wachstum, die Differenzierung und die Kommunikation von Zellen reguliert.

An dieser Stelle soll nicht unerwähnt bleiben, daß Retroviren noch über einen weiteren, völlig anderen Mechanismus verfügen, durch den sie Tumore induzieren können. Im Grunde können nämlich alle, nicht nur die Onkogen-tragenden Retroviren sondern auch solche, die keine Onkogene besitzen, Krebs induzieren. Die Onkogen-tragenden Viren erzeugen Tumore in der Regel sehr schnell, in wenigen Wochen und nahezu jede infizierte Zelle wird zur Krebszelle. Retroviren, die keine Onkogene tragen, transformieren die infizierten Zellen nur sehr selten; die Tumore treten zu dem erst nach Monaten oder Jahren auf. Eine mögliche Erklärung hierfür läßt sich wiederum aus den Experimenten von Hanafusa ableiten: "Langsame", kein Onkogen enthaltende Retroviren könnten ein zelluläres Proto-Onkogen aufnehmen

(was ein sehr seltenes Ereignis ist), seine Struktur verändern und sich dann in ein "schnelles" (ein Onkogen enthaltendes) Retrovirus verwandeln. Träfe dies zu, müßte man aus den Tumoren Viren isolieren können, die ein Onkogen enthalten. In vielen virusinduzierten Tumoren hat man jedoch keine dieser Viren gefunden, wohl aber Viren ohne Onkogen.

Aufklärung darüber, wie ein Retrovirus *ohne* Onkogen Krebs induzieren kann, brachten Analysen der Struktur des in die Zell-DNS eingebauten Retrovirus und Untersuchungen des Ortes, an dem das Virusgenom integriert wurde. Nach Überschreibung der viralen RNS in DNS (durch die virusgenese reverse Transkriptase) und dem Einbau in das Wirtsgenom werden die viralen Gene von zwei gleichen viralen Strukturelementen, sogenannten *long terminal repeats (LTRs)*, flankiert. Beide LTRs tragen wichtige regulatorische Elemente für die Genexpression, obwohl nur der

Beispiele retroviraler Onkogene und ihrer verwandten zellulären Gene

Name des Retrovirus	Virales Onkogen	Spezies ¹	Tumortyp	verwandte Gene in Wirbeltier-DNA	Funktion des Onkogen-Proteins ²
Rous Sarkom Virus	v-src ¹	Huhn	Sarkom	ja (c-src) ¹	tyrosinspezif. PK
Yamaguchi Sarkom Virus	v-yes	Huhn	Sarkom	ja (c-yes)	tyrosinspezif. PK
Gardner-Rasheed Sarkom Virus	v-igr	Katze	Sarkom	ja (c-igr)	tyrosinspezif. PK
Fujinami Sarkom Virus	v-ips	Huhn	Sarkom	ja (c-ips)	tyrosinspezif. PK
Snyder-Theulen Sarkom Virus	v-fes	Katze	Sarkom	ja (c-fes)	tyrosinspezif. PK
Abelson Leukemia Virus	v-abl	Maus	Leukämie	ja (c-abl)	tyrosinspezif. PK
UR2 Sarkom Virus	v-ros	Huhn	Sarkom	ja (c-ros)	tyrosinspezif. PK
Erythroblastosis Virus	v-erb A	Huhn	Sarkom, Leukämie	ja (c-erbA)	?
Erythroblastosis Virus	v-erb B	Huhn	Sarkom, Leukämie	ja (c-erbB)	EGF-Wachst.fakt. Rezeptor
McDonough Sarkom Virus	v-fms	Katze	Sarkom	ja (c-fms)	CSF-Rezeptor
3611 Sarkom Virus	v-raf	Maus	Sarkom	ja (c-raf)	serin/threoninspezif. PK
Mill-Hill-2 Sarkom Virus	v-mil	Huhn	Karzinom	ja (c-mil)	serin/threoninspezif. PK
Moloney Sarkom Virus	v-mos	Maus	Sarkom, Leukämie	ja (c-mos)	?
Harvey Sarkom Virus	v-Ha-ras	Ratte	Sarkom, Karzinom	ja (c-Ha-ras)	GTP-bindendes Protein
Kirsten Sarkom Virus	v-Ki-ras	Ratte	Sarkom, Karzinom, Leukämie	ja (c-Ki-ras)	GTP-bindendes Protein
Myelocytomatosis Virus	v-myc	Huhn	Karzinom, Sarkom, Leukämie	ja (c-myc)	Kernprotein
Erythroblastosis Virus (MC 29)	v-myb	Huhn	Leukämie	ja (c-myb)	Kernprotein
Erythroblastosis Virus (E 26)	v-ets	Huhn	Leukämie	ja (c-ets)	?
Finkel Osteo-Sarkom Virus	v-fos	Maus	Sarkom	ja (c-fos)	Kernprotein
Sloan-Kettering Virus (770)	v-ski	Huhn	Sarkom	ja (c-ski)	?
Retivuloendotheliosis Virus	v-rel	Truthahn	Leukämie	ja (c-rel)	serin/threoninspezif. PK
Simian Sarkom Virus	v-sis	Affe	Sarkom	ja (c-sis)	PDGF-Wachstumsfaktor

¹) Wirtsgenom des Virus. ²) PK-Proteinkinase, EGF-epidermal growth factor, CSF-colony stimulation factor, PDGF-platelet-derived growth factor, GTP-Guanosin-triphosphat, c-src virales Onkogen, c-src zelluläres Proto-Onkogen. ³) v-src, virales Onkogen. ⁴) c-src, zelluläres Proto-Onkogen. Quelle: Universität GH Essen/Fachbereich

linksseitige LTR für die Expression der viralen Gene - also für die Synthese viralen messenger RNS - benötigt wird. 1981 lieferten W. Hayward und B. Neel von der Rockefeller University New York und S. Astrin vom Institute of Cancer Research in Philadelphia einen überzeugenden Beweis dafür, daß bestimmte regulatorische Regionen auf den LTRs, *enhancer* genannt, einen Einfluß auf die Genaktivität benachbarter zellulärer Gene haben können. Sie untersuchten unter anderem die Orte der Virusintegration in das zelluläre Genom bei einer spezifischen Form von Leukämie (bei durch das *Avian Leukosis Virus* induzierten *B-Zell-Lymphomen*). Allen untersuchten Tumoren war gemeinsam, daß mindestens eines der Retrovirusgenome sich immer in der Umgebung des zellulären Proto-Onkogens mit dem Namen *c-myc* befand. Sie konnten weiterhin nachweisen, daß die Nachbarschaft der viralen LTRs die Aktivität des *c-myc*-Gens stark beeinflusst. Es wurde dreißig- bis hundertfach häufiger transkribiert und folglich synthetisiert die Zellen auch viel mehr *c-myc*-Genprodukt als eine normale Zelle. Die Überexpression des *c-myc*-Proteins stellt offensichtlich einen wichtigen Schritt in der Lymphomenstehung dar.

Die Befunde im Überblick: Retroviren mit Onkogenen sind sehr effektiv bei der Tumorerzeugung. Fast jede der infizierten Zellen verhält sich wie eine Tumorzelle. Retroviren ohne Onkogen können ebenfalls Krebs verursachen, aber nur selten, da ihre Krebs-auslösende Wirkung von der zufälligen Integration nahe eines zellulären Proto-Onkogens abhängt. Wird entweder die Menge des von einem zellulären Proto-Onkogen gebildeten Proteins oder die Struktur des Gens und damit das Genprodukt verändert - und genau das passiert, wenn entweder ein Retrovirus in der Nachbarschaft eines zellulären Proto-

Onkogens mit seinem Genom in eine Zelle einbringt - kann es zur einer Deregulation wichtiger Kontrollmechanismen der Genexpression, des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung kommen.

DNS-Tumoviren

Die zweite Gruppe von Viren, die Krebs induzieren kann, ist die der DNS-Tumoviren. Sie besitzen als genetisches Material nicht RNS, sondern DNS. Die bekanntesten Vertreter dieser Gruppe sind die *Papovaviren* (*Simian-Virus 40*, *Polyoma-Virus*), *Adenoviren* und bestimmte Typen der Herpes-Virus-Gruppe (etwa das *Epstein-Barr-Virus*).

Für einige dieser DNS-Tumoviren sind die viralen Onkogene und die Funktion ihrer Genprodukte gut untersucht. Adenoviren beispielsweise haben zwei Onkogene, *E1a* und *E1b*, deren Proteine unterschiedliche Funktionen haben. Die Funktionen beider Gene zusammen können primäre (normale) Zellen zu Tumorzellen transformieren, während Funktionen der einzelnen Gene dazu nicht in der Lage sind. Die *E1a*-Onkoproteine allein können die Zellen nur immortalisieren. Solche immortalisierten Zellen sind unsterblich; sie besitzen eine unbegrenzte Fähigkeit zur Zellteilung - ein erster wichtiger Schritt auf dem Weg zu einer Tumorzelle -, können jedoch im Tierorganismus, beispielsweise in Mäusen, Ratten oder Hamstern nicht zu Tumoren auszuwachsen. Die Fähigkeit zum aggressiven, infiltrativen Wachstum und zur Bildung von Tochtertumoren (*Metastasierung*) erhalten die immortalisierten Zellen erst durch Funktionen der *E1b*-Onkoproteine. *E1a*-Onkoproteine sind im Zellkern lokalisiert und greifen in die Regulation der Aktivität zellulärer Gene ein. Über die Funktionen der *E1b*-Onkoproteine weiß man heute noch recht wenig.

Das *SV40*- und das *Polyoma-Virus* kodieren ebenfalls für mehrere Onkoproteine verschiedener

Größe, diese sogenannten *Tumorigene* sind für die Entstehung von Tumorzellen verantwortlich. Bei den Herpesviren konnte bisher noch kein nach den oben festgelegten Kriterien definiertes Onkogen eindeutig charakterisiert werden. Im Gegensatz zu den Retroviren benötigen alle DNS-Tumoviren die Funktionen ihrer Onkogene für ihre eigene Vermehrung, für die Expression ihrer Gene oder zumindest indirekt für die Vervielfältigung ihres Genoms.

Allen DNS-Tumoviren ist noch etwas gemeinsam, was sie, neben anderen Parametern, von den RNS-Tumoviren unterscheidet: Für keines der viralen Onkogene von den bisher untersuchten DNS-Viren hat man ein entsprechendes zelluläres Gegenstück (Proto-Onkogen) gefunden. Es gibt allerdings Hinweise dafür, daß undifferenzierte, noch embryonale Zellen Proteine synthetisieren, die sich in ihrer Struktur zwar von den Onkoproteinen der DNS-Tumoviren unterscheiden, ihnen jedoch in ihren Funktionen sehr ähneln. Solche zellulären Proteine werden von ausdifferenzierten, reifen und nicht mehr teilungsfähigen Zellen nicht mehr gebildet.

Der Stand der Forschung

Wir wissen heute, daß bestimmte RNS- und DNS-Viren bei Tieren Krebs hervorrufen können. Vermutlich spielen diese Tumoviren eine größere Rolle bei der Entstehung von Tumoren als man bisher glaubte. Durch die heute zur Verfügung stehenden gentechnologischen Methoden ist es möglich geworden, das Genom von Tumoviren zu untersuchen, experimentell zu verändern und dadurch grundlegende Erkenntnisse über die Funktion der Onkogenprodukte und damit über die Krebsentstehung zu gewinnen. Die Onkogene der RNS-Tumoviren (Retroviren) sind normale, die Genexpression, das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und Zell-Zell-Kommunikation

regulierende zelluläre Gene (Proto-Onkogene), die zufällig in das Genom der Retroviren aufgenommen wurden. Die Überproduktion solcher vom Retrovirus aufgenommenen und im Retrovirusgenom strukturell leicht veränderten zellulären Proto-Onkogene führt auf bisher noch sehr wenig verstandene Art und Weise zum Versagen der normalen Kontrollmechanismen, die die Genexpression, das Wachstum und die Reifung (Differenzierung) von Zellen regulieren. Untersuchungen einer Reihe von - auch menschlichen - Tumoren, die nicht durch Viren induziert wurden, haben in den letzten Jahren zeigen können, daß einige jener normalen, zelleigenen Proto-Onkogene - die erstmals als Kopien (Onkogene) in Retroviren nachgewiesen wurden - in den Tumorzellen verändert sind. Aufgrund dieser Veränderungen können die ebenfalls veränderten Proto-Onkogenprodukte in den Tumorzellen ihre normale Funktion nicht mehr richtig wahrnehmen.

SUMMARY

Most, if not all, complex eukaryotic organisms are subject to disorders of cell growth and differentiation that result in the appearance of localized or disseminated tumors. In the last twenty years there has been a virtual explosion in our understanding of genetic and molecular mechanisms which regulate cell proliferation and differentiation. This applies both to normal cells, in which growth is tightly controlled, as well as to tumor cells which divide in an uncontrolled fashion. A great part of this knowledge comes from the analysis of genes which are responsible for malignant transformation by certain tumor viruses. The great attraction of oncogenic viruses in tumor research depends in large part on the apparent simplicity of many of these viruses and on the correlative hope that a

detailed understanding of the genetic contribution such viruses make to a cell will enlarge our understanding of neoplastic conversion in general. Several retrovirus strains, the family of viruses which carry an RNA genome but replicate via a DNA intermediate (fig. 2), rapidly induce malignant tumors following infection of animals of the appropriate host species. The same strains also induce the transformation of cells in culture. Analysis of these retroviral genomes has led to the identification of some two dozen different transforming genes, known as viral oncogenes (v-onc, see table) which are - in contrast to those of DNA tumor viruses - distinct from the genes required for viral replication (fig. 1). These viral oncogenes raised a number of immediate questions for which at least partial answers are now available: Where do tumor genes come from? How is the gene introduced, reproduced and expressed? What kind of protein is expressed by such a gene? What does the protein do, directly or indirectly, to the metabolism of host cells and how do viral oncogenes disturb the control of cell growth and division? Since 1976 it is known that oncogenes are not unique to retroviruses but that nearly identical sequences at least to retroviral oncogenes are present in the genome of all vertebrate cells. These so-called cellular oncogenes (c-onc or proto-oncogenes, as they are also designated, see table) show a remarkable degree of evolutionary conservation, suggesting that they express essential functions. The fact that retroviruses which have captured cellular oncogenes are able to induce abnormal cell proliferation raised the speculation that proto-oncogenes participate in regulating the growth of normal cells.

Der Autor:

Helmuth Esche ist seit 1985 Professor am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung) des Zentrums für Tumorforschung

und Tumorthherapie am Universitätsklinikum Essen. Nach dem Studium der Biologie und Genetik an der Freien Universität Berlin, mit Studienaufenthalten in Tübingen und München, promovierte er 1974 am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin über die Regulation der Genexpression des *Bacillus subtilis* Phagen SP1. 1976 ging er für vier Jahre an das Institut für Genetik der Universität zu Köln in die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Doerfler, wo er Untersuchungen über die Struktur, Expression und Funktion Adenovirus-spezifischer Tumorigene durchführte. Während eines zweijährigen Forschungsaufenthaltes an den Cold Spring Harbor Laboratories in den USA, wurde die Analyse viraler Onkogene zu seinem Forschungsschwerpunkt, den er nach seiner Rückkehr und Einrichtung einer selbstständigen Arbeitsgruppe am Institut für Genetik der Universität Köln ausbaute. Seit 1986 leitet er eine von zwei Arbeitsgruppen am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung) der Universität Essen mit Forschungsschwerpunkten auf dem Gebiet viraler Onkogene und zellulärer Proto-Onkogene. 1989 ging er nochmals für neun Monate an das Whitehead Institut for Biomedical Research in Cambridge, USA, wo er Interaktionen viraler Tumorigene mit Proteinen zellulärer Tumorsuppressorgene untersuchte. Seit 1988 ist er Sprecher des am Universitätsklinikum Essen eingerichteten Sonderforschungsbereichs der Deutschen Forschungsgemeinschaft (1988-1991) des SFB 102 *Experimentelle und klinische Leukämie und Tumorforschung*, seit 1992 des SFB 354 *Genetische und Biochemische Grundlagen der Krebsentstehung und Metastasierung*.

Literatur:

- Bishop JM (1983) Cellular Oncogenes and Retroviruses. ANNUAL REVIEW OF BIOCHEMISTRY 52: 301-35
 Bishop JM (1985) Proto-Oncogenes: Clues to the Puzzle of Purpose. NATURE 316: 483-491
 Esche H (1986) Early Proteins Coded by the Adenovirus Genome: Functional Aspects. In: Development in Molecular Virology, Vol. 5: Adenovirus DNS: The Viral Genome and its Expression (Eds. W. Doerfler, Y. Becker), Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp 223
 Klein G, Weinberg W (Eds) (1982) Retroviruses and Cancer Genes. Advances in Cancer Research 37, Academic Press, New York
 Land H, Parada LF, Weinberg RA (1983) Tumorigenic conversion of primary embryonic fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. NATURE 304: 596-602
 Rukey HE (1983) Adenovirus Early Region 1A Enables Viral and Cellular Transforming Genes to Transform Primary Cells in Culture. NATURE 304: 602-608
 Varmus H, Levine AJ (Eds) (1983) Readings in Tumor Virology. Cold Spring Harbor Laboratory Press



Dr. phil. nat. Walter Birchmeier, seit 1988 Professor für Molekularbiologie am Essener Universitätsklinikum.

Foto: Universität GH Essen/LSK&M

Invasivität und Metastasierung sind diejenigen fatalen Schritte, die Krebserkrankungen nicht mehr kurierbar machen. Bei der Klärung der Mechanismen, die der Metastasierung von Tumoren zugrunde liegen, hat sich die Forschung zwischen 1970 und 1985 zunächst darauf konzentriert, die Biologie der beteiligten Prozesse verstehen zu lernen. Ab 1985 veränderte sich das Forschungsinteresse in der Grundlagenforschung: die Analyse der beteiligten Makromoleküle rückte in den Vordergrund. Inzwischen ist abzusehen, daß die neu erworbenen Kenntnisse zukünftig neuartige Therapieformen ermöglichen werden.

Barrieren gegen die Ausbreitung

Molekularbiologische Ansätze zum Problem der Metastasenbildung / Von Walter Birchmeier

Metastasen sind das Endprodukt eines vielschrittigen und komplexen Prozesses. Es beginnt damit, daß einige Körperzellen unkontrolliert zu wachsen beginnen und schließlich einen Geschwulst- den primären Tumor - bilden. Bei Karzinomen, die über 90 Prozent der gefährlichen Tumore ausmachen, entstehen diese ersten entarteten (transformierten) Zellen in Epithelien, also in Zellschichten, die die Außen- und Innenflächen unseres Körpers auskleiden: in den Zellschichten der Haut, der Brustdrüsen, des Mund- und Rachenraums, im Magen- und Darmtrakt, in den Gängen der Bauchspeicheldrüse, in den Nieren und den Geschlechtsorganen. Diese Epithelien sind vom "Rest des Körpers" durcheinicht-zelluläre Basalmembran abgetrennt (Abb. 1), und sie werden nicht direkt mit Blutgefäßen versorgt. Der

erste gefährliche Schritt des Metastasierungsprozesses besteht nun darin, daß bestimmte transformierte Epithelzellen aus dem Primärtumor dissoziieren, die Basalmembran durchbrechen und ins darunterliegende Bindegewebe einwandern. Diesenerstenentscheidenden Schritt der Metastasierung bezeichnet man als Invasivität.

Vor allem die Forschungsarbeiten von J. Folkman, Harvard University, haben gezeigt, daß Tumore ohne entsprechende Durchblutung aus"versorgungstechnischen"Gründen nicht größer als ein bis zwei Millimeter werden können; in dieser Größe enthält ein Tumor dann etwa eine Million Zellen. Gewisse invadierende Tumoren haben es deshalb darauf angelegt, Blutgefäße aus dem Bindegewebe anzulocken. Man nennt diesen Prozeß der tumor-induzierten Neuentstehung

von Blutgefäßen Tumor-Angiogene- nese. Die Tumorzellen setzen dabei "Lockstoffe" - Wachstumsfaktoren und Zell-Motilitätsfaktoren - frei, die diejenigen Zellen, die die Innenfläche der benachbarten Blut- und Lymphgefäße auskleiden (Endothelzellen), zum Einwandern in den Tumor veranlassen. Erst ein mit Blut versorgter Tumor hat die Möglichkeit, unbeschränkt zu wachsen und schließlich Fernmetastasen zu bilden.

Später gelingt es einigen Tumorzellen in der Regel, in die Blut- oder Lymphgefäße des wachsenden Tumors einzudringen. Sie werden von dort aus passiv, vom Primärtumor weg, in andere Organe geschwemmt (Abb. 1). Da die Blutgefäße mit den relativ dichtgepackten roten Blutzellen eine für Karzinomzellen unfreundliche Umgebung darstellen, umgeben sich einige Tumorzellen während ihrer Wanderung im Blut mit schützenden weißen Blutzellen. Von den zirkulierenden Karzinomzellen sind nun wiederum nur diejenigen "erfolgreich", die in geeigneten Zielorganen - beispielsweise in Lunge, Le-

ber oder Gehirn - anhaften und die Endothelien der Blutgefäße dort durchdringen. Erst diese Zellen können im darunterliegenden Bindegewebe wachsen und damit Fernmetastasen bilden.

Die Metastasierung von Tumorzellen ist also ein sehr komplexer Vorgang, wobei immer nur ein Bruchteil der an den einzelnen Prozessstufen beteiligten Zellen das jeweils folgende Hindernis auch bewältigen. Oft kann es Jahre dauern, bis ein Tumor das nächste Stadium der Metastase-Kaskade erreicht. Hinzu kommt: Jede Tumorart hat ihre eigenen Invasions- und Metastase- wege sowie ihr eigenes zeitliches Programm. Daß gewisse Tumore auf ihrem "Hindernislauf" immer bestimmte Zielorgane erreichen, wurde in den 70er und 80er Jahren vor allem durch J. Fidler und G. Nicolson, heute beide in Houston, Texas, erkannt und intensiv erforscht.

Die Schlüssel-moleküle

Vor diesem Hintergrund stellte sich in den letzten Jahren in der Grund-

lagenforschung drängend die Frage, welche zellulären Makromoleküle für das invasive und metastatische Verhalten der Tumorzellen verantwortlich sein könnten. Man vermutete, daß gewisse Tumorzellen vermehrt Verdauungsenzyme (Proteasen) absondern und sich damit den Weg in die zu invadierenden Gewebeschichten freimachen. Heute ist klar, daß in der Tat Proteasen (Kollagenasen und Plasminaktivatoren) den Tumorzellen beim Durchbrechen der Basalmembranen und Endothelzellschichten helfen. Des weiteren nahm man an, daß Moleküle wichtig sein könnten, die die Bindefähigkeit (Adhäsivität) der Tumorzellen, sowohl untereinander als auch zu den wechselnden neuen Partnern, auf ihrem komplexen Metastaseweg beeinflussen. Vor kurzem konnten wir zeigen, daß in der Tat solche Adhäsionsmoleküle bei der Invasivität von Karzinomzellen eine wichtige Rolle spielen (Abb. 1): Karzinomzellen können sich erst dann aus primären Tumoren lösen, wenn sie bestimmte Zelladhäsionsmoleküle auf ihrer Oberfläche verlieren, die für die Adhäsivität untereinander verantwortlich sind - wie beispielsweise das von uns untersuchte Molekül E-Cadherin. Eine weitere Klasse von beteiligten Molekülen sind die sogenannten Zellmotilitäts- und Wachstumsfaktoren, die die Wanderungsfähigkeit von Zellen beeinflussen. Tumorzellen können, wie bereits erwähnt, Zellmotilitätsfaktoren aussenden, um Blutgefäße anzulocken. Auch hier ist die Grundlagenforschung ein gutes Stück vorangeschritten: Im Rahmen unserer Arbeiten konnten wir einen neuartigen Motilitätsfaktor, der von Bindegewebszellen gebildet wird und die Motilität von Karzinomzellen beeinflusst, reinigen und molekular charakterisieren: den *Scatter-Faktor*.

ner Wahrscheinlichkeit von 80 Prozent länger als fünf Jahre; bei Patienten mit entdifferenziertem Dickdarmkarzinom beträgt diese Wahrscheinlichkeit nur 20 Prozent.

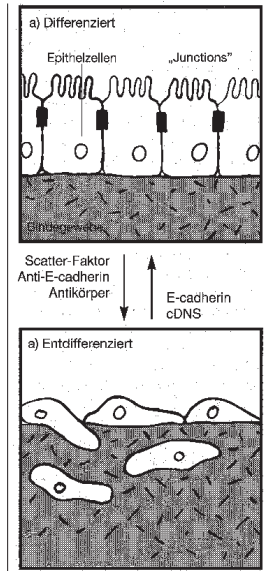
Ab 1982 waren wir in der Lage, monoklonale Antikörper herzustellen, mit deren Hilfe Epithelzellen in Zellkulturen vom differenzierten in einen entdifferenzierten Zustand überführt werden können (von a zu b in Abb. 2). Ein besonderer Antikörper war dabei gegen ein epithel-spezifisches Zelladhäsionsmolekül, das wir heute E-Cadherin - epitheliales, Calcium-abhängiges Adhären - nennen, gerichtet¹. Inzwischen konnte E-Cadherin nicht nur in den Zwischenzellverbindungen (*Junctions*), den charakteristischen Adhäsionsstrukturen der Epithelzellen, lokalisiert werden (Abb. 2, a), auch die Funktionen dieses Zelladhäsionsmoleküls sind weitgehend geklärt: Wenn dieses Molekül durch die Bindung von Antikörpern gestört wird, erkennen die Epithelzellen sich untereinander nicht mehr und geben ihre epitheliale Eigenschaften auf, wodurch sich schließlich ihre Invasivitätsfähigkeit erhöht (Abb. 2, b).

E-Cadherin - Ein Marker für differenzierte Karzinome

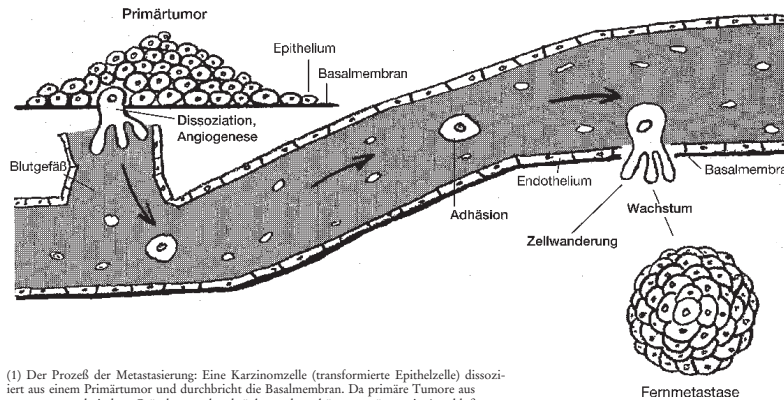
Zelladhäsionsmoleküle können die Invasivität von Karzinomen beeinflussen. Aus der Krebsdiagnostik ist schon seit Jahrzehnten bekannt, daß Karzinome in zwei Extremformen - differenziert und entdifferenziert - auftreten, wobei die entdifferenzierten Karzinome generell stärker invasiv und demnach gefährlicher sind. In differenzierten Karzinomen zeigen die Epithelzellen noch viel von ihren spezifischen epitheliale Eigenschaften: Sie sind oft polar, sie exprimieren charakteristische epitheliale Zwischenzellverbindungen (*Junctions*), und sie sind kaum mobil (Abb. 2, a). In entdifferenzierten Karzinomen hingegen sind diese Eigenschaften der Epithelzellen oft kaum mehr sichtbar (Abb. 2, b): Die Zellen zeigen keine spezifisch epitheliale Zellverbindungen, sie sind stärker mobil, und sie invadieren in darunterliegende Gewebeschichten. Inwieweit der Differenzierungsgrad und die damit zusammenhängende Invasivität und Metastasierfähigkeit der Karzinomzellen die Prognose einer Tumorerkrankung beeinflussen, zeigen folgende Zahlen: Patienten mit der Diagnose eines differenzierten Dickdarmkarzinoms leben mit ei-

ner Wahrscheinlichkeit von 80 Prozent länger als fünf Jahre; bei Patienten mit entdifferenziertem Dickdarmkarzinom beträgt diese Wahrscheinlichkeit nur 20 Prozent.

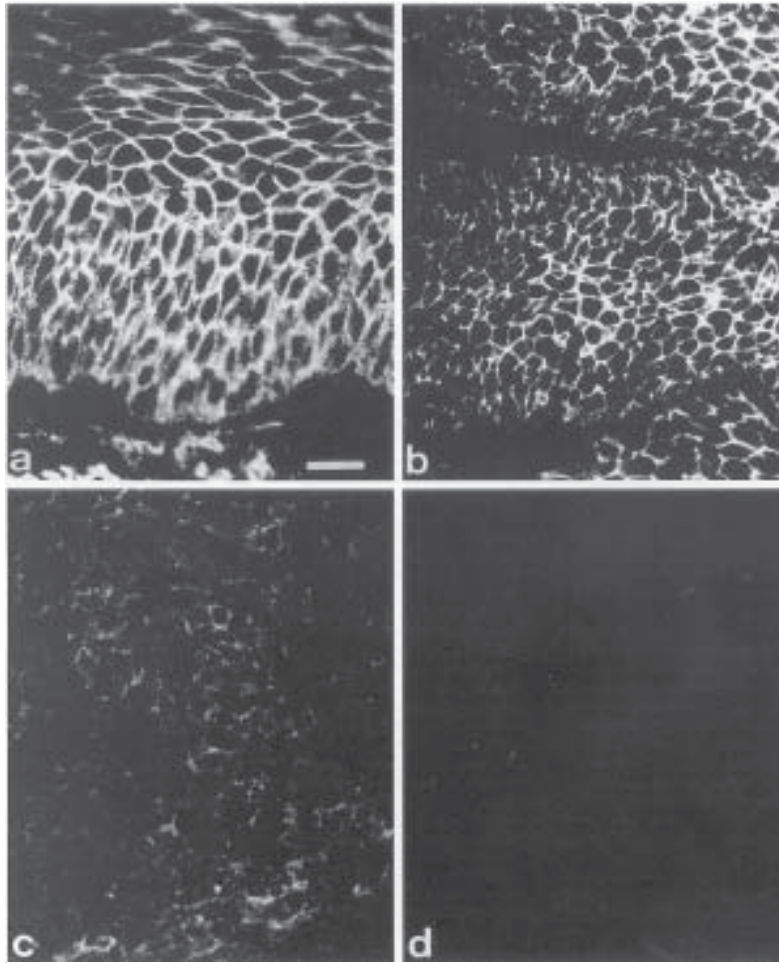
Um zu klären, ob das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin auch bei der Invasivität von Karzinomen neben beispielsweise Mikrovielli auf der Lumen-seite), und sie zeigen charakteristische Zwischenzellverbindungen (*Junctions*), in denen das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin lokalisiert ist. Durch Zugabe von Antikörpern gegen E-Cadherin oder durch Scatter-Faktor können diese Epithelzellen experimentell in einen entdifferenzierten Zustand (b) überführt werden. Die Zellen verlieren ihre Polarität, zeigen keine Junctions mehr, und werden invasiv für darunterliegendes Bindegewebe. Geht man experimentell von entdifferenzierten Karzinomzellen aus (die kein E-Cadherin exprimieren), kann die Differenzierung durch Transfektion der DNS für E-Cadherin wiederhergestellt werden. Durch diese Experimente ist wissenschaftlich klar gezeigt worden, daß das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin ein Schlüssel-molekül für die Erhaltung der Differenzierung der Epithelzellen darstellt, und daß dessen Verlust die Invasivität der Zellen bewirkt. Es ist klar, daß sich die Situation bei realen Epithelien (und in Tumoren) komplizierter als im gezeichneten Schema darstellt; so sind beispielsweise viele Epithelien mehrschichtig (Abb. 3).



(2) Experimentell veränderbar: Der Differenzierungsgrad von Epithelzellen. Epithelzellen (z.B. Darmepithelzellen) wachsen auf Bindegewebe. In (a) sind die Epithelzellen differenziert, d.h. sie sind polar (sie exprimieren beispielsweise Mikrovielli auf der Lumen-seite), und sie zeigen charakteristische Zwischenzellverbindungen (*Junctions*), in denen das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin lokalisiert ist. Durch Zugabe von Antikörpern gegen E-Cadherin oder durch Scatter-Faktor können diese Epithelzellen experimentell in einen entdifferenzierten Zustand (b) überführt werden. Die Zellen verlieren ihre Polarität, zeigen keine Junctions mehr, und werden invasiv für darunterliegendes Bindegewebe. Geht man experimentell von entdifferenzierten Karzinomzellen aus (die kein E-Cadherin exprimieren), kann die Differenzierung durch Transfektion der DNS für E-Cadherin wiederhergestellt werden. Durch diese Experimente ist wissenschaftlich klar gezeigt worden, daß das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin ein Schlüssel-molekül für die Erhaltung der Differenzierung der Epithelzellen darstellt, und daß dessen Verlust die Invasivität der Zellen bewirkt. Es ist klar, daß sich die Situation bei realen Epithelien (und in Tumoren) komplizierter als im gezeichneten Schema darstellt; so sind beispielsweise viele Epithelien mehrschichtig (Abb. 3).



(1) Der Prozeß der Metastasierung: Eine Karzinomzelle (transformierte Epithelzelle) dissoziiert aus einem Primärtumor und durchbricht die Basalmembran. Da primäre Tumore aus versorgungstechnischen Gründen nur beschränkt wachsen können, müssen sie Anschluss ans Blutgefäßsystem finden (Angiogenese). Gewisse Tumorzellen gelangen dann in den Blut-sowie in den Lymphkreislauf und werden zu entfernten Zielorganen geschwemmt, wo sie sich an den Endothelien der Blutgefäße anheften und sie durchbrechen. Dort können sie als Fernmetastasen wachsen.



(3) E-Cadherin im menschlichen Plattenepithel und in Plattenepithelkarzinomen: Gewebsschnitte eines normalen Schleimhautepithels (a), sowie von gut differenzierten (b), "moderat" differenzierten (c) und schwach differenzierten (d) Plattenepithelkarzinomen des Mund-Rachenraumes. Weiß leuchtend dargestellt ist das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin, das die differenzierten Epithel(karzinom)zellen untereinander verbindet (a,

b), das aber in schwach differenzierten Karzinomen nicht vorhanden ist (d). Sichtbar gemacht wurde das Molekül E-Cadherin durch die Inkubation der Gewebsschnitte mit fluoreszierend präparierten Antikörpern, die dann die fluoreszierenden Farbstoffmoleküle zu den spezifischen E-Cadherin-haltigen Zellstrukturen tragen. Fotografiert mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie.

Foto: Universität GfH Essen/Schäper

Raumes erkrankt waren⁴: Alle *differenzierten* Karzinome der Patienten zeigten E-Cadherin an den Grenzen der Zellen (Abb. 3, b; das Zelladhäsionsmolekül ist auf diesem Schnitt durch den Tumor durch Immunfluoreszenztechnik sichtbar gemacht), ähnlich wie wir es im ursprünglichen Plattenepithel finden (Abb. 3, a). Die *entdifferenzierten* Karzinome hingegen hatten E-Cadherin verloren (Abb. 3, d), während Intermediärformen auch eine intermediäre Expression zeigten (Abb. 3, c). Interessanterweise waren die Lymphknotenmetastasen dieser Mund-Rachentumore generell E-Cadherin negativ. Diese Daten zeigen, daß das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin in der Tat als guter Marker für die weniger gefährlichen, differenzierten Karzinome gelten kann, während die Abwesenheit dieses "Leims" zwischen den Zellen die Karzinome "lockerer" macht, sie endifferenziert und anscheinend die Metastasierung zu den Lymphknoten fördert.

Erhöhte Zell-Mobilität: Der "Scatter-Faktor"

Es sind heute verschiedene Zellmobilitätsfaktoren bekannt, die die Wanderung von Tumorzellen beeinflussen, etwa der autokrine Motilitätsfaktor, der Scatter-Faktor, der *migration-stimulating factor* sowie der Fibroblasten-Wachstumsfaktor. Das Gemeinsame dieser Faktoren ist, daß es Proteine sind, die die Zellen in Kultur zu stark erhöhter Wanderung verleiten und die damit eine Rolle bei der Invasivität und Metastasierung von Tumorzellen spielen könnten. Die Gruppe um L. Liotta am Washingtoner National Institute of Health hat beispielsweise kürzlich gezeigt, daß der autokrine Motilitätsfaktor im Urin von Blasenkarzinompatienten gemessen werden kann, und daß eine Korrelation zwischen der Invasivität der Karzinome und der Menge des Faktors besteht.

Der sogenannte Scatter-Faktor wurde in der Mitte der 80er Jahre

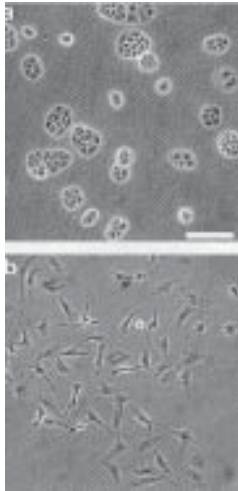
durch den erfahrenen Zellbiologen Sir Michael Stoker in Cambridge entdeckt. Stoker wollte damals Epithelzellen aus Brustgewebe zusammen mit Bindegewebszellen (Fibroblasten) kultivieren und stellte fest, daß er die Epithelzellen nicht mehr von den Fibroblasten unterscheiden konnte. Die Fibroblasten produzierten anscheinend einen Faktor, der Epithelzellen dissoziiert (engl. to scatter), sie also in einen entdifferenzierten Zustand überführen und mobil machen kann (Abb. 4). Wir konnten - auf diesem Ansatz aufbauend - nachweisen, daß Stoker's Scatter-Faktor in geeigneten in-vitro Assays die Invasivität von Karzinomzellen bewirkt. Damit war für uns die Zeit gekommen, mehr in diesen Faktor zu "investieren". Zunächst wurde der Scatter-Faktor in unseren Labors aus Fibroblasten gereinigt und die Aminosäuresequenz von Teilpeptiden des Proteins bestimmt. Mit dieser Information konnten wir dann die komplementäre DNS für den Faktor isolieren und sequenzieren⁵.

Nach unseren Daten ist der Scatter-Faktor ein Protein mit 728 Aminosäuren (Abb. 5, a). Die ersten 31 Aminosäuren sind für die Sekretion des Faktors aus den Fibroblasten verantwortlich und tauchen im endgültigen Molekül nicht mehr auf. Die Aminosäuren 128-494 bilden vier komplizierte Substrukturen, die man nach einem dänischen Gebäck "Kringels" nennt (Abb. 5, b). Zwischen den Aminosäuren 494 und 495 (*Arg-Val*) wird der Scatter-Faktor durch eine noch unbekannte Protease in zwei Untereinheiten gespalten, eine schwere (mit den "Kringels") und eine leichte Kette, die aber noch über Schwefelbrücken miteinander verbunden sind. Die leichte Kette zeigt Sequenzähnlichkeiten zu den sogenannten Serin-Proteasen. Die Sequenzanalyse hat weiter gezeigt, daß der Scatter-Faktor identisch zu einem anderen Faktor ist, den japanische Forschungsgruppen kürzlich als Hepatozyten-Wachstumsfaktor

identifiziert haben. Die internationale Wissenschaftszeitschrift NATURE hat den Scatter/Hepatozyten-Wachstums-Faktor inzwischen wegen dieser doppelten Aktivität der Faktor wirkt motilitäts- und wachstumssteigernd- als *Janus-Faktor* bezeichnet⁶. In Zusammenarbeit mit dem Labor Comoglio, Turin, und in Konkurrenz mit den Labors Aaronson und Vande Woude, USA, haben wir in diesem Jahr auch das Zielmolekül (den Rezeptor) des Scatter-Faktors auf Epithelzellen charakterisiert: Das *c-Met*-Protoonkogen, das eine transmembrane Tyrosinkinase kodiert.

Metastasierung: Hemmende und fördernde Faktoren

Es würde den Rahmen des Berichts überschreiten, wollte man an dieser Stelle alle anderen im Metastaseprozeß wichtigen Moleküle darstellen, die zur Zeit weltweit von verschiedenen Forschungsgruppen untersucht werden. Zwei interessante Ergebnisse sollten hier aber dennoch genannt werden, die in den letzten Monaten große Beachtung gefunden haben. Schon vor Jahren hatten Siegfried Matzku und seine Mitarbeiter vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg monoklonale Antikörper hergestellt, die metastasierende Pankreaskarzinomzellen der Ratte erkennen, nicht aber die nicht-metastatischen Varianten dieser Zellen. Eine Forschergruppe des Instituts für Genetik der Universität Karlsruhe unter der Leitung von P. Herrlich hat jetzt das entsprechende Zelloberflächenmolekül der metastatischen Zellen kloniert und im Detail charakterisiert. Es handelt sich um eine Variante des Zelladhäsionsmoleküls CD44. Durch Überführung der komplementären DNS für dieses Molekül gelang es dieser Gruppe, *niedermetastatische Tumorzellen* in *hochmetastatische* zu verwandeln. Die Gruppe um L. Liotta hat dagegen kürzlich ein Gen entdeckt (das *non-metastatic*-Gen *nm 23*), das in niedermetastatischen Maus-



(4) Scatter-Faktor: dissoziierende Epithelzellen als Modell für invasive Karzinome. Epithelzellen wachsen in Zellkultur generell als Verband, wie die vielen Gruppen von 5-10 Zellen in (a) zeigen. Nach Zugabe von rein dargestelltem Scatter-Faktor (b) dissoziieren die Zellen (engl. "to scatter") und scheinen untereinander keinen Kontakt mehr zu wünschen. Der Scatter-Faktor überführt die Epithelzellen also von einem differenzierten (a) in einen entdifferenzierten Zustand (b). Die Zellen in (a) können also als Modell für differenzierte und weniger gefährliche, die Zellen in (b) für entdifferenzierte und auch stärker invasive Karzinome angesehen werden.

Foto: Universität GH Essen/Waidner

Tumorzellen stärker exprimiert wird als in hochmetastatischen Varianten. Durch Übertragung der entsprechenden komplementären DNS gelang es der Washingtoner Gruppe, *hochmetastatische Maus-Zellen wieder in niedermetastatische zurückzuführen*. Auch diese beiden Beispiele zeigen deutlich, daß es Moleküle gibt, die die Metastasiererung entweder wie der Scatter-Faktor fördern, oder sie wie E-Cadherin hemmen.

Entwicklungswege zur Therapie

Es dürfte deutlich geworden sein: Die biologischen Vorgänge bei der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen sind von sehr komplexer Natur. Die verschiedenartigen Prozesse wie Proteolyse, Zelldissoziation und -wanderung, Zellaggregation, Angiogenese, usw. müssen dabei in einer geregelten Ordnung ablaufen. Diese Prozesse sind dem Zell- und Entwicklungsbiologen vor allem aus einem anderen Zusammenhang heraus vertraut: Vieles bei der Invasion und Metastasierung von Tumorzellen erinnert an ähnliche Vorgänge bei der Embryonalentwicklung - beispielsweise an die komplizierte Wanderung von zukünftigen Melanozyten aus der embryonalen Neuralleiste durchs Mesenchym in die Epithelien der Haut, oder etwa an die notwendige Blutversorgung der embryonalen Niere durch plötzliches Einwandern von Endothelien. Bei der Metastasierung geschieht dies alles allerdings am falschen Ort und auch zur falschen Zeit. Wegen dieser Ähnlichkeit der Prozesse interessieren sich viele Tumorforscher für die Ergebnisse der Entwicklungsbiologie - und umgekehrt: Auch aus der wissenschaftlichen Klärung der Embryonalentwicklung heraus sind sehr wohl Antworten auf die Fragen zu erwarten, vor die uns die Prozesse von Invasivität und Metastasierung stellen. Daß daneben an diesen Prozessen verschiedenartige Moleküle wie Zelladhäsionsmoleküle, Proteasen und Motilitätsfaktoren

direkt und indirekt beteiligt sind, konnte hier an einigen Beispielen gezeigt werden. Gerade in letzter Zeit sind jedes Jahr eine Reihe solcher neuer Moleküle ins Blickfeld geraten, und die Tendenz ist immer noch steigend. Dieser Fortschritt ist nicht zuletzt auf die Tatsache zurückzuführen, daß die Techniken der Rekombination von Nukleinsäuren in unsere Labors Einzug gehalten haben.

Die heute in der Grundlagenforschung erprobten Verfahren werden zunächst in der Diagnose von Krebserkrankungen Anwendung finden. Besonders die Analyse des "Kommens und Gehens" von kritischen "Metastasemolekülen" wird eine frühere Erkennung der gefährlichen Tumore ermöglichen, wie wir es im Fall des *autokrinen Motilitätsfaktors* bei Blasenkarzinomen sowie des E-Cadherins bei Karzinomen des Hals-Nasen-Ohrenbereichs im Prinzip bereits dargestellt haben. Hinsichtlich neuer Therapiemöglichkeiten könnte die Interferenz über Moleküle an den Zelloberflächen der Tumorzellen nutzbar gemacht werden: Wir denken dabei an interferierende Liganden, beispielsweise an genetisch veränderte Motilitätsfaktoren, die die Motilität selber nicht mehr bewirken, aber das native Molekül vom Rezeptor verdrängen, an rekombinante Proteaseinhibitoren, an lösliche Zelloberflächenrezeptoren, wie beispielsweise an ein nicht mehr zellgebundenes variantes CD 44. Dank der bereits angesprochenen neuen Technologien lassen sich solche Moleküle heutzutage leicht herstellen. Beim Blasenkarzinom könnte man solche interferierenden neuen Technologien lassen sich solche Moleküle heutzutage leicht herstellen. Beim Blasenkarzinom könnte man solche interferierenden neuen Technologien lassen sich solche Moleküle heutzutage leicht herstellen. Beim Blasenkarzinom könnte man solche interferierenden neuen Technologien lassen sich solche Moleküle heutzutage leicht herstellen.

Es lassen sich aber auch Strategien denken, bei denen wir über niedermolekulare Substanzen - also zellmembran-durchlässige Moleküle - interferieren. Auf diese Weise



(5) Molekulare Struktur des Scatter-Faktors: Oben die von uns vorge-schlagene Aminosäure-Sequenz des Scatter-Faktors, wie wir sie aus der Sequenz der entsprechenden DNS bestimmt haben. Unten ein vereinfachtes Strukturmodell des Scatter-Faktors: Das mature Molekül besteht aus einer kurzen N-terminalen Sequenz (Aminosäuren 32-137, H-

Kette), aus vier sogenannten "Kringel"-Modulen (Aminosäuren 128-494), sowie der durch Proteolyse (zwischen Arginin¹⁹⁰ und Valin¹⁹¹) abgespaltenen leichten Kette (L-Kette). Peptide (a-f), deren Aminosäuresequenz in unseren Labors bestimmt wurden, sind in beiden Figuren fett markiert.

Grafik: Universität GH Essen/Edler

könnten wir versuchen, den differenzierten Phänotyp von Karzinomen zu verstärken, indem wir kritische Tyrosinkinasen, beispielsweise *c-Met*, hemmen. Neue Technologien zur Überbrückung der Zellmembranen mit Hilfe geeigneter retroviraler Vektoren würden es auch erlauben, über Makromoleküle korrigierend in der Zelle einzugreifen. Mit Hilfe von E-Cadherin in retroviralen Vektoren könnten wir so versuchen, entdifferenzierte Tumore des Mund-Rachenraumes wieder zur Differenzierung zu bringen⁸. Damit wir auf diesem Weg

jedoch auch längerfristig Erfolg haben, müssen wir uns noch über eine ganze Reihe von kritischen Zellkomponenten und Mechanismen Klarheit verschaffen, die die Prozesse der Invasivität und Metastasierung bewirken oder verhindern. Trotz aller Hoffnungen, zu denen die derzeitige Forschung durchaus Anlaß gibt, wird es jedoch *eine* Mittel zur Verhinderung dieser Prozesse auf absehbare Zeit nicht geben: Jeder Tumortyp besitzt seine eigenen kritischen Moleküle und verlangt deshalb auch jeweils eine modifizierte Strategie.

SUMMARY

The generation of malignant tumors in humans is a multistep process. An accumulation of somatic mutations results in the loss of growth control of the cells involved, induces cell invasiveness and the vascularization of tumors and finally leads to metastasis of certain target organs (fig. 1). In the past decade, much progress has been made in the identification of genes responsible for the loss of growth control in tumors, whereas the specific genes



Foto: Universitätsklinik Essen

involved in the later steps of tumor progression, invasion and metastasis are less well defined. Progress has been made in the past years, which is discussed in this review. On the one hand, invasion and metastasis is promoted by the upregulation of expression of critical components. Proteases (metalloproteases, plasminogen activators etc.) are prime candidates in this group because these molecules can generate the necessary space for the invading tumor cells. Cell adhesion molecules are also thought to be involved because the invading cells continuously make new contacts on their migratory pathway. For instance, a splice variant of the putative cell adhesion molecule CD44 has been discovered which, after transfection of the corresponding cDNA into low metastatic cells, increases metastatic potential. Motility factors and growth factors which influence cell motility can also affect invasive behaviour. For instance, scatter factor promotes the invasiveness of epithelial cells in vitro. Recently, the cDNA for the receptor of autocrine motility factor which appears to be involved in the progression of bladder carcinomas, has been characterized (fig. 2, 4 and 5).

On the other hand, invasion and metastasis is also promoted by downregulation of expression of a different class of molecules. The antagonists of proteases, protease inhibitors, are prime candidates here. Cell adhesion molecules are involved as well, because the invasive cells break off contacts of the tissue of origin. For instance, downregulation of expression of the epithelium-specific cell adhesion molecule E-cadherin leads to increased motility and invasiveness of carcinoma cells in culture, and transfection with E-cadherin cDNA can reverse this (fig. 2). Downregulation of E-cadherin expression was also detected in poorly differentiated squamous cell carcinomas of head and neck, and particularly in the corresponding lymph node me-

tastases (fig. 3). Recently, the *nm 23* gene was discovered: Transfection of the *nm 23* cDNA can suppress metastatic potential.

A variety of molecules potentially important in invasion and metastasis have now been identified. In some cases, even the molecular mechanisms by which these proteins influence malignant behaviour are known. It will now be important to search for the actual mutations responsible for invasive and metastatic behaviour of human tumors. Such mutations could in principle either affect the structural genes of components directly involved in invasion and metastasis, or they could indirectly influence the regulatory systems of these genes. The identified candidate genes responsible for invasiveness/metastasis have now to be investigated for both these types of mutations in human tumors.

Der Autor:

Prof. Dr. phil. nat. Walter Birchmeier ist seit Mai 1988 Professor für Molekulare Zellbiologie am Universitätsklinikum Essen und Leiter der Arbeitsgruppe "Zell- und molekularbiologische Grundlagen der Invasivität und Metastasierung maligner Zellen" sowie - zusammen mit Prof. Manfred Rajewsky und Prof. Gerhart U. Ryffel - der Arbeitsgruppe "Zell- und Molekularbiologische Grundlagen der Diagnostik und Therapie maligner Erkrankungen" am Essener Institut für Zellbiologie (Tumorforschung), IFZ. Nach dem Doktorat am Institut für Biochemie der Universität Zürich in den Jahren 1973 bis 1978 Aufenthalte als Postdoc bei Prof. G. Schatz an der Cornell University Ithaca, New York, am Biozentrum Basel und bei Prof. J. Singer, University of California, San Diego. 1979 übernahm Dr. Walter Birchmeier die Oberassistenten am Laboratorium für Biochemie der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich; ab 1982 war er Arbeitsgruppenleiter am Friedrich Miescher Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft in Tübingen. Prof. Walter Birchmeier erhielt 1990 den Wilhelm-Warner-Preis für Krebsforschung.

Anmerkungen:

1) An dieser grundlegenden Arbeit war Dr. B. Imhof, heute Basler Institut für Immunologie, maßgeblich beteiligt.

- 2) Dieser Erkenntnissschritt beruht auf den Untersuchungen von Dr. Jürgen Behrens.
- 3) Die Untersuchung führte Dr. Uwe Frisen durch.
- 4) Die Untersuchung der Plattenepithelkarzinome auf E-Cadherin übernahm Dr. Jörg Schipper.
- 5) Die Arbeiten an Scatter-Faktor verdanken wir Dr. Michael Weidner.
- 6) NATURE, in der Ausgabe vom 5. Sept. 1991 (Vol. 353, p. 20).
- 7) Forschungsprojekt Otto, Birchmeier, Rübben.
- 8) Forschungsprojekt Schipper, Jahnke, Birchmeier.

Literatur:

- Basset G, Bellocq JP, Wolf C, Stoll I, Hutin P, Limacher JM, Podhajcer OL, Chenard MP, Pio MC, Chambon P (1990) A Novel Metalloproteinase Gene Specifically Expressed in Stromal Cells of Breast Carcinomas. NATURE 348: 699-704
- Behrens J, Weidner KM, Frisen U, Schipper JH, Sachs M, Arakaki N, Daikuhara Y, Birchmeier W (1991) The Role of E-Cadherin and Scatter Factor in Tumor Invasion and Cell Motility. IN: Goldberg ID (1991) Cell Motility Factors: 109-126; Birkhäuser Verlag, Basel
- Frisen U, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Löchner D, Birchmeier W (1991) E-Cadherin-mediated Cell-Cell Adhesion Prevents Invasiveness of Human Carcinoma Cells. J CELL BIOL 113: 173-185
- Günther U, Hoffman M, Rudy W, Reber S, Zöllner M, Haussmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P (1991) A New Variant of Glycoprotein CD44 Confers Metastatic Potential to Rat Carcinoma Cells. CELL 65: 13-24
- Leone A, Flatow U, King CR, Sandeen MA, Margulis IMK, Liotta LA, Steeg RS (1991) Reduced Tumor Incidence, Metastatic Potential, and Cytokine Responsiveness of *nm 23*-Transfected Melanoma Cell. CELL 65: 25-35
- Liotta LA, Mandler R, Murano G, Katz DA, Gordon RK, Ching PK, Schiffmann E (1986) Tumor Cell Autocrine Motility Factor. PROC NATL ACAD SCI USA 83: 3302-3306
- Takeichi M (1991) Cadherin Cell Adhesion Receptors as a Morphologic Regulator. SCIENCE 251: 1451-1455
- Warr RM (1991) The Janus Factor. NATURE 353: 20
- Weidner KM, Arakaki N, Hartmann G, Vandekerckhove J, Weingart S, Rieder H, Fontatsch C, Tsubouchi H, Hishida T, Daikuhara Y, Birchmeier W (1991) Evidence for the Identity of Human Scatter Factor and Human Hepatocyte Growth Factor. PROC NATL ACAD SCI USA 88: 7001-7005
- Weidner KM, Behrens J, Vandekerckhove J, Birchmeier W (1990) Scatter Factor: Molecular Characteristics and Effect on the Invasiveness of Epithelial Cells. J CELL BIOL 111: 2097-2108

Der Sonderforschungsbereich 354 "Genetische und Biochemische Grundlagen der Kanzerogenese und Metastasierung" und das Graduiertenkolleg "Zell- und Molekularbiologie normaler und maligner Zellsysteme"

Tumorforschung:

Schwerpunkte der Förderung

Das Essener Universitätsklinikum mit dem Westdeutschen Tumorzentrum, in dem die onkologische Diagnostik und Therapie koordiniert werden, ist eines der Schwerpunktzentren auf dem Gebiet der Tumorforschung in der Bundesrepublik. Mit der Gründung des Westdeutschen Tumorzentrums Essen im Jahre 1977, in dem klinisch und theoretisch-experimentell arbeitende Institutionen zusammengefaßt wurden, beabsichtigte man, der klinischen Onkologie eine qualitativ ausgewiesene Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Tumorforschung an die Seite zu stellen. Ein entscheidender Schritt zur Verwirklichung dieser Absicht war die Gründung des Sonderforschungsbereichs 102 *Experimentelle und klinische Leukämie- und Tumorforschung*, der nach 13 Jahren Förderung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) Ende 1991 auslief.

Dieser Sonderforschungsbereich, unter dessen Dach zeitweise bis zu 17 verschiedene Forschergruppen von der DFG mit Perso-

nal- und Sachmitteln gefördert wurden (Gesamtförderung während der 13 Jahre etwa 26 Mio. DM), ermöglichte vielen Arbeitsgruppen nicht nur eine kompetitive und international anerkannte experimentelle Forschung zu betreiben, sondern schuf auch ein zunehmend notwendig werdendes Forum für einen intensiven Gedankenaustausch, für Diskussionen und neue

Bericht

Kooperationsmöglichkeiten. Das Spektrum der am SFB 102 beteiligten Wissenschaftler und Methodenreichte von der molekulargenetischen, zell- und entwicklungsbiologischen sowie virologischen Grundlagenforschung mit ihren Schwerpunkten in der Kanzerogenese und Tumorbologie über die klassische und molekulare Zytogenetik, die Immunogenetik und die zelluläre Immunbiologie bis hin zur experimentellen Therapieforschung und

Pharmakokinetik und deren diagnostisch-therapeutischen Anwendungen in der klinischen Onkologie. Nahezu 800 Veröffentlichungen sind in den Jahren der Förderung aus dem SFB in nationale und internationale Journale eingeflossen; die am SFB beteiligten Wissenschaftler haben auf zahlreichen internationalen Symposien und Kongressen referiert und sind für ihre Arbeiten durch Preise ausgezeichnet worden. Und nicht zuletzt wirkte der SFB wie beabsichtigt als "Katalysator": Die gemeinsamen Aktivitäten der beteiligten Institutionen trugen ebenso wie die erzielten wissenschaftlichen Ergebnisse wesentlich zu einer intensiveren Verzahnung der Experimentalforschung mit den klinischen Einrichtungen und somit zu einer Verbesserung der Forschungsqualität auf den Grenzgebieten von klinischer und experimenteller Krebsforschung bei.

Aus den wegweisenden Erfahrungen mit dem SFB 102 heraus beschloß Ende 1990 ein Teil der Forschungsgruppen, ein weiteres Arbeitsvorhaben bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft zu beantragen. Nach der Prüfung des Konzepts und der einzelnen Forschungsprojekte durch Gutachter, die Deutsche Forschungsgemeinschaft und den Wissenschaftsrat wurde der neue Sonderforschungsbereich von allen Gremien befürwortet und zum 1. Januar 1992 für eine erste Förderperiode von drei Jahren unter dem Titel *Genetische und biochemische Grundlagen der Kanzerogenese und Metastasierung* am Essener Universitätsklinikum eingerichtet. Obwohl sein Forschungsschwerpunkt zur Zeit mehr auf der grundlagenorientierten experimentellen Tumorforschung liegt, werden sich auch Arbeitsgruppen aus den klinischen Bereichen und Forschergruppen aus den Instituten für Zellbiologie, Molekularbiologie, Humangenetik, Pharmakologie (Tumorforschung), Biochemie, Anatomie, der Inneren Klinik und Poliklinik (Tumorforschung) sowie der Urologischen Klinik und Poliklinik beteiligen. Im Einzelnen beinhaltet der neu eingerichtete SFB 354 folgende Forschungsvorhaben:

• Eine Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit der Bedeutung enzymatischer Reparaturprozesse für die Sequenz-spezifische Mutagenese und Kanzerogenese.

• Drei Arbeitsgruppen untersuchen die Regulation der Expression viraler und zellulärer Gene sowie die Funktion und die spezifische Bedeutung von modulierenden Faktoren in der Genexpression (Transkription) für die Proliferation und Differenzierung normaler und maligner Zellsysteme.

• Drei weitere Arbeitsgruppen suchen in bestimmten Genombereichen transformierter Zellen, bzw. Zellen spezifischer Tumore negativ regulierende Kontrollgene, um diese strukturell und funktionell zu analysieren. Die Bedeutung dieser einem rezessiven Effektmodus folgenden Tumorsuppressorgene für die Genregulation und damit für die Regulation der Proliferation und maligne Transformation von Zellen ist erst in den letzten Jahren erkannt worden.

• Zwei Gruppen versuchen die spezifischen Prozesse in der Signaltransduktion und ihre Bedeutung für die Proliferationskontrolle zu klären, eine Aufgabe, die trotz ihrer Bedeutung in der deutschen Tumorforschung bisher nur von wenigen Arbeitsgruppen bearbeitet wird.

• Vier Teilprojekte beschäftigen sich mit zell- und molekularbiologischen Fragen des invasiven Wachstums und der Metastasierung von Tumorzellen. Während eine Reihe von Genen, bei denen Mutationen den Verlust der Wachstumskontrolle bewirken, schon relativ gut untersucht sind, weiß man über die für das invasive Wachstum und die Metastasierung verantwortlichen Gene noch recht wenig - obwohl gerade die Funktionen dieser Gene von entscheidender Bedeutung für den Verlauf von Tumorerkrankungen und für das

Schicksal von Tumorpatienten sind.

Wichtig für die Kontinuität der durch die Sonderforschungsbereiche stimulierte wissenschaftliche Arbeit ist nicht nur die intensive Diskussion zwischen den im Westdeutschen Tumorzentrum Essen zusammengefaßten und um ihn herum angesiedelten Forschergruppen, sondern auch die Integration dieser Arbeit in die Ausbildung. In den mehr als 30 Forschergruppen, deren Forschungsarbeit durch die DFG im Rahmen des SFB 354 oder Einzelanträge, durch das BMFT und andere staatliche und private Einrichtungen gefördert wird, promovieren neben Medizinern jährlich auch eine Vielzahl von Naturwissenschaftlern. Um die Förderung dieser herausragenden jungen Wissenschaftler, die ihr Studium beendet haben und vor ihrer Promotion stehen noch optimaler zu gestalten, wurde am Universitätsklinikum Essen von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im letzten Jahr das Graduiertenkolleg *Zell- und Molekularbiologie normaler und maligner Zellen* eingerichtet. Die Fördermittel - 790.000 DM für drei Jahre - werden zu 65 Prozent von der DFG und zu 35 Prozent vom Land Nordrhein-Westfalen übernommen.

Im Rahmen dieses Graduiertenkollegs können die Forschungsgegenstände und die vielfältigen Methoden der verschiedenen, am Tumorzentrum Essen arbeitenden Forschungsgruppen zusammengeführt werden, um den jungen Nachwuchswissenschaftlern (Doktoranden) über die spezielle Thematik ihrer Arbeit hinaus eine breite zell- und molekularbiologische Ausbildung zu vermitteln. Ziel ist die optimale Förderung besonders qualifizierter und hochbegabter Doktoranden, die aus der Biochemie, Biologie und Medizin kommen und mit tumorbiologischen Fragestellungen promovieren wollen. Durch das interdisziplinäre Ausbildungs- und Studienprogramm wird eine gezielte Förderung auch auf dem oft vernachlässigten Gebiet der

klinisch orientierten Grundlagenforschung angestrebt.

Zwischen Oktober und Dezember 1991 wurden aus einer Vielzahl von Bewerbungen 10 Doktoranden ausgesucht, die inzwischen mit ihrer Promotionsarbeit begonnen haben. Aus dem Kreis der bereits am Universitätsklinikum beschäftigten Doktoranden werden ergänzend weitere Nachwuchswissenschaftler in das Graduiertenkolleg aufgenommen. Ihnen stehen nun zusätzlich zu den von der Universität angebotenen Lehrveranstaltungen besondere Vorlesungen, Seminare und Praktika zur Verfügung, die von den am Kolleg beteiligten Wissenschaftlern durchgeführt werden. Außerdem ermöglicht es die Förderung, die Stipendiaten während ihrer Ausbildung für kurze Zeit an in- und ausländische Forschungszentren zu schicken.

Abgesehen von diesen Initiativen wurde auch von der Medizinischen Fakultät der Universität Essen der Tatsache Rechnung getragen, daß Zellbiologie, Molekularbiologie, molekulare Genetik und Biochemie bei der Aufklärung von Mechanismen der Tumorentstehung und Tumorpromotion in den letzten Jahren enorm an Bedeutung gewonnen haben. Mit der räumlichen und personellen Erweiterung der Institute Zellbiologie und Molekularbiologie, der Einrichtung einer Professur für "Molekulare Genetik" am Institut für Humangenetik und durch die Besetzung einer Reihe von Lehrstühlen (Pharmakologie, Virologie, Immunologie) mit Wissenschaftlern, deren Arbeitsgruppen mit molekular- und zellbiologischen/biochemischen Methoden die Kontrollmechanismen der Tumorentstehung und Tumorpromotion zu klären versuchen, konnte das Universitätsklinikum Essen mit dem Westdeutschen Tumorzentrum seinen Stellenwert auf dem Gebiet der bundesdeutschen Krebs-Grundlagenforschung festigen.

Helmut Esche/Walter Birchmeier
Sprecher des SFB 354/Sprecher des Graduiertenkollegs

Kreislernkungen des Auges sind ein international anerkannter Forschungsschwerpunkt des Essener Universitätsklinikums. Die Untersuchungen des Instituts für Humangenetik zur Entstehung des Retinoblastoms haben die Krebsforschung nicht nur theoretisch ein entscheidendes Stück nach vorn gebracht, sie ermöglichten darüber hinaus der Essener Augen-klinik, die diagnostischen Rahmenbedingungen für die Früherkennung dieser Kreislernkrankung in Risikofamilien deutlich zu verbessern.

Notwendig für die Regulation des Zellzyklus

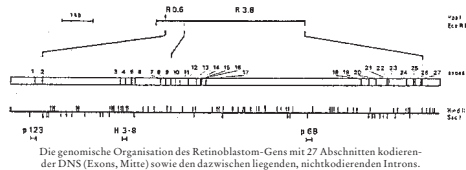
Die Rolle des RB1-Anti-Onkogens bei der Entstehung von Retinoblastomen / Von Bernhard Horsthemke*

Einige seltene Krebsarten treten in bestimmten Familien häufiger als

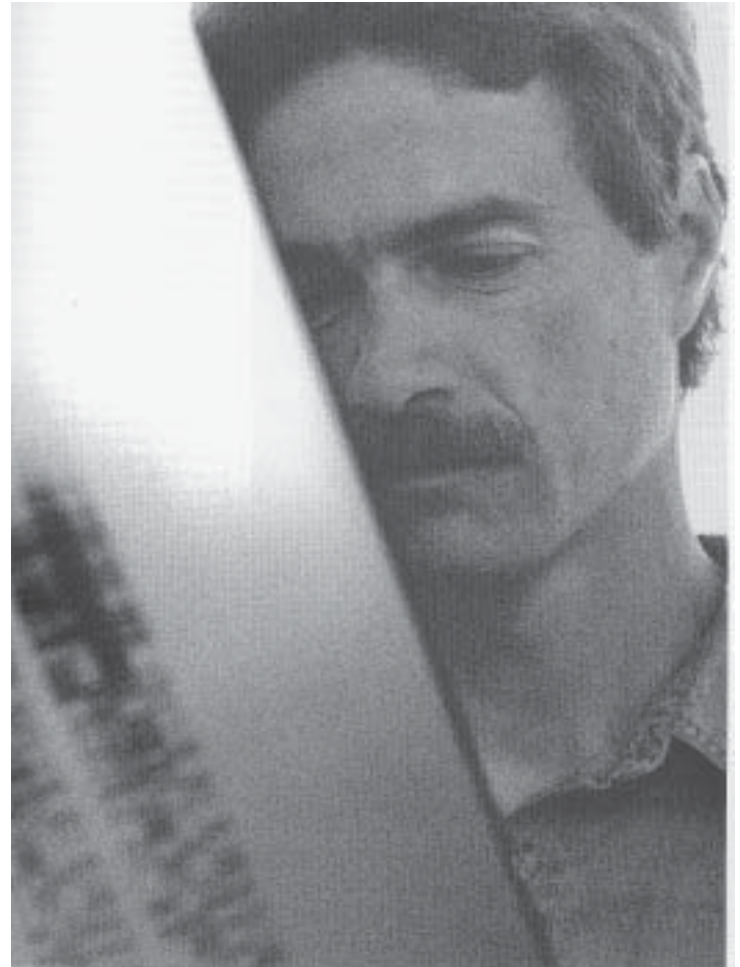
statistisch erwartet auf. Dabei kann die Häufigkeit der Erkrankung von Familienangehörigen mehr als tausendfach höher als im Bevölkerungsdurchschnitt sein. Außerdem ist zu beobachten, daß die Krankheit entgegen der statistischen Erwartung schon bei jungem Menschen ausbricht, nicht selten bereits in der Kindheit. Familiäre Veranlagung spielt aber auch bei den häufigen Krebsarten wie Brust-, Magen- und Dickdarmkrebs eine Rolle. Familiär gehäuft auftretende Kreislernkrankungen und ein

vergleichsweise junges Alter der Patienten weisen auf eine vererb-bare Disposition für Krebs hin. Die dafür verantwortlichen Gene spielen vermutlich auch bei jenen Kreislernkrankheiten eine Rolle, deren Ausbrechen auf krebsauslösende Umweltfaktoren - kanzerogenen Chemikalien, Strahlungen - zurückzuführen ist. Hinsichtlich der Rolle genetischer Faktoren bei der Krebsentstehung nimmt die Forschung zum Retinoblastom eine besondere Stellung ein: Da die für das Auftreten der Krankheit verantwortlichen

form vermutlich kaum mutationsauslösende Umwelteinflüsse verantwortlich gemacht werden. Hinzukommt, daß die erbliche Disposition für diesen Tumor auf wenige genetische Faktoren zurückzuführen ist. Grundlegende molekulargenetische Zusammenhänge lassen sich daher am Beispiel des Retinoblastoms leichter als an anderen Kreislernkrankungen klären. Frühe Beschreibungen der Krankheit datieren bis ins 16. und 17. Jahrhundert zurück, doch erst Anfang des 19. Jahrhunderts ord-



Mutationen oft schon in utero angelegt sind, können für diese Krebs-



Prof. Bernhard Horsthemke, seit 1986 Leiter des Molekulargenetischen Labors am Essener Institut für Humangenetik

nete Wardrop das Retinoblastom einem eigenständigen Krankheitsbild zu. Die Erkrankung von Geschwisterkindern an Retinoblastom wurde erstmalig 1821 dokumentiert. Daß der erste Fall eines vererbten Retinoblastoms - bei einem Elternteil und einem Kind - erst 1896 beobachtet wurde, liegt darin begründet, daß bis zur Entwicklung operativer Verfahren zur Entfernung erkrankter Augen (*Enukleationstechnik*) im Jahre 1865 fast alle Betroffenen in früher Kindheit verstarben.

Anfang des 20. Jahrhunderts wurde mit der Röntgenbestrahlung eine Therapie eingeführt, die es ermöglichte, den Augapfel zu erhalten. Weitere therapeutische Fortschritte brachten Behandlungsmethoden, die mittels Licht oder Kälte gezielt Gerinnungsprozesse auslösten (*Lichtkoagulation*, *Cryokoagulation*) sowie der Einsatz der modernen Strahlenbehandlung in den Sechziger und siebziger Jahren. Die heutige, relativ hohe Überlebensrate in den industrialisierten Ländern ist schließlich im wesentlichen auf die verbesserte Früherkennung dieser Krankheit zurückzuführen.

Histogenese

Das Retinoblastom gehört zur Gruppe embryonaler Tumoren wie Wilms-Tumor, Neuroblastom oder Medulloblastom. Von der Zellentwicklung her gesehen zählt das Retinoblastom zu den neuroektodermalen Tumoren des Gehirns: Der Tumor entspringt aus einer unreifen Netzhautzelle (*Retinoblast*). Man vermutet, daß ein Retinoblastom umso bösartiger ist, je undifferenzierter die Ursprungsquelle war. Diese Annahme könnte das gelegentliche Auftreten von gutartigen Retinoblastomen (*Retinomen*) erklären, solch ein Tumor könnte von einem relativ reifen Retinoblast abstammen. Da nach Abschluß der Retinaentwicklung im zweiten Lebensjahr kaum noch Retinoblasten vorhanden sind, ist die Entwicklung eines Retinoblastoms in

Chromosom	Tumor
3	- Kleinzelliges Bronchialkarzinom - Nierenkarzinom
5	- Kolorektales Karzinom
11	- Wilms Tumor - Rhabdomyosarkom - Mammakarzinom
13	- Retinoblastom - Osteosarkom - Kleinzelliges Bronchialkarzinom - Mammakarzinom
17	- Kleinzelliges Bronchialkarzinom - Kolorektales Karzinom - Mammakarzinom - Osteosarkom
18	- Kolorektales Karzinom
22	- Meningiome - Akustikusneurinom

(1) Verlust von Chromosomen mit Tumorsuppressor-Genen bei verschiedenen Krebsarten des Menschen.

einem späteren Alter äußerst selten. In der Abbildung 3 ist ein typischer Befund mit einem ausgeprägten Retinoblastom erkennbar. Das Retinoblastom kann *unifokal* oder *multifokal* auftreten (in oder mehrere unabhängige Tumoren). In der multifokalen Form können beide Augen in Mitleidenschaft gezogen werden (*bilateral*), es kann jedoch auch nur ein Auge betroffen sein (*multifokal-unilateral*).

Die verschiedenen Erscheinungsbilder gehen auf zwei Grundtypen der Krankheit zurück: Retinoblastomen können

- nicht erblich (*nicht hereditär*), in Folge einer somatischen (Körperzell-) Mutation in einer Netzhautzelle oder
- erblich (*hereditär*), in Folge einer Keimzell-Mutation entstehen. Die Unterscheidung dieser beiden grundsätzlichen Formen des Retinoblastoms hat entscheidende Bedeutung für die Beurteilung des genetischen Risikos: Die bei etwa 60 Prozent aller Patienten auftretende Form des nicht erblichen Retinoblastoms ist stets einseitig. Die Krankheit nimmt ihren Ausgang von einer einzelnen, verändernten Netzhautzelle. Es findet sich deshalb in dem betroffenen Auge nur ein einziger Tumor (unifokales, einseitiges Retinoblastom). Es ist nicht familiär, eine Erkrankung birgt damit auch kein erhöhtes Risiko für das Auftreten eines Retinoblastoms bei ihren Nachkommen.

Die bei etwa 40 Prozent aller Patienten auftretende erbliche Form des Retinoblastoms beruht auf einer Keimzellen-Mutation, die im Gegensatz zur somatischen in allen Körperzellen vorliegt, weil sie bereits in der befruchteten Eizelle (*Zygote*) vorhanden ist. Es ist meistens beidseitig, kann jedoch auch einseitig vorkommen und ist in der Regel multifokal. Bei etwa 10 Prozent der Betroffenen kann die Erkrankung auf Vererbung der Mutation von einem erkrankten Elternteil und bei 30 Prozent auf eine neue Mutation zurückgeführt werden.

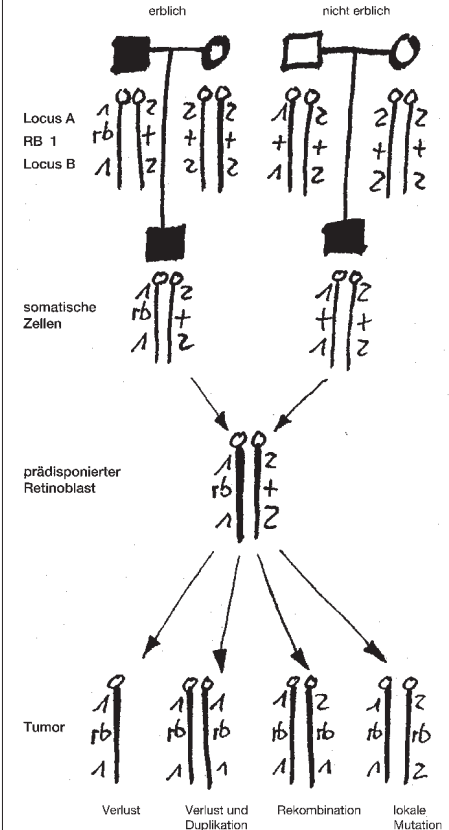
Das hereditäre Retinoblastom ist nicht-geschlechtsgebunden (*autosomal*) dominant erblich. Das heißt, der Träger des Retinoblastom-Gens gibt dieses mit 50-prozentiger Wahrscheinlichkeit an seine Nachkommen weiter. Da nicht alle Träger erkranken, besteht nur eine Wahrscheinlichkeit von insgesamt 45 Prozent für die tatsächliche Entwicklung des Augentumors.

Patienten mit erblicher Prädisposition für Retinoblastom haben auch ein erhöhtes Risiko, im späteren Leben an einem nicht-okulären Zweitumor zu erkranken. Bei der Mehrzahl dieser Zweitumore handelt es sich um Knochenkrebs (*Osteosarcome*). Von therapeutischer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, daß diese Tumore statistisch signifikant häufiger im Bestrahlungsfeld als in allen übrigen Körperregionen vorkommen. Die Strahlentherapie kann also Mutationen auslösen und ist deshalb ihrerseits potentiell krebs erzeugend (*onkogen*).

Mindestens zwei Mutationen

Anhand statistischer Untersuchungen postulierte Knudson 1971, daß der Tumorentstehung zwei geschwindigkeitsbestimmende Mutationsereignisse zugrunde liegen (*Zwei-Treffer Hypothese*). Bei Patienten mit erblicher Prädisposition liegt der erste Treffer in Form einer Keimzellenmutation vor. Bei drei Vierteln dieser Fälle handelt es sich um eine Neumutation, bei einem Viertel um Vererbung einer elterlichen Mutation. Die Tumorbildung wird dann durch eine weitere, somatische Mutation initiiert. Die Zahl der von dieser Mutation getroffenen Retinoblasten eines Genträgers folgt einer Poisson-Verteilung und beträgt im Durchschnitt drei. Deshalb entwickeln diese Kinder in der Regel ein bilaterales Retinoblastom. Ungefähr 10 Prozent der Mutationsträger entgehen einer somatischen Mutation und erkranken nicht (*reduzierte Penetranz*).

Ohne Keimzellenmutation sind zwei somatische Mutationen für die Tumourinitiation notwendig. Da es sehr unwahrscheinlich ist, daß während der Retinaentwicklung mehr als ein Retinoblast von zwei somatischen Mutationen getroffen wird, ist das nicht erbliche Retinoblastom stets unilateral und manifestiert sich später. Da die somatischen Mutationen in diesen



(2) Zwei-Treffer Hypothese der Tumorentstehung. Durch eine Keimzellenmutation im erblichen Fall oder eine somatische Mutation im nicht-erblichen Fall wird ein Wildtypallel (+) des RB1-Gens inaktiviert (rb). Das zweite Allel wird durch chromosomale Mechanismen (chromosomaler Verlust, chromosomaler Verlust/Duplikation, Rekombination) oder lokale Mutationen inaktiviert. Chromosomale Mechanismen führen zum vollständigen oder partiellen Verlust der konstitutionellen Heterozygotie des Chromosoms 13 (vergleiche die Allele der Loci A und B).

Fällen keine Auswirkung auf die Keimbahn haben, besteht hier auch kein genetisches Wiederholungsrisiko für Geschwisterkinder und die eigenen Kinder des Patienten.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, daß diese Mutationen die beiden Allele eines einzelnen Gens auf Chromosom 13 (*RB1-Gen*) betreffen. Auf zellulärer Ebene ist ein mutantes Allel dieses Gens also rezessiv gegenüber dem Wildtyp-Allel. Erst der homozygote Funktionsverlust dieses Gens führt zur Tumorentstehung. Deshalb wurden für das *RB1-Gen* die Begriffe *rezessives Onkogen*, *Tumorsuppressor-Gen* und *Anti-Onkogen* vorgeschlagen.

Mit Hilfe von Chromosom 13-spezifischen DNS-Polymorphismen konnten Cavenee et al. 1983 zeigen, daß etwa 50 Prozent der Retinoblastome infolge mitotischer Non-Disjunktion oder mitotischer Rekombination hemi- oder homozygot für die erste Mutation sind (Verlust konstitutioneller Hetero-

zygotie). Wie die Grafik zur Zweitreffer-Hypothese zeigt, ist hier also das normale Allel am homologen Gen-Locus durch chromosomale Mechanismen verlorengegangen (Abb. 2). In der anderen Hälfte von Fällen handelt es sich bei der zweiten Mutation um ein lokales Ereignis am homologen *RB1-Locus* (Punktmutation, Deletion oder Genkonversion). Zwar ist die zweite Mutation ein seltenes Ereignis pro Zellgeneration, aber sie tritt angesichts der großen Zahl von Retinazellen doch mit hoher Wahrscheinlichkeit auf. Dies erklärt die dominante Vererbung und reduzierte Penetranz bei erblichem Retinoblastom.

Der Verlust konstitutioneller Heterozygotie für das Chromosom 13 spielt nicht nur bei der Retinoblastom-Entstehung, sondern auch bei anderen Tumoren eine Rolle. Dies wurde sowohl für das Osteosarkom, das kleinzellige Bronchialkarzinom und das Mammakarzinom gezeigt.

Das *RB1-Gen* kodiert für ein Zellzyklus-Protein

Das *RB1-Gen* erstreckt sich über 180 Kilobasen (kb). Es besteht aus 27 Exons in der Größe von 31 bp bis 1873 bp (McGee et al. 1989) und wird in eine 4,7 kb große mRNA transkribiert. Am 5'-Ende des Gens ist eine *CpG*-reiche Sequenz auffällig, die für *house-keeping genes* charakteristisch ist. Diese Sequenz schließt den Promotor mit ein. Eine TATA-Box fehlt. Diese strukturellen Befunde stehen im Einklang mit der ubiquitären Expression des *RB1-Gens*.

Die Sequenz der mRNA kodiert für ein DNS-bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 105 Kilodalton (*p105^{RB}*). Das *p105^{RB}* ist während des gesamten Zellzyklus in der Zelle vorhanden. In der *G₂* und *G₁* Phase trägt das Protein keine Phosphat-Gruppen. Unphosphoryliertes *p105^{RB}* scheint den Übergang der Zelle in die S Phase durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren

zu blockieren. Wenn *p105^{RB}* durch Zellzyklus-Kinasen phosphoryliert wird, entläßt es die Transkriptionsfaktoren, die dann jene Gene "anschalten", die für den Fortgang des Zellzyklus notwendig sind. Fehlt intaktes *p105^{RB}*, werden die Zellen nicht zwischen der *G₁* und S Phase blockiert, und sie proliferieren in unkontrollierter Weise.

Interessanterweise können virale Onkoproteine (wie Adenovirus *EA1*, *SV40* Large Antigen, Papilloma *16E7*) das *p105^{RB}* durch Komplexbildung inaktivieren. Schon länger war bekannt, daß bei Ratten Retinoblastome durch intravitreale Injektionen von Adenovirus Typ 12 induziert werden können. Hier wirken also Onkogene und Anti-Onkogene zusammen.

Hilfe für Risiko-Familien

In erblich belasteten Familien kann das Erkrankungsrisiko von Neugeborenen unter Umständen durch DNS-Untersuchungen bestimmt

werden. Mit Hilfe molekulargenetischer Techniken können Mutationen am *RB1-Locus* in Tumorzellen und - bei Patienten mit hereditärem Retinoblastom - auch in Blut- und anderen Körperzellen nachgewiesen werden. Der Nachweis von Mutationen beweist die Identität des *RB1-Gens* und ermöglicht den Nachweis der erblichen Tumordisposition unabhängig von der klinischen Manifestation (*prädiktive DNS-Diagnostik*); dies ist für die humangenetische Beratung, die Tumorfürerkennung und die Abschätzung des genetischen Wiederholungsrisikos von besonderer Bedeutung: Aufgrund der reduzierten Penetranz von Mutationen am *RB1-Locus* können durchaus auch klinisch unauffällige Familienangehörige Träger einer *RB1-Mutation* sein.

Am einfachsten ist der Nachweis größerer Strukturanomalien des *RB1-Gens* wie beispielsweise Deletionen mit Hilfe von Southern Blot Hybridisierung (Horsthemke et al. 1987; Abb. 4). Größere Deletionen liegen in etwa 15 Prozent der Fälle vor. Durch enzymatische DNS-Amplifikation und Sequenzierung der einzelnen Exons können auch Deletionen von wenigen Basenpaaren sowie Punktmutationen nachgewiesen werden. Aufgrund der Heterogenität der Mutationen sowie des hohen technischen und zeitlichen Aufwandes dieser Methoden ist dies jedoch in der Routine-Diagnostik noch nicht praktikabel.

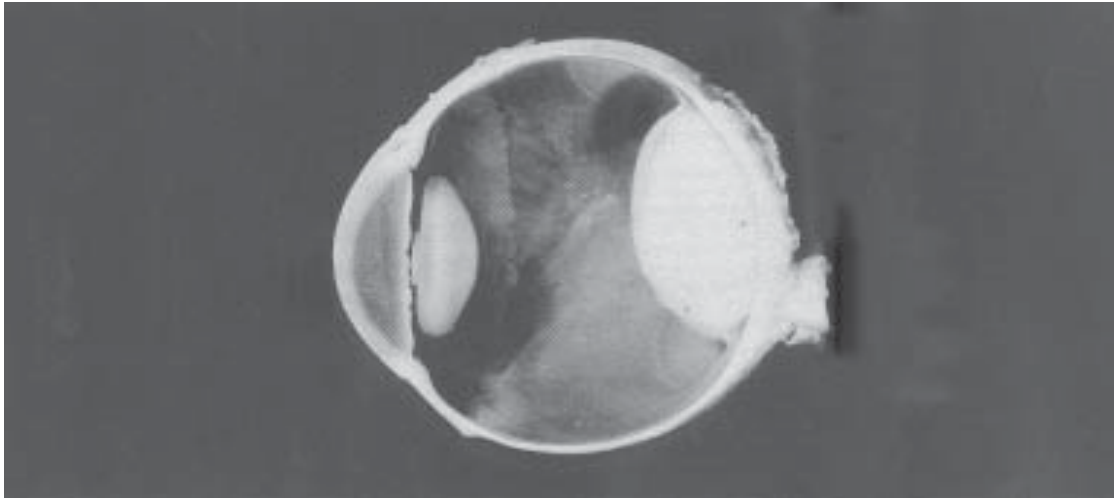
Bei bestimmten Familienkonstellationen kann das die *RB1-Mutation* tragende Chromosom 13 aber auch unabhängig vom direkten Nachweis der Mutation identifiziert werden. Hierzu wird eine Segregationsanalyse mit neutralen DNS-Polymorphismen durchgeführt. Eine solche indirekte Diagnose erfordert die Untersuchung der gesamten Familie. Ferner muß die Familie für mindestens einen der Marker informativ sein. Aufgrund der großen Anzahl von Markern ist dies jedoch bei mehr als 90 Prozent der

Familien gegeben. Da jedoch Marker-Locus und Mutation nicht identisch sind, muß prinzipiell mit der Möglichkeit eines *Cross-overs* zwischen der Mutation und dem Marker und damit einer falschen Diagnose gerechnet werden. Diese Gefahr ist umso größer, je weiter beide Loci auseinander liegen. Bei den heute hauptsächlich verwendeten intragenen Markern kann die Rekombinationsfrequenz jedoch praktisch vernachlässigt werden.

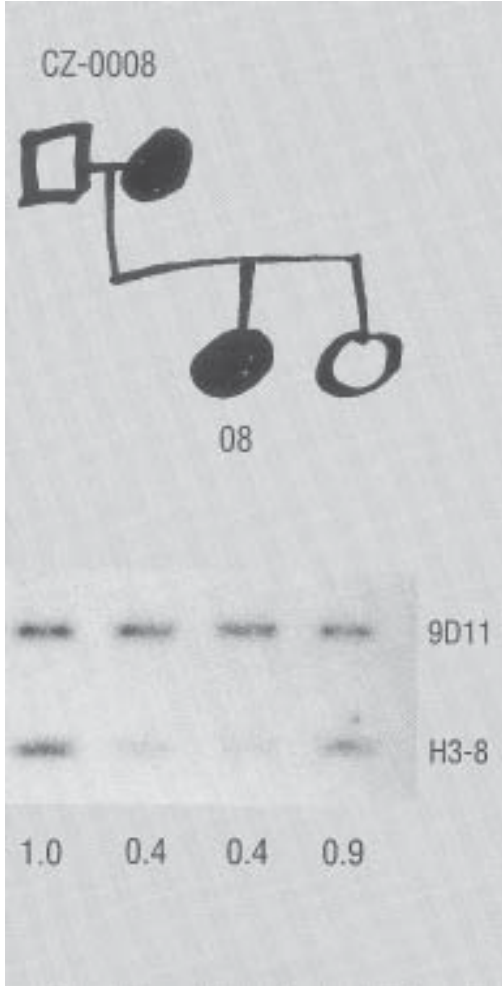
Epigenetische Veränderungen bei nicht-erblichen Retinoblastomen

Die Inaktivierung eines Gens muß nicht unbedingt von einem strukturellen Defekt herrühren. Vielmehr kann die Expression eines Gens auch durch epigenetische Mechanismen ohne Veränderung der Nukleotid-Sequenz beeinflusst werden. Die Methylierung von DNS am 5'-Kohlenstoff des Cytosins innerhalb des Dinukleotids *CpG* wird als ein wesentlicher Faktor der epigenetischen Kontrolle der Genexpression angesehen. So haben Experimente an Zelllinien gezeigt, daß die transiente Expression transifizierter Gene durch Methylierung inhibiert wird und Demethylierung inaktive endogene Gene reaktivieren kann.

Wie oben beschrieben hat das *RB1-Gen* am 5'-Ende eine *CpG*-reiche Sequenz. Die Cytosin-Reste dieser Sequenz sind in der Regel unmethyliert. Bei 10 Prozent der unilateralen Retinoblastomen ist diese Sequenz jedoch methyliert (Greger et al. 1989). Bei bilateralen (hereditären) Tumoren wurde dies bislang nicht gefunden. Ob die Hypermethylierung die Inaktivierung des *RB1-Gens* verursacht hat, aufrecht erhält oder einfach nur widerspiegelt, ist allerdings unklar. Bei der Sequenzierung hypermethylierter Allele wurden bislang keine strukturellen Mutationen gefunden. Es ist deshalb möglich, daß die Hypermethylierung eine Epimutation darstellt. Die Hypermethylierung könnte eine Folge fehlerhafter *de novo* Methylierung



(3) Schnitt durch ein enukleiertes Auge: Links ist die vordere Augenkammer und die Linse sichtbar, rechts ein Retinoblastom.



(4) Nachweis einer RB1-Gen-Deletion auf einem Chromosom 13 mit Hilfe quantitativer Southern Blot Hybridisierung von DNS aus peripheren Blutzellen. Die betroffenen Familienmitglieder haben für die RB1-Gensonde H3-8, die Exon 4 umfaßt, im Vergleich zum Standard 9D11 ungefähr eine halbe Dosis (0.4). Grafik: Universität GH Essen/Horsthemke/M.L.K.S

oder fehlerhafter Beibehaltung eines elterlichen *Imprints* sein.

Tumorprogression

Nach dem homozygoten Funktionsverlust des RB1-Gens sind wahrscheinlich weitere (epi)genetische Ereignisse für die vollständige Transformation der Zelle und für die Tumorprogression verantwortlich. Hinweise darauf geben in Tumorzellen beobachtete Chromosomenaberrationen. *Double minutes* und *homogeneously staining regions*, die in einigen Retinoblastomzelllinien gefunden werden, enthalten amplifizierte Onkogene. In etwa 30 Prozent der Tumoren kann eine Amplifikation und Überexpression des Onkogens *N-myc* nachgewiesen werden. Das RB1-Genprodukt ist jedoch kein Repressor der Expression von *N-myc*, wie zeitweilig angenommen wurde, sondern die Expression von *N-myc* in Tumorzellen ist abhängig davon, ob die Ursprungszelle *N-myc* exprimierte oder nicht.

Cytogenetisch besonders auffällig ist, daß alle bislang untersuchten Retinoblastomzelllinien ein Isochromosom für den kurzen Arm eines Chromosoms 6 (*i(6p)*) haben und/oder trisom für den langen Arm eines Chromosoms 1 sind. Während Trisomie 1*q* auch bei anderen Tumoren zu finden ist, tritt das *i(6p)* fast ausschließlich in Tumorzellen des Retinoblastoms auf. Unter Verwendung von DNS-Polymorphismen für den kurzen und den langen Arm des Chromosoms 6 konnten wir zeigen, daß die Tumorzelle in Folge mitotischer Non-disjunction zuerst trisom für das Chromosom 6 wird, und sich das Isochromosom dann durch transversale Spaltung des Centromers unter Verlust der langen Arme bildet (Horsthemke et al. 1988).

Da das Isochromosom zusätzlich zu zwei normalen Chromosomen 6 vorliegt, sind die Zellen tetrasom für 6*p*. Es wurde vermutet, daß die Isochromosombildung zur Aktivierung des *K-ras1* Pseudogens

auf *6p12-11* oder zur Amplifikation wachstumsfördernder Gene auf *6p* führen könnte. Eine Aktivierung von *K-ras1* konnte jedoch ausgeschlossen werden. Es ist auch möglich, daß die Isochromosombildung die Expression von Genen des Histokompatibilitäts-Komplexes auf *6p21.3* verändert, so daß die Tumorzellen der Erkennung durch die Immunabwehr entgehen. Interessanterweise sind Primärkulturen von Retinoblastom-Zellen zwar immortalisiert, zeigen *in vitro* aber kein invasives Wachstum (Griegel et al. 1990). Die Fähigkeit zu invasivem Wachstum und Metastasierung entwickelt sich offensichtlich sehr spät und scheint von weiteren genetischen Faktoren abhängig zu sein, die beim Retinoblastom jedoch noch nicht bekannt sind.

Ein paradigmatisches Tumorsuppressor-Gen

Das RB1-Gen kann somit als Paradigma für die Funktionsweise von Tumorsuppressor-Genen angesehen werden. Ein Verlust konstitutioneller Heterozygotie wurde auch bei anderen Tumoren und anderen Chromosomen gefunden. Die Aufstellung (Abb. 1) gibt hierfür einige Beispiele. Der Verlust konstitutioneller Heterozygotie deutet auf die Anwesenheit von Tumorsuppressor-Genen auf diesen Chromosomen hin. Keimzellmutationen an diesen Loci können für eine familiäre Tumorprädisposition verantwortlich sein. Neben dem RB1-Gen wurde kürzlich auch das Wilms Tumor-Gen und das Kolonkarzinom-Gen kloniert.

Tumorsuppressor-Gene sind Wildtyp-Allele von Genen, die eine Rolle bei der Zellproliferation, Differenzierung und anderer systemischer Prozesse spielen. Im Gegensatz zu dominant wirkenden Onkogenen wie beispielsweise *N-myc* und *K-ras* ist nicht ihre Aktivierung, sondern ihr Verlust oder ihre Inaktivierung onkogen. Wie die Aufstellung zeigt, kann ein und dasselbe Tumorsuppressor-Gen in

verschiedenen Tumoren inaktiv sein, und mehrere Tumorsuppressor-Gene können in dem selben Tumor inaktiv sein. Bei der Krebsstehung wirken mehrere Onkogene und Tumorsuppressor-Gene zusammen.

SUMMARY

Retinoblastoma belongs to a group of childhood tumors to which predisposition can be inherited as an autosomal dominant trait. The predisposing gene (RB1) has been assigned to chromosome 13. The RB1 gene encodes a cell cycle regulatory protein. Loss of function of both copies of the RB1 gene initiates retinoblastoma tumor formation and plays a role in other cancers. Genes on chromosome 1 and 6 appear to play a role in the progression of retinoblastoma. Various germline and somatic mutations at the RB1 locus have been characterized at the molecular level. In some families, this information can be used for predictive testing and early diagnosis of newborns. The RB1 gene is a paradigm for tumor suppressor genes, which are wild type alleles of genes that play a regulatory role in cell proliferation and differentiation. It is their loss or inactivation that is oncogenic.

Figures: (1) Loss of chromosomes carrying tumor suppressor genes in different classes of human cancer. (2) Two hit hypothesis. Retinoblastoma tumor formation is initiated by the loss of function of both alleles of the RB1 gene. (3) Typical finding of a retinoblastoma. (4) Detection of a RB1 gene deletion by quantitative Southern blot hybridization. Affected family members have only one gene copy.

Der Autor:

Diplom-Chemiker Dr. Bernhard Horsthemke habilitierte sich 1989 an der Medizinischen Fakultät der Universität Essen im Fach

Humangenetik, im März 1992 wurde er zum Professor für Humangenetik, insbesondere Molekulare Humangenetik ernannt. Seit 1986 ist er am Essener Institut für Humangenetik Leiter des Molekulargenetischen Labors. Seine Forschungsschwerpunkte liegen auf den Gebieten der Hereditären Tumoren, der Mikrodeletions Syndrome und der molekularen Analyse des menschlichen Genoms. Prof. Bernhard Horsthemke ist gewähltes Mitglied der Human Genome Organization (HUGO) und Mitglied des Editorial Boards der Zeitschrift PCR METHODS AND APPLICATIONS, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Anmerkungen:

* Für die Zusammenarbeit dankt der Autor Herrn Prof. Dr. Eberhard Passarge, Herrn Prof. Dr. Wolfgang Höpping, Herrn Prof. Dr. Manfred Rajewsky, Herrn Prof. Dr. R. Becher, Frau Dr. Valerie Greger, Frau Dr. Sabine Griegel und Frau Birgit Brandt. Teile der Untersuchungen wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Deutschen Krebshilfe finanziert.

Literatur:

- Cavenee WK, Dryja TP, Phillips RA, Benedict WF, Godbout R, Gallie BL, Murphree AL, Strong LC, White RL (1983) Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. NATURE 305:779-784
DeCaprio JA, Ludlow JW, Lynch D, Furu-kawa Y, Griffin J, Pivnicka-Worms H, Huang CM, Livingston DM (1989) The product of the retinoblastoma susceptibility gene has properties of a cell cycle regulatory element. CELL 58:1085-1095
Greger V, Passarge E, Höpping W, Messmer E, Horsthemke B (1989) Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. HUM GENET 83:155-158
Griegel S, Cheng H, Frötschl R, Hülsler DF, Greger V, Horsthemke B, Rajewsky MF (1990) Newly established human retinoblastoma cell lines exhibit an "immortalized" but not an invasive phenotype *in vitro*. INT J CANCER 46:125-132
Horsthemke B, Barnert HJ, Greger V, Passarge E, Höpping W (1987) Early diagnosis in hereditary retinoblastoma by detection of molecular deletions at the gene locus. LANCET 1:511-512
Horsthemke B, Greger V, Becher R, Passarge E (1988) Mechanism of isochromosome (6*p*) formation in retinoblastoma tumor cells. CANCER GENET CYTOGENET 37:95-102
Knudson AG (1971) Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. PROC NATL ACAD SCI USA 68:820-823
McGee T, Yandell DW, Dryja TP (1989) Structure and partial genomic sequence of the human retinoblastoma gene. GENE 80:119-128

Bernhard Horsthemke:

DNS-Diagnosen für Risiko-Familien

UNIKATE: Herr Prof. Horsthemke, Sie haben sich als Humangenetiker in den letzten Jahren besonders mit einem Netzhaut-Tumor, dem Retinoblastom, beschäftigt. Können Sie die Gründe dafür kurz darstellen?

Bernhard Horsthemke: Zum einen ist die Genetik des Retinoblastoms recht einfach. Zwei Mutationen scheinen auszureichen, um die Tumorbildung zu initiieren. Diese Mutationen betreffen die beiden Allele eines Gens, das man seit 1986 kennt. Zum anderen ist die Essener Augenklinik durch die Arbeit von Herrn Prof. Höpping weltweit eines der größten Zentren für die Diagnose und Therapie dieses Tumors. Die Voraussetzungen, genetische Faktoren bei der Krebsentstehung zu untersuchen, sind hier also besonders günstig.

UNIKATE: Auf welche Erkenntnisse der Retinoblastom-Forschung konnten Sie in ihrer Arbeit bereits zurückgreifen?

Horsthemke: Das für das Retinoblastom verantwortliche Gen, das sogenannte RB1-Gen, wurde erst-

mals in den USA kloniert. Bei einer kleinen Anzahl von Patienten, die außer Retinoblastom noch andere klinische Zeichen aufwiesen - geistige oder körperliche Retardierung - konnte lichtmikroskopisch festgestellt werden, daß genetisches Material vom Chromosom 13 verloren gegangen war. Von daher lag die Vermutung nahe, daß ein Gen auf diesem Chromosom für das Entstehen des Retinoblastoms zumindest mitverantwortlich war. Dann konnte geklärt werden, daß ein Enzym - die sogenannte Esterase-D, die von einem Gen auf Chromosom 13 kodiert wird und einen Protein-Polymorphismus besitzt - sich bei Familien, die in mehreren Generationen unter Retinoblastom litten, zusammen mit dem RB1-Gen vererbt. Sie mußten also eng beieinander liegen. Diese Information hat man ausgenutzt, um sich zu diesem Gen vorzuarbeiten.

UNIKATE: Das Retinoblastom-Gen wurde sozusagen örtlich eingekreist. Ist dies so einfach möglich?

Horsthemke: Nun, einfach ist es nicht, aber inzwischen kann man

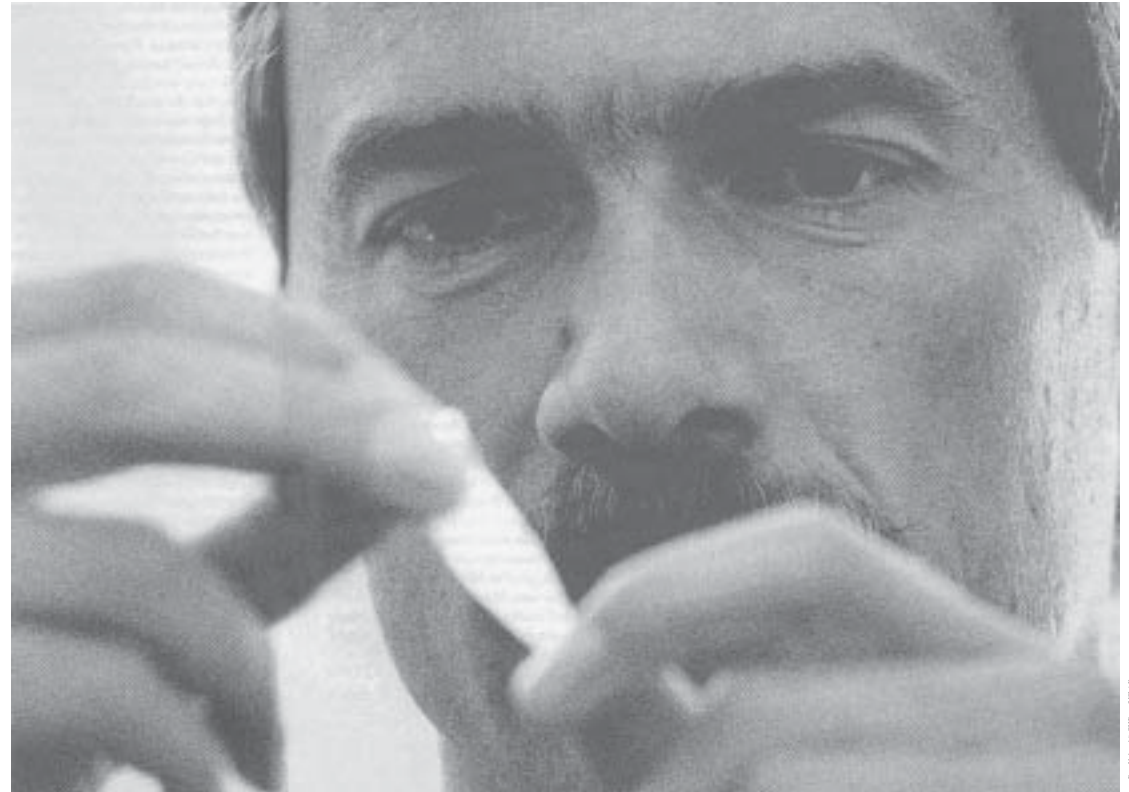


Foto: Universität Göttingen/NSK

Gene klonieren und identifizieren, einzig und allein aufgrund ihrer Position im Chromosom. Das ist einer der wichtigsten Fortschritte, den wir in der Humangenetik in den letzten zehn Jahren erreicht haben. Die traditionelle Arbeitsweise in der Molekulargenetik war bisher das sogenannte funktionelle Klonieren: In der Regel reinigt man ein Protein, bestimmt die Aminosäuren-Sequenz, isoliert das dazugehörige Gen mit molekulargenetischen Techniken und lokalisiert es

schließlich auf dem Chromosom. Dabei geht man also von der Funktion des Proteins aus und versucht es, von daher auf dem Chromosom zu verorten. Das Problem ist nur, daß man bei fast allen Erbkrankheiten gar nicht weiß, welche Funktion gestört ist. Auch beim Krebs weiß man zunächst nur, daß die Zelle "ausrastet": Sie teilt sich einfach weiter. Aber welche Funktion soll man testen? Was ist eigentlich gestört? Man kann diesen Weg beim Krebs und bei vielen anderen

Erbkrankheiten nicht einschlagen. Deswegen mußte man die Sache anders aufzäumen: Man muß von Hinweisen auf die chromosomale Lokalisation ausgehen, also von Hinweisen darauf, wo sich das betroffene Gen befindet. Hierfür sind in den letzten zehn Jahren Techniken entwickelt worden, die eine positionelle Klonierung ermöglichen. Bei dieser Arbeitsweise muß man zunächst herausfinden, auf welchem Chromosom sich das Gen befindet. Beim Retinoblastom

war ja schon bekannt, das es bei einigen Patienten kleine Stückverluste auf dem Chromosom 13 in einer bestimmten Bande, q14, gibt. Dann versucht man, DNS aus diesem Bereich zu klonieren. Dies wird dann nach Genen abgesucht.

UNIKATE: Dies dürfte eine erhebliche, empirische Vergleichsarbeit mit sich bringen?

Horsthemke: Natürlich, die Genstruktur muß ja erst einmal identifi-

ziert werden. Man hat zunächst nur ein Stück DNS und kann weder sagen, ob dieses Stück nun ein Gen oder ein Stück zwischen zwei Genen ist, noch was für ein Gen es ist. Bei der Identifikation des Retinoblastom-Gens kam dabei ein bißchen Glück ins Spiel: Es war mehr oder weniger das erste Gen, das man sich angeschaut hatte. Und hier zeigten sich nun in Retinoblastom-Zellen winzige Strukturveränderungen - eben genau das, was man in einem solchen Fall erwarten würde. Ein

“Das Problem ist, daß man bei fast allen Erbkrankheiten gar nicht weiß, welche Funktionen der Proteine gestört sind. Auch beim Krebs weiß man zunächst nur, daß die Zelle ‘ausrastet’: Sie teilt sich einfach weiter...”

Gen, das neben dem für die Krankheit Verantwortlichen liegt, wäre ja nicht betroffen.

Von diesem Punkt aus kann man dann die Funktion klären. Es ist inzwischen bekannt, daß das Retinoblastom-Gen bei der Zellzyklus-Regulation eine Rolle spielt. Es bremst den Zellzyklus und blockiert damit die unkontrollierte Zellteilung. Wenn das entsprechende Gen auf beiden Chromosomen 13 defekt ist oder fehlt, fehlt auch die bremsende Funktion. So teilt sich die Zelle weiter.

UNIKATE: Hat die Arbeitsweise der positionellen Klonierung auch bei anderen, erblich mitbedingten Krebsformen Ergebnisse erbracht?

Horsthemke: Ja, zum Beispiel beim Dickdarmkrebs. Bei diesem Krebs weiß man inzwischen, das die entsprechenden Gene auf den Chromosomen 5, 17 und 18 liegen. Alle

diese Gene sind identifiziert worden mit der Methode der positionellen Klonierung. Die weitreichendsten Kenntnisse hat bislang jedoch die Forschung zum Retinoblastom-Gen erbracht, das allerdings genetisch ja auch das einfachste zu sein scheint. Zur Initiierung sind wie gesagt nur zwei Mutationen nötig, und Umweltfaktoren spielen kaum eine Rolle - im Gegensatz beispielsweise zum Lungenkrebs.

UNIKATE: Die Technik des positionellen Klonierens eröffnet also einen anderen Weg hin zur Klärung der Funktion eines Gens - oder besser: hin zum Funktionsdefekt. Ergeben sich von daher auch neue Therapie-Ansätze?

Horsthemke: Zumindest ergeben sich Hinweise auf therapeutische Möglichkeiten. Wenn man die Funktion nicht kennt, kann man auch keine Therapie entwickeln, die wirklich an den Ursachen ansetzt. Wenn man weiß, daß dieses Retinoblastom-Protein eine bestimmte Funktion im Zellzyklus ausübt, könnte man sich für die Therapie überlegen, ob man nicht ein anderes Protein dazu bringen kann, die gestörte Funktion mit zu übernehmen. Bei den Patienten mit der erblichen Form des Retinoblastoms ist dieses Protein ja auch in anderen Zellen gestört, deshalb sind sie anfällig für andere Tumoren. Aber trotzdem führt dies signifikant häufiger zur Entstehung eines Retinoblastoms als beispielsweise zu Lungenkrebs. Patienten, die eine Mutation im RB1-Gen haben, erkranken zu 90 Prozent an Retinoblastom, aber nur bei 10 Prozent entwickelt sich später auch noch ein Knochentumor. Es muß also in vielen anderen Zellen noch andere Proteine geben, die diese “bremsenden” Funktionen mit übernehmen. Eine Therapiemöglichkeit könnte sich vielleicht dadurch ergeben, ein solches Protein im Retinoblastom zu aktivieren, das dann möglicherweise die Funktion des gestörten Gens mitübernimmt.

UNIKATE: In Ihrer Darstellung der Funktionsweise des Retinoblastom-Gens ist es bereits angeklungen: Normalerweise *verhindert* dieses Gen die unkontrollierte Zellteilung. Dieser Eigenschaft verdankt es vermutlich die Bezeichnung Tumorsuppressor-Gen oder Anti-Onkogen?

Horsthemke: In den letzten fünf Jahren haben wir weltweit die Einsicht gewonnen, daß solche Gene eine genauso wichtige Rolle spielen, wie Onkogene - also Gene, die bei einer zumeist nur leicht veränderten DNS-Struktur krebserzeugend wirken. Historisch gesehen wurden zunächst dominant wirkende Onkogene bei einigen krebsauslösenden Virenarten entdeckt: Infiziert man beispielsweise ein Huhn mit einem Rous-Sarkom-Virus, dann bekommt es mit hundertprozentiger Sicherheit einen Tumor. Das Virus enthält ein Gen, das diesen Tumor - ein Sarkom - initiiert.

Wenn man dieses Gen entfernt, dann vermehrt sich der Virus zwar noch, aber er löst keinen Tumor mehr aus. Man konnte den auslösenden Mechanismus für die Tumorentstehung in diesem Fall also auf

“Wenn man die Funktion nicht kennt, kann man auch keine Therapie entwickeln, die wirklich an den Ursachen ansetzt.”

ein Gen eingrenzen, das dieser Virus mit sich nimmt, in der Regel sind es Abarten von zellulären Genen, die der jeweilige Organismus bereits besitzt.

Die Anti-Onkogene oder Tumorsuppressor-Gene dagegen machen sich erst durch ihren Verlust bemerkbar. Ihre Funktion besteht vermutlich darin, für den normalen Zellablauf zu sorgen, ihn zu regulieren und bestimmte Pro-

zesse - wie das “Ausrasten” der Zelle bei der Krebsentstehung - in Schach zu halten. Es gibt also Kontrollmechanismen, die die Zelle im Zellverband halten und sie daran hindern, sich einfach ungehindert zu teilen. Daran sind Proteine und letztlich diese Gene beteiligt.

Die positiven oder dominant wirkenden Onkogene sind dominant durch ihre Mutation, durch sie werden sie aktiviert. Hier reicht eine aktivierende Mutation, dann entsteht ein verändertes Protein, das die Krebsauslösung verursacht. Bei den Anti-Onkogenen dagegen wird die Krankheit ausgelöst, wenn diese Gene ihre normale Funktion, die sie in der Zellproliferation zur Differenzierungskontrolle ausüben, verlieren. Deswegen sind für die Entstehung des Retinoblastoms auch zwei Mutationen notwendig: Wenn in einer Zelle nur ein Retinoblastom Allel auf einem Chromosom 13 geschädigt ist, dann reicht die Restaktivität des anderen noch aus, die Zelle ganz normal weiterleben zu lassen. Erst wenn auch dieses durch eine weitere Mutation ausgeschaltet wurde, dann produziert die Zelle das entsprechende Protein nicht mehr und die ungehemmte Zellteilung beginnt.

UNIKATE: Sind inzwischen noch andere Tumorsuppressor-Gene identifiziert worden?

Horsthemke: Das Retinoblastom-Gen war das erste, daß isoliert wurde. Sehr viele der weiteren Forschungen stützen sich auf das RB1-Gen. Inzwischen sind noch weitere kloniert worden, beispielsweise das sogenannten Wilms-Tumors - ein Nierentumor - und ein Gen, das bei der Entstehung des Dickdarmkrebses eine Rolle spielt.

UNIKATE: Und wodurch verlieren diese Tumorsuppressor-Gene ihre krebshemmende Funktion?

Horsthemke: Bei der ersten Klasse von Mutationen, die wir untersucht haben, fehlt ein Stück des Gens

oder eine Base ist ausgetauscht - es sind also strukturelle Veränderungen des Gens. Diese liegen der erblichen Prädisposition zugrunde. Wir haben uns dann angesichts einiger nicht so eindeutiger Befunde gefragt, ob nicht noch andere Veränderungen des Gens bei der Tumorentstehung eine Rolle spielen könnten - Veränderungen, die das Gen einfach “abschalten”, obwohl es strukturell normal ist. Inzwischen vermuten wir, daß die Methylierung des Gens dabei eine Rolle spielt.

“Es könnte sein, daß die fehlende Methylierung am Genanfang etwas mit der Funktion des Gens zu tun hat.”

UNIKATE: Könnten Sie diese Hypothese etwas weitergehender erläutern?

Horsthemke: Die DNS besteht ja zunächst einmal aus Cytosin, Thymin, Adenin und Guanin. Am Cytosin-Rest hängen häufig Methylreste, damit entsteht eine Modifikation des Cytosins durch eine Methyl-, also eine CH₃-Gruppe. Bei der Säugetier-DNS und auch bei der menschlichen DNS ist eine solche Methylierung weit verbreitet. Allerdings ist der Anfang der Gene von der Methylierung gespart. Es könnte sein, daß diese fehlende Methylierung am Genanfang etwas mit der Funktion des Gens zu tun hat. Diese Überlegungen sind zur Zeit zwar noch hypothetisch, es gibt aber schon einige Hinweise darauf, daß am unmethylierten Anfang eines Gens Proteinfaktoren sitzen, die die Aktivität des Gens regulieren. Und wenn diese Faktoren dort sitzen, dann kommt vermutlich das Enzym, das normalerweise die Methylgruppe anhängt, nicht an die Stelle heran. Wenn diese Stelle allerdings durch

irgendwelche Umstände doch methyliert wird, dann können die normalen Proteinfaktoren hier eventuell nicht mehr binden und das Gen wird nicht mehr abgelesen. Dies könnte beim unilateralen Retinoblastom, dem keine erbliche Prädisposition zugrunde liegt, eine Rolle spielen. In ihrer Gänze konnten wir die Funktion allerdings noch nicht klären. Sollte unsere Hypothese zutreffen, dann könnte man versuchen Drogen zu finden, die die Methylierung am Anfang des Gens wieder aufheben. Falls das Gen also tatsächlich durch die Methylierung inaktiviert wird, dann sollte man es durch eine Wegnahme der Methylierung auch wieder aktivieren können. Ein aktives RB1-Gen könnte dann die weitere Tumorentwicklung bremsen.

UNIKATE: Womit sich auch neue Ansätze für eine Therapie andeuten würden?

Horsthemke: Soweit sind wir in Bezug auf diese Hypothese noch lange nicht. Womit wir in Essen allerdings bereits Erfolge vorweisen können, das ist die Integration der Gen-Analyse in die Diagnose. Dadurch wurde es möglich, im Rahmen der Vorsorge die Abschätzung des Erkrankungs-Risikos erblich zu verbessern. Auf diesem Gebiet konnten wir als erste klinische Einrichtung DNS-Diagnosen bei Risiko-Familien stellen - was auch wesentlich der außerwöhnlich guten Kooperation mit der Essener Augenklinik zu verdanken ist. Die Augenklinik hat für die Behandlung von Retinoblastom-Patienten schon seit Jahrzehnten überregionale Bedeutung.

UNIKATE: Durch welche Umstände hat sich gerade dieser medizinische Schwerpunktbereich in Essen etabliert?

Horsthemke: Durch die Entwicklung der Lichtkoagulation an der Essener Augenklinik durch Professor Gerd Meyer-Schwickerath.

Dabei handelt es sich um eine Behandlungsmethode, die ursprünglich zur Therapie der Netzhautablösung entwickelt wurde. Mit der Lichtkoagulation können aber auch Netzhauttumore unschädlich gemacht werden. Durch die Entwicklung dieser Therapie sind schon früh viele Patienten mit Retinoblastom nach Essen gekommen. Darauf aufbauend hat sich dann das Zusammenspiel von Augenklinik, Humangenetik, Strahlentherapie und Kinderklinik entwickelt, so daß wir heute für die Diagnose und Behandlung des Retinoblastoms optimale Voraussetzungen haben. Fast alle Retinoblastom-Patienten aus der Bundesrepublik werden inzwischen früher oder später in der Essener Augenklinik behandelt oder weiterversorgt.

UNIKATE: Könnten Sie abschließend kurz darstellen, wie die Zusammenarbeit mit der Augenklinik konkret aussieht?

Horsthemke: Wenn es uns gelingt, die entsprechende Mutation - direkt oder indirekt - nachzuweisen, können wir bei Risikofamilien, in denen schon einmal ein Elternteil erkrankt war oder die schon erkrankte Kinder haben, bei Neuge-

borenen anhand des Nabelschnurbluts nachprüfen, ob das Kind die Mutation geerbt hat oder nicht. Haben wir Mutationen feststellen können, dann wird das Kind in der Augenklinik alle zwei oder drei Wochen untersucht, um ein Ausbrechen der Krankheit möglichst früh zu erkennen. Oder wir sehen, daß das Kind die Mutation nicht geerbt hat. Aus Sicherheitsgründen wird Prof. Höpping in der Augenklinik das Kind trotzdem zur Zeit noch mehrmals anschauen, allerdings kann er aufgrund unseres Befunds dann die Untersuchungsabstände zwischen den einzelnen Augenspiegelungen erheblich vergrößern. Und wenn nach einer bestimmten Zeit nichts zu finden ist, kann er das Kind ganz aus der klinischen Kontrolle entlassen. Bevor wir involviert waren, hat man jedes Risikokind aus solchen Familien alle drei Monate augenspiegelt - was eine erhebliche Belastung ist, weil diese Untersuchung bei Kleinkindern unter Vollnarkose stattfinden muß. Das ist zuviel für die Kinder, die keinen Tumor zu erwarten haben, und zu wenig für jene, die tatsächlich an der Krankheit leiden.

Das Gespräch führte Norbert Weigend



In der Bundesrepublik Deutschland erkranken jährlich etwa 50 Kinder an Retinoblastom. Wird ein solcher Tumor früh genug diagnostiziert - was aufgrund seiner Seltenheit nicht immer sichergestellt ist -, dann bietet die Essener Augenklinik mit ihrer über 30jährigen Erfahrung im Kampf gegen diese Krebskrankheit die bestmöglichen Chancen zur Heilung.

Ein heller Schimmer hinter der Pupille

Diagnose und Therapie des Retinoblastoms Von Wolfgang Höpping

Beim *Retinoblastom* handelt es sich um ein bösartiges Tumorstadium der Netzhaut des Auges, das überwiegend im Säuglingsalter oder bei Kleinkindern vorkommt. Obwohl es sich um die häufigste Augentumorerkrankung im Kindesalter und nach dem Aderhautmelanom um den zweithäufigsten primären Augentumor überhaupt handelt, tritt die Erkrankung in absoluten Zahlen gesprochen nur sehr selten auf. Etwa eines von 16.000 Lebendgeborenen erkrankt am Retinoblastom; damit ist das Retinoblastom der achthäufigste maligne Tumor bei Kindern.

Unbehandelt wächst die Geschwulst in Schüben, füllt das ganze Auge aus, durchbricht die Kapsel des Augapfels und dehnt sich über die Augenhöhle in den Bereich des Gesichtsschädels und über den Sehnerv und seine Hüllen bis in das Gehirn hinein aus. Metastatische Absiedlungen über den Blut- und Lymphweg in andere Organgebiete des Körpers kommen vor. Ohne Behandlung erliegen die Patienten in wenigen Jahren ihrem Leiden, wird die Krankheit frühzeitig diagnostiziert und therapiert, überleben dagegen über 95 Prozent der Betroffenen. In der Therapie

streben wir an, nicht nur das Leben zu retten, sondern wo immer möglich auch das Sehvermögen zu bewahren.

In seltenen Einzelfällen sehen wir Augentumoren, die in einem Rückbildungsstadium zu sein scheinen, als ob sie vorher mit einer Röntgen-Strahlentherapie behandelt worden wären. Solche Veränderungen wurden bei routinemäßig durchgeführten Untersuchungen nicht erkrankter Verwandter von Retinoblastomkindern gefunden. Um sie von den bösartig wachsenden Retinoblastomen zu unterscheiden, nennt man diese Veränderungen *Retinome*.

Gleichzeitig mit der erblichen Form des Retinoblastoms (zur Genetik vgl. den Beitrag von B. Horsthemke) kann ein sogenanntes *Trilaterales Retinoblastom* auftreten. Diese Bezeichnung wurde einem in der Mittellinie des Gehirns im Bereich der Zirbeldrüse wachsenden Tumor gegeben, bei dem es sich nicht um Metastasen eines Retinoblastoms des Auges handelt, sondern um einen selbständig wachsenden Tumor der interessanterweise feingeweblich der Struktur des Retinoblastoms ähnlich sieht. Dieser Hirntumor wird wegen der zentralnervösen Störungen, die er verursacht, gelegentlich noch vor der Retinoblastomerkrankung des Auges diagnostiziert.

Schlüsselfunktion Früherkennung

Da das Retinoblastomwachstum nur von einer noch unreifen Retinazelle ausgehen kann, einem sogenannten Retinoblasten, dürfte ein Tumorstadiumsbeginn später als in der frühen Kindheit nicht mehr möglich sein. Dem entsprechend sind unsere Patienten bei der Diagnosestellung zu

- 50 Prozent jünger als 1 Jahr und 3 Monate,
- 90 Prozent jünger als 3 Jahre und 7 Monate und
- 99 Prozent jünger als 7 Jahre und 7 Monate.

Tatsächlich handelte es sich bei den

Fällen, bei denen das Retinoblastom erst nach dem 5. Lebensjahr diagnostiziert wurde, häufig um ungewöhnliche Verlaufsformen und mit deswegen verspäteter Diagnosestellung. Bei (fast) allen Fällen, die erst im Erwachsenenalter entdeckt wurden, lagen spontan geheilte Retinoblastome oder Retinome vor, die symptomlos geblieben und durch gezielte Untersuchungen entdeckt worden waren.

In einem Drittel der Fälle tritt das Retinoblastom beidseitig auf, in beiden Augen werden Tumoren gefunden. Hierbei handelt es sich nicht etwa um ein Wachstum des Tumors von einem Auge in das andere oder um Metastasenbildung im anderen Auge, sondern um eine ursprüngliche Tumorentstehung an beiden Augen. Auf die gleiche Weise können auch innerhalb des Auges mehrfach zu lokalisierende Tumoren getrennt voneinander entstehen und wachsen. Das Alter zum Zeitpunkt der Diagnose lag bei den von uns behandelten Patienten mit doppelseitigen (*bilateralen*) Retinoblastomen durchschnittlich 16 Monate unter denjenigen, die an einem einseitigen Retinoblastom erkrankt waren. Dem entsprechend konnte das Tumorstadium bei den bilateralen Retinoblastomen in über 70 Prozent der Fälle schon in den ersten Lebensjahren diagnostiziert werden.

In Ländern mit weniger gut entwickelten Gesundheitsdiensten bleibt der eigentliche Augentumor häufig unentdeckt und die Krankheit präsentiert sich primär als Geschwulstwachstum der Umgebung des Auges, der Augenhöhle, des Gesichts und des Gesichtsschädels nachdem er die festen Hüllen des Auges bereits durchbrochen hat. Unbehandelt kann das Tumorstadium dabei gigantische Ausmaße annehmen.

Da der Tumor zunächst im geschlossenen Augapfel am Augenhintergrund wuchert, kann er über längere Zeit - besonders bei Säuglingen und Kleinkindern - "symptomlos" bleiben: Das Auge



Foto: Universität GH Essen/MSL&K

Prof. Wolfgang Höpping, Facharzt für Augenkrankheiten und Spezialist für die Behandlung von Retinoblastomen am Universitätsklinikum Essen.

ist äußerlich unverändert, die Kinder können sich nicht äußern und den Eltern bleibt somit die Beeinträchtigung des Sehvermögens ihres kleinen Kindes verborgen. Allenfalls eine Schielstellung der Augen ist zu bemerken; in 25 Prozent unserer Fälle wurde Schielen als erstes Symptom in der Vorgeschichte genannt. Nur selten führte dieses Frühsymptom über eine Untersuchung des Augenhintergrundes jedoch zur ursächlichen Klärung des Verlustes des beidäugigen Sehens und damit zur Frühdiagnose des Retinoblastoms.

Im weiteren Verlauf der Krankheit fällt bei bestimmten Beleuchtungsverhältnissen ein heller Schimmer hinter der Pupille des Auges auf. Nach einer medikamentösen Pupillenerweiterung sieht man, daß dieser helle Schimmer durch die nach vorn wachsende, grauweiße Geschwulst verursacht wird (*Leukokorie*, "weiße Pupille"). In diesem Zeitabschnitt der Erkrankung fällt dem erstkonsultierten Kinder- oder Augenarzt eine entscheidende Schlüsselrolle für das weitere Schicksal des Patienten zu. Er muß an eine seltene, das Augenlicht und das Leben bedrohende Erkrankung denken, der er in seiner Praxis wahrscheinlich nie begegnet ist und die sich eindeutig nur in Narkose diagnostizieren läßt. Besonders irreführend ist, daß die ersten Krankheitserscheinungen ganz uncharakteristisch und nicht auf ein Geschwulstwachstum hinweisend sind. Hierin liegt eine Ursache, warum eine Reihe von Kindern erst Monate nach Auftreten der Erstsymptome in unser Zentrum zur Diagnose und Behandlung kommen. So wird uns eine Frage leider immer wieder von den Eltern gestellt: "Wieviel besser wären die Behandlungsmöglichkeiten gewesen, wenn wir früher überwiesen worden wären?"

Diagnose und Differentialdiagnose

Seit nunmehr 30 Jahren halten wir im Operationssaal der Augenklinik

einmal wöchentlich eine Retinoblastom-Sprechstunde ab. Die Säuglinge und Kleinkinder werden, nachdem die Pupillen durch Erweiterungstropfen weitgestellt worden sind, in Narkose untersucht. Die Narkoseärztinnen und -ärzte unserer Anaesthesieabteilung sind durch ihre jahrzehntelange Praxis im Umgang mit kleinen Patienten ganz besonders erfahren; an einem Nachmittag werden meistens etwa 15 Kinder schnell, sicher und sanft narkotisiert und nach der Untersuchung so lange betreut, bis sie die Klinik - wieder wach und beruhigt - mit den Eltern verlassen können. Ohne diese hervorragende Betreuung durch unseren Anaesthesiedienst könnten wir Augenärzte kaum tätig werden.

Unter Narkose kann der Kenner bei unbehindertem Einblick auf den Augenhintergrund die Diagnose Retinoblastom durch eine einfache Augenspiegel-Untersuchung ohne weitere Zusatzdiagnostik stellen. Die runden oder oval geformten Tumoren sind für den Erfahrenen ganz charakteristisch und eindeutig (Abb. 1). Differentialdiagnostisch müssen gutartige Netzhautwucherungen wie *Astrozytome*; Blutgefäßgeschwülste und lokale entzündliche *Granulome* in Folge seltener, meist durch Tiere übertragener Infektionen wie *Toxocara canis* und *Larva migrans* oder *Toxoplasme* sowie Zysten des Hundebandwurms erwogen werden.

Lautet die Diagnose "Retinoblastom" ist es wichtig, die Untersuchung durch eine humangenetische Beratung zu ergänzen. Ob ein Retinoblastom in der erblichen (*hereditären*) oder in der nicht-erblichen Form vorliegt, läßt sich allein aufgrund des augenärztlichen Untersuchungsbefundes zum Tumorstadium im Auge nicht immer entscheiden (Abb. 2). Im Falle eines erblich bedingten Retinoblastoms geht es darum, nicht erkrankte Träger der Mutation zu erkennen. Das Vorkommen eines noch nicht erkannten Vererbungsrisikos sollte immer berücksichtigt werden,

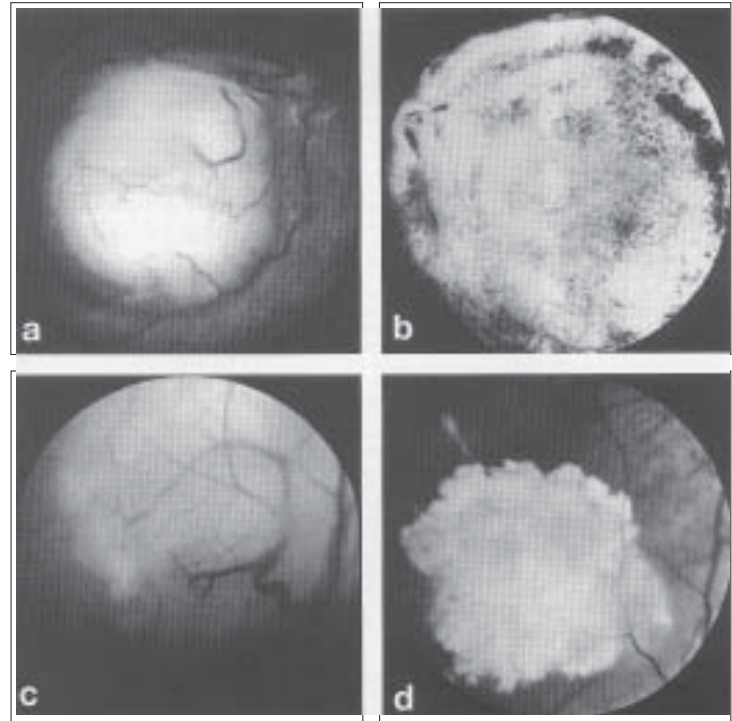
denn auch Menschen mit einem klinisch nicht manifesten, "spontan geheilten" Retinoblastom oder Retinom müssen als Träger mit 50-prozentigem Risiko für die eigenen Nachkommen betrachtet werden. Die nicht erkrankten Eltern und Geschwister unserer Patienten müssen also vorbeugend mituntersucht werden.

In Zusammenarbeit mit dem Humangenetischen Institut der Universität Essen konnten wir die Beurteilung des Erkrankungsrisikos durch molekulargenetische Untersuchungen entscheidend verbessern: Statt statistischer Erwartungswerte liefert eine solche Untersuchung heute in den informativen Fällen präzise Feststellungen zum Vorliegen oder zum Ausschluß eines Risikos (Vgl. das Interview mit B. Horsthemke).

Ein auch für den Erfahrenen schwer zu diagnostizierendes Krankheitsbild besteht, wenn Retinoblastomknoten auseinanderbrechen und sich ihr Zellmaterial in das Augennere, in den Glaskörper oder weiter nach vorn in die vordere Augenkammer ergießt. Dann entsteht ein Krankheitsbild, das einer intraokularen, also einer im Auge sich abspielenden Entzündung täuschend ähnlich werden kann. Als behandelnder Arzt denkt man hier gar nicht an einen Tumor, sondern behandelt in der Regel eine Entzündung und wundert sich über den ausbleibenden Erfolg. Auch Probepunktionen des Zellmaterials im Auge führen nicht immer zur zu Grunde liegenden Krankheit, dem Retinoblastom. Da hierdurch die Krebszellen aus der festen Hülle des Augenninners in das umgebende Gewebe des Auges verschleppt werden können, sind solche diagnostischen Maßnahmen *mit einem großen Risiko verbunden*.

Wir raten von ihnen grundsätzlich ab. Diese, zumeist bereits erblindeten Augen müssen, um das Leben nicht zu gefährden, operativ entfernt werden (*Enukleation*).

Schon sehr früh kommt es im Verlauf der Erkrankung und wäh-



(1) a: Kleines Retinoblastom vor der Lichtkoagulations-Behandlung. b: Glatte retinoblastomale atrophische Narbe nach mehreren Lichtkoagulationen. c: Retinoblastom vor der Strahlentherapie. d: Rückbildungszustand nach erfolgreicher Strahlentherapie, "cottage cheese"-artig.
Quelle: Universität Göttingen 1992/Höppner, Havers, Passagier 1988

rend des Wachstums der Retinoblastomknoten zu einer vollständigen Netzhautablösung oder Glaskörpertrübung, die den Einblick auf den dahinter liegenden Augenhintergrund und die Tumoren so behindern, daß ihre Diagnose mit dem Augenspiegel nicht mehr möglich ist. Untersuchungen mit Ultraschall und das Computertomogramm helfen uns inzwischen in einer solchen Situation in der Diagnose

weiter. Differentialdiagnostisch müssen hier die Spätstadien unterschiedlicher Augenkrankheiten berücksichtigt werden: Fehlbildungen, chronische Entzündungen, Unfallfolgen und manches mehr. Diese zumeist blinden Augen beherrbergen keinen Tumor und bedürfen keiner Behandlung. Ein Retinoblastom muß allerdings sicher ausgeschlossen werden, was nicht immer möglich ist.

Therapeutischer Ansatz

Beim Retinoblastom sind grundsätzlich zwei verschiedene Behandlungsstrategien zu diskutieren:

- Die operative Entfernung des Tumors durch Enukleation des Auges oder
- die augapfeilerhaltende Therapie, die - unter der Voraussetzung, daß hierdurch kein ungewöhnliches Lebensrisiko eingegangen wird -

eine Inaktivierung des bösartigen Wachstums und Erhaltung des Sehvermögens anstrebt. Kleine, von gesunder Netzhaut umgebene Retinoblastome können durch die in den 50er Jahren von Meyer-Schwickerath entwickelte Therapie der Lichtkoagulation erfolgreich und dauerhaft zerstört werden.

Solche Tumoren lassen sich ebenfalls gut durch Cryotherapie behandeln: Der Tumor wird dabei von außen unter Kontrollendes Augenspiegels mit einer Metallsonde lokalisiert und über die tiefgefrorene Spitze der Sonde durchgefroren und vereist. Hierdurch werden die kälteempfindlichen Tumorzellen denaturiert. Beide Therapieverfahren vermeiden das Risiko ionisierender Strahlen. Leider eignen sich diese Verfahren nur für sehr kleine Tumoren.

Strahlentherapie

Das Retinoblastom ist strahlensensibel. Es wird durch Bestrahlung in ein inaktives Narbengewebe umgewandelt. Die Krebserkrankung im Auge ist dann ausgeheilt. Ziel der Strahlentherapie muß allerdings sein, den Tumor zu zerstören, ohne die empfindlichen Strukturen des Auges zu vernichten. Mit der Röntgentherapiefrüherer Jahre war

dieses Ziel wegen Nebenwirkungen gefährdet: Nach Bestrahlung der Tränenrüsen trocknete das Auge aus, die Hornhaut wurde undurchsichtig und die Bestrahlung der Linse führte zum Strahlenstar. Netzhautblutgefäßschäden und Sehnervenschwund sind weitere Komplikationsmöglichkeiten bei dieser Behandlung, wie auch Störungen des Knochenwachstums im Bereich der durchstrahlten Gewebe. Die langjährige enge Zusammenarbeit mit den Kollegen unserer strahlentherapeutischen Abteilung¹ haben hier bemerkenswerte Fortschritte gebracht: Wir wissen besser Bescheid über die noch tolerablen, für die Inaktivierung der Netzhautkrebszellen notwendigen Dosen und haben gelernt, diese ausreichend fraktioniert und schonend einzustrahlen. Moderne Strahlengquellen mit genau ausrichtbarem Strahlengang vermeiden heute die unnötige Bestrahlung der vorderen Abschnitte des Auges. Die von unserer Gruppe erstmalig in die Therapie eingeführte *Kombination von Strahlentherapie und Lichtkoagulationsbehandlung* führte zur Einsparung der Gesamtstrahlendosen. Es sei erneut erwähnt, daß auch in diesem Bereich ohne unsere qualifizierten Anaesthetisten solche Behandlungen nicht durchgeführt

werden könnten, da jede einzelne Bestrahlung - die fünf mal wöchentlich über mehrere Wochen wiederholt werden muß - bei den Kindern in Narkose erfolgen muß². Der Anaesthetist kann bei der Bestrahlung naturgemäß nicht im Bestrahlungsraum bleiben, die Sicherheit der Narkose muß also über Monitorbeobachtung gewährleistet werden.

Radioaktive Kontaktstrahler

Augen, die einen einzelnen, mittelgroßen Tumor beherbergen, können mit radioaktiven Kontaktstrahlern behandelt werden. Wir benutzen zur Zeit Applikatoren mit *Ra/Rb-106*, einen Betastrahler und *I25-Jod*, einen weichen Gammastrahler. Die Applikatoren werden auf der Lederhaut außen, entsprechend der Tumorbasis des Retinoblastoms aufgenäht³. Diese Brachytherapie verbindet den Vorteil einer vollen Strahlendosis im Tumorbereich mit einer geringeren Belastung für das umgebende Gewebe.

Enukleation

Augen mit Retinoblastom, bei denen wegen der Ausdehnung des Tumorstadiums keine Hoffnung auf Erhalt des Sehvermögens be-

steht, müssen, um das Leben der Kinder nicht zu gefährden, operativ entfernt werden (Enukleation). Wenn dies für beide Augen gilt, sollte man nicht davor zurückschrecken, primär beide Augen zu enukleieren. Auch diese Kinder haben eine sehr gute Chance zu überleben und zu frohen, das Leben meistendenden Menschen heranzuwachsen. Dies allerdings den völlig verzweifelten Eltern klar zu machen, die im ersten Schock unterbewußt vielleicht denken, "lieber tot als blind", ist dabei nicht leicht.

Chemotherapie

In den 60er und 70er Jahren wurde in den großen Retinoblastom-Behandlungszentren der USA die Bestrahlung der Augen fast stets mit einer Chemotherapie kombiniert. Die beeindruckenden Ergebnisse der Kombination von Strahlentherapie und Lichtkoagulation ließen uns dagegen schon sehr früh an der Notwendigkeit der Chemotherapie für die erfolgreiche Behandlung eines Retinoblastom-Auges zweifeln. Wegen ihrer erheblichen Nebenwirkungen beschränkten wir diese Therapie bald auf schwere Fälle mit erhöhtem Risiko für die Absiedlung von Metastasen. Aufgrund unserer Behandlungserfolge haben wir damals - als erste und nicht selten gegen die verbreitete Meinung im Fach - auf internationalen Kongressen vor der Chemotherapie als Routine-therapie des Retinoblastoms gewarnt, obwohl wir uns seinerzeit, noch ohne genaue wissenschaftliche Erkenntnisse, hauptsächlich auf unser klinisches Gefühl verlassen mußten. Heute wissen wir, daß wir damit manche unserer Patienten vor einer mit Risiken behafteten Therapie bewahren konnten.

Da alle Körperzellen derjenigen Patienten, die an einem erblichen Retinoblastom leiden, das mutierte Tumorgen tragen, erkranken eine Reihe von ihnen im Erwachsenenalter an anderen, vom Auge unabhängigen, bösartigen Zweitumoren.

Chemotherapie und zu hohe Strahlenbelastung können als auslösendes Moment fungieren. Andererseits kann bereits lebensgefährlich an Metastasen erkrankten Kindern durch eine ausgefeilte Chemotherapie⁴ geholfen werden. Beides muß bei der Therapieplanung beachtet werden. Das Retinoblastom ist somit nicht nur ein Augenleiden, sondern eine Krebserkrankung, die von einem Kinderkrebspezialisten behandelt werden muß.

Die Betreuung der Patienten

Die psychologische, menschliche und soziale Betreuung unserer Retinoblastom-Patienten, der Kinder und ihrer Eltern, liegt weitgehend in der Hand unserer Schwestern auf der Station A1 in der Augenklinik. Ihre jahrzehntelangen Bemühungen um die betroffenen Kinder und ihre Mütter, die stationär mit aufgenommen werden, hat den Schwestern einen reichen Schatz an spezifischen Erfahrungen mit der Krankheit und ihren Problemen zuteil werden lassen, die sie in hervorragender Weise den jeweils neuen Patienten weitergeben. Darüber hinaus sind sie es, die unermüdetlich für Gespräche zur Verfügung stehen - besonders, wenn die Eltern die von uns übermittelten Befunde verarbeiten müssen: die Bedeutung der Diagnose "Retinoblastom", die Ohnmacht und Traurigkeit über den endgültigen Verlust des Auges, Ängste vor der Umwelt, vor der Familie, den Nachbarn und der Situation im Kindergarten. Und schließlich Bewältigungsängste angesichts einer neuen, schwierigen Realität: Die Eltern müssen lernen, eine leere Augenhöhle ansehen zu können, die Augenprothese zu wechseln und sich mit den Folgen der Blindheit auseinanderzusetzen.

Viele der bei uns behandelten Kinder stammen aus dem Ausland, aus den verschiedensten Kulturkreisen, aus Polen, Rußland, Jugoslawien, Italien ebenso wie aus Libyen, Syrien und dem Iran. Alle Nationen

sind vertreten, die meisten Eltern sprechen kein Deutsch, immer wieder müssen innerhalb und außerhalb des Klinikgeländes Dolmetscher gefunden werden. Kontrollversen oder gar Ausländerföhrlichkeit hat es deswegen auf der Station nie gegeben. Im Gegenteil: Häufig bleibt der Kontakt mit den aufwachsenden Kindern über Jahre erhalten, nicht selten erreichen uns GrüÙe ehemaliger Patienten und ihrer Eltern. Dazu gehören leider auch immer wieder einmal traurige Nachrichten, die dann um so schwerer zu verkraften sind.

Interdisziplinäre und internationale Zusammenarbeit

Die kontinuierliche Betreuung der meisten deutschen Retinoblastom-Patienten hat es ermöglicht, über Jahre hinweg Diagnose, Therapie, Verlauf und Prognose statistisch festzuhalten und auszuwerten. Für das Deutsche Krebsforschungszentrum in Heidelberg haben wir eine computerfähige Erhebungsmethode für Retinoblastom-Erkrankungen entwickelt, und inzwischen stehen alle unsere, in dieser Form vermittelbaren Erfahrungswerte über den Rechner des Institutes für Medizinische Informatik und Biomathematik für die Forschung zur Verfügung⁵. Hierdurch wurden die Voraussetzungen für weitere wissenschaftliche Arbeiten gelegt, wie beispielsweise für die Inaugural-Dissertation von Thomas Heinrich über das "Metastasierungsrisiko beim Retinoblastom", die auf dem Kongreß der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft (DOG) 1989 in Baden-Baden als beste Arbeit preisgekrönt wurde⁶.

Die sich über Jahrzehnte erstreckende Beschäftigung mit dem Retinoblastom führte fast zwangsläufig zu engen interdisziplinären und internationalen Kontakten. Da nur wenige Zentren der Welt sich mit dem Retinoblastom beschäftigen und das Flugzeug die Entfernungen schwinden ließ,

Genetische Form: Relativer Anteil		Klinik	Erkrankungsrisiko für:		Genetische Diagnostik möglich:	
			eigene Kinder	Geschwister	molekulargenet.	chromosomal
1) Somatische Mutation: 60%		unilateral, unifokal	nicht erhöht	nicht erhöht	nein	nein
2) Keimzellenmutation: 40%	2a) Transmission von einem Genträger (10%)	bilateral/unilateral, multifokal	45%	45%	bei ca. 95%	nein
	2b) Neue Mutation (30%)	bilateral/unilateral, multifokal	45%	nicht erhöht	bei ca. 20%	nein
	davon chromosomal nachweisbare Deletion (2-5%)	bilateral/unilateral, uni- oder multifokal, allgem. Entwicklungsstörungen	45%	nicht erhöht	ja, aber nicht erforderlich	ja
Nicht erkrankter Genträger (ca. 5%)		Retinom bei einigen Individuen	45%	45% oder nicht erhöht	nur bei familiärem Retinoblastom	nein

(2) Genetische Formen von Retinoblastomen und das Erkrankungsrisiko bei Verwandten ersten Grades eines Patienten.

Quelle: Universität GfE Essen-Stiepping, Havers, Passarge 1988



Foto: © Universitätsklinik

kennt man sich seit Jahren und tauscht Erfahrungen bereitwilligst aus. Dies gilt für uns Kliniker genauso wie für die beteiligten theoretischen Wissenschaftler aus dem Bereich der Molekulargenetik und der Tumorzellforschung. Als Satelliten-Symposium der jeweiligen internationalen augenärztlichen Kongresse wurde das erste internationale Retinoblastom-Symposium in Kyoto, Japan, 1978 ausgerichtet, das zweite fand 1982 in Monterey, Californien, statt. Das erste europäische Treffen wurde von mir auf Bitten der amerikanischen Kollegen im Jahre 1986 in Amsterdam organisiert.

1990 forderte die Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft (DOG) die Kollegen der Essener Universitäts-Augenklinik auf, in Essen ein internationales Augen-Tumor-Symposium durchzuführen. Es fand mit hochkarätiger internationaler Beteiligung statt. Der Kongreßband unter der Edition von Prof. P. Lommatzsch, Leipzig, und Privatdoz. Norbert Bornfeld, Essen, et. al. ist gerade erschienen. Auch den nächsten internationalen Augentumorkongress im New Yorker Cornell Medical College im April 1992 werden wir mitgestalten können: Wir wurden eingeladen als Mitglieder der Faculty den Kongress mitzumoderieren.

International bekannt wurde die Essener Universitätsaugenklinik durch die Arbeit ihres kürzlich unerwartet verstorbenen ehemaligen Direktors, Prof. Gerd Meyer-Schwickerath. Das von ihm entwickelte Verfahren der Lichtkoagulation - ein Verfahren ähnlich dem Laser - ermöglichte es zum ersten Mal in der Geschichte der Medizin, unblutig im Auge zu operieren. So läßt sich ein Retinoblastom im Auge koagulieren, ohne seine schützenden Hüllen öffnen zu müssen. Diese Behandlungsmethode wurde seinerzeit international durchaus kontrovers diskutiert; heute sind unsere Langzeitergebnisse unbestritten, das Verfahren ist etabliert und wird weltweit angewandt.

In den folgenden Jahren haben unsere theoretischen "Nachbar"-Fächer wie Molekulargenetik oder Tumorzellbiologie die Erkenntnisse über den Krebs so erweitert, daß sie, praxisnah gehandhabt, heute bereits unseren Patienten zu Gute kommen. Aus den ersten Einzelerfolgen bei der Behandlung eines seltenen, kindlichen Augentumors hat sich ein interdisziplinäres Behandlungszentrum entwickelt, an das alle deutschen Kliniken ihre Patienten überweisen¹. Trotzdem sind wir weit davon entfernt, das Problem "Retinoblastom" gelöst zu haben. Wir werden uns weiterhin bemühen müssen.

SUMMARY

Retinoblastoma (rb) is a malignant retinal tumor of early childhood. There are unilateral and bilateral, hereditary and non-hereditary, sporadic and family cases, which cannot be distinguished clinically. Some rb stop growing spontaneously. These rare lesions are called retinomas. Along with some cases of hereditary rb a midline intracranial neuroblastic neoplasm resembling rb may be found *trilateral* rb.

The hereditary type of rb is predisposing to the development of other

nonocular malignancies later in life, which must not be misinterpreted as late metastases.

Diagnosis: In patients with clear media the diagnosis always can be made by indirect ophthalmoscopy; DD: retinal astrocytoma, retinal angiomias (v. Hippel) uveitis etc. In eyes full of tumor growth and/or totally detached retina ultrasound and CT scan are our diagnostic means in order to detect the typical calcifications. DD: every lesion causing leuocoria. We advice against fine needle biopsy because it is not reliable (false neg.) and risky (cell dissemination).

Treatment: eyes full of tumor without functioning retina have to be enucleated. At least 10 mm of the optic nerve has to be removed with the globe. Histopathology has to verify whether the growth invaded the choroid and/or the nerve. It has to be decided whether further adjuvant treatment - chemotherapy and/or radiation - have to be administered. Eyes with a reasonable chance to save some useful vision are treated conservatively: small foci by cryo and/or lightcoagulation, middle-sized lesions by radioactive plaques and advanced growth by external beam radiation. We use a single temporal field, other authors advocate a front field taking cataract in account. The tumor dose should usually not exceed 50 Gy in order not to get severe radiation damage. The result depends on the size of the treated lesions, small tumors can easily be cured, lesions exceeding half the retina have only minimal chances. We always have to keep in mind, that we are handling a malignant disease. We must not risk life for sight. For this reason it is important to avoid beam radiation and chemotherapy wherever it is possible as these treatment modalities increase the risk of nonocular malignancies e.g. osteo and/or issue sarcomas later in life. Metastases involve all organs but very often the orbit, bones and the CNS (50 per cent of all metastases) the majority being diagnosed wit-

(3) Praxis im Essener Universitätsklinikum: In der Augenklinik wird ein Säugling in Narkose untersucht (Bild 1-6, v.l.o.); im Radiologischen Zentrum bereitet Oberarzt Dr. W. Sauerwein die Bestrahlung eines Retinoblastom-geschädigten Auges vor (Bild 7-8, u.).

hin 5 years after diagnosing the retinoblastoma. Metastases are treated by chemotherapy and/or radiation. In many cases it is possible to get full remissions mostly however followed by recurrences. The prognosis for survival of all our cases is 95 per cent in unilateral and 80 per cent in bilateral affected patients. It depends on the infiltration of the growth into the surrounding tissues: rb limited to the retina survive in 97 per cent of the cases. If the optic nerve is invaded up to the area of the cut end the survival rate drops to less than 40 per cent. We have to expect more deaths from secondary tumors than from metastases.

Der Autor:

Nach der Promotion zum Dr. med. in Düsseldorf begann Dr. Wolfgang Höpping seine fachärztliche Tätigkeit bei Prof. P. A. Jaensch und Prof. G. Meyer-Schwickerath an der Essener Augenklinik. Kurze Studienaufenthalte bei Reese in New York und Stallard in London zur Erforschung der Therapiemöglichkeiten bei Augentumoren schlossen sich an. Seit 1962 ist W. Höpping als Augenarzt in eigener Praxis in Essen niedergelassen. Seither arbeitet er auf Einladung Meyer-Schwickeraths ehrenamtlich an der Essener Universitäts-Augenklinik, später wurde er Leiter der sich dort etablierenden Retinoblastomabteilung. 1969 begann er seine Lehrtätigkeit mit einem Lehrauftrag über *Diagnose, Differentialdiagnose und Therapie des Retinoblastoms*. 1980 wurde Dr. W. Höpping in der medizinischen Fakultät der Universität GH Essen zum Honorarprofessor ernannt. Von 1974 bis 1984 war W. Höpping Mitglied des Vorstandes des Vereins Rheinisch-Westfälischer Augenärzte. 1986 wird ihm auf Vorschlag einer internationalen Jury der Theodor-Axenfeld Preis durch die Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft verliehen. Prof. W. Höpping ist Mitglied im Redaktionskomitee der DOG-Zeitschrift DER OPHTHALMOLOGE.

Anmerkungen:

1) In der Strahlentherapeutischen Abteilung haben wir früher mit ihrem Leiter, Prof. Eberhard Scherer, zusammengearbeitet; heute bemühen sich sein Nachfolger, Prof. Horst Sack und Oberarzt Dr. Wolfgang Sauerwein darum, die Augen unserer Patienten optimal - auf dem Niveau des aktuellen Weltstandes - zu bestrahlen.

2) Es muß an dieser Stelle nochmals die enge Zusammenarbeit mit der Anaesthesie-Abteilung des Essener Universitäts-Klinikums unter Prof. Ludwig Stöcker hervorgehoben werden, die die für unsere Patienten notwendigen Methoden der Narkose-Überwachung - insbesondere unter den schwierigen Bedingungen einer Strahlenbehandlungen - für uns erfolgreich entwickelt hat.

3) Diese Operationen führt seit Jahren Privadoz. Dr. Norbert Bornfeld durch.

4) Prof. Werner Havers steht uns als Kinderonkologe (Zentrum für Kinderheilkunde, Abteilung für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie) seit Jahren in diesem Bereich zur Verfügung. Er überwacht und organisiert die notwendigen Chemotherapien. Als kinderärztlicher Retinoblastomspzialist ist er auch Ansprechpartner auswärtiger Fachkollegen geworden.

5) Die technische und wissenschaftliche EDV-Beratung und Programmierung betreuen H. Hirche und Dr. G. Zeller.

6) Thomas Heinrich: *Das Metastasierungsrisiko beim Retinoblastom - eine Prognoseklassifikation auf dem Boden einer multivariaten Analyse potentieller Einflussfaktoren*. Diese Arbeit fußt u.a. auf der Habilitationsschrift von E. Messmer über die *Histopathologie des Retinoblastoms unter besonderer Berücksichtigung des Differenzierungsverhaltens*, der seinerzeit als Oberarzt in Essen tätig war und jetzt die retinologischen Abteilung der Universitäts-Augenklinik in Zürich leitet.

7) Die Direktoren der Augenklinik, Prof. Th. N. Waubke und Prof. A. Wessing, bemühen sich zur Zeit darum, die notwendigen institutionellen Voraussetzungen zu schaffen, daß Essen auch zukünftig ein Zentrum für die wissenschaftliche Bearbeitung und Behandlung von Augentumoren bleibt.

Literatur:

Bornfeld N, Gragoudas ES, Höpping W, Lommatzsch PK, Wessing A, Zografos L (Eds.) *Tumors of the Eye*, Kugler Publications, Amsterdam, New York, 1991
Höpping W, Havers W, Passarge E. (1988) Retinoblastom. In: Bachmann KD, Ewerbeck H, Kleihauer E, Rossi E, Stalder G (Eds.): *Pädiatrie in Praxis und Klinik*, Bd. III, pp. 755-770, G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1988

(4) Vorbereitung einer Retinoblastom-Bestrahlung durch die Anaesthetisten des Essener Universitätsklinikums: Blick auf einen der Überwachungsmonitore.

Foto: Universit. GH Essen/MSL,RR

