

Genetik der Tumormetastasen

J. P. Sleeman, P. Baumann, N. Novac, W.-G. Thies, A. Nestl, O. von Stein, M. Hofmann, ITG

Einleitung

Die neuesten Statistiken für Deutschland zeigen, dass ca. eine von vier Personen an Krebs sterben wird [1]. Im Jahr 1997 belief sich die Zahl der Krebstoten auf 209.000. Jedoch wurden 338.000 neue Krebserkrankungen diagnostiziert, was klar zeigt, dass mehr als ein Drittel der Patienten nicht an ihrer Erkrankung stirbt. Warum? Die Antwort auf diese Frage wird im Falle der Hautkrebserkrankungen deutlich. Als größtes Organ des Körpers und direkt einer Reihe von schädlichen Agentien ausgesetzt, ist es nicht überraschend, dass die Hälfte aller neu diagnostizierten Fälle Hautkrebs sind. Von diesen sind ca. 80% Basalzellen- oder Schuppenzellkarzinome, die aus epidermalen Keratinozyten hervorgehen. Diese Tumore können in 95% der Fälle geheilt werden. Auf der anderen Seite tragen maligne Transformationen von Melanozyten zu nur 4% der Hautkrebsfälle bei, jedoch werden 79% der Krebstoten durch Melanome verursacht. Das auffallend unterschiedliche Resultat dieser verschiedenen Typen von Hautkrebs kann fast ausschließlich ihrem unterschiedlichen metastatischen Potential zugeschrieben werden. Zum Beispiel können Basalzellkarzinome unbehandelt zu großen, klinischen Proportionen anwachsen, metastasieren aber nur selten. Im Gegensatz dazu metastasieren Melanome sehr aggressiv, während der primäre Tumor noch klein ist. Deshalb ist die metastatische Ausbreitung von Tumorzellen letztendlich verantwortlich für die

große Mehrheit der Todesfälle durch Hautkrebs. Dies gilt auch für die meisten anderen Krebsarten. Die Pathobiologie der Sterblichkeit bei Krebs bezieht sich daher weitestgehend auf die Prozesse, die zur Bildung von Metastasen führen.

Was ist Metastasierung?

Das Wort Metastasierung wurde vom Griechischen „meta“ Wandel und „stasis“, Stand abgeleitet. Es beschreibt die Ausbreitung von Tumorzellen von einem Tumor durch den Körper und die nachfolgende Besiedlung an sekundären Schauplätzen und das Wachstum an diesen. Der Ausdruck Metastasierung wurde zuerst von Joseph Claude ReCAMIER benutzt, um das Wachstum von nicht in der direkten Nachbarschaft des primären Tumors wachsenden sekundären Tumoren zu beschreiben. Die Weiterentwicklung der Mikroskopie und die Entwicklung von operativen Techniken im letzten Jahrhundert führten zu den Beobachtungen, die die Basis für unsere aktuellen Vorstellungen über die zelluläre Basis der Metastasierung bilden. Während der letzten 30 Jahre hat die Anwendung molekularbiologischer Techniken in der Metastasierungsforschung viel zu diesen Grundlagen beigetragen; bis zu dem Punkt, an dem wir damit beginnen können, zelluläre und molekulare Ereignisse, die zur Metastasierung führen, zu beschreiben [2].

Tumorzellen metastasieren bei direkter Ausbreitung in Körperhöhlungen und durch den Blut- und Lymphkreislauf. Metastasie-

rung durch direkte Ausdehnung in Körperhöhlungen ist ein Charakteristikum nur weniger Tumorarten. Daher sind die zwei Komponenten des Kreislaufs, das Blut- und das Lymphsystem, die Haupttrouten über die sich die Tumorzellen ausbreiten.

Eine Kombination von zellulären und molekularen Ereignissen sind während der anfänglichen Schritte der Tumormetastasierung notwendig (Abb. 1). Die Tumorzellen müssen ihre adhäsiven Eigenschaften ändern. Sie müssen fähig sein, sich von den sie innerhalb des primären Tumors umgebenden Zellen zu lösen. Es ist auch wichtig, dass die Tumorzellen Proteasen produzieren, induzieren oder aktivieren, um Hindernisse zu überwinden, um in das darunterliegende Gewebe eindringen zu können. Tumorzellen müssen auch in der Lage sein, an neue Substrate wie zum Beispiel die Bestandteile der extrazellulären Matrix, die Basalmembran oder an andere Zellen, nämlich jene, die die Gefäße (Endothelzellen) bilden, zu binden. Sie müssen auch beweglich sein, um in das Kreislaufsystem einzudringen.

Nach Eintritt und während des Transports im Kreislaufsystem werden von den Tumorzellen auch eine Vielzahl an zellulären und molekularen Eigenschaften benötigt, um Metastasen zu bilden (Abb. 1). Im Blutstrom müssen sich die Tumorzellen an das Endothelium anheften und den Rückzug der Endothelzellen induzieren. Zusätzlich müssen sie Proteasen produzieren, induzieren oder aktivieren, die fähig sind,

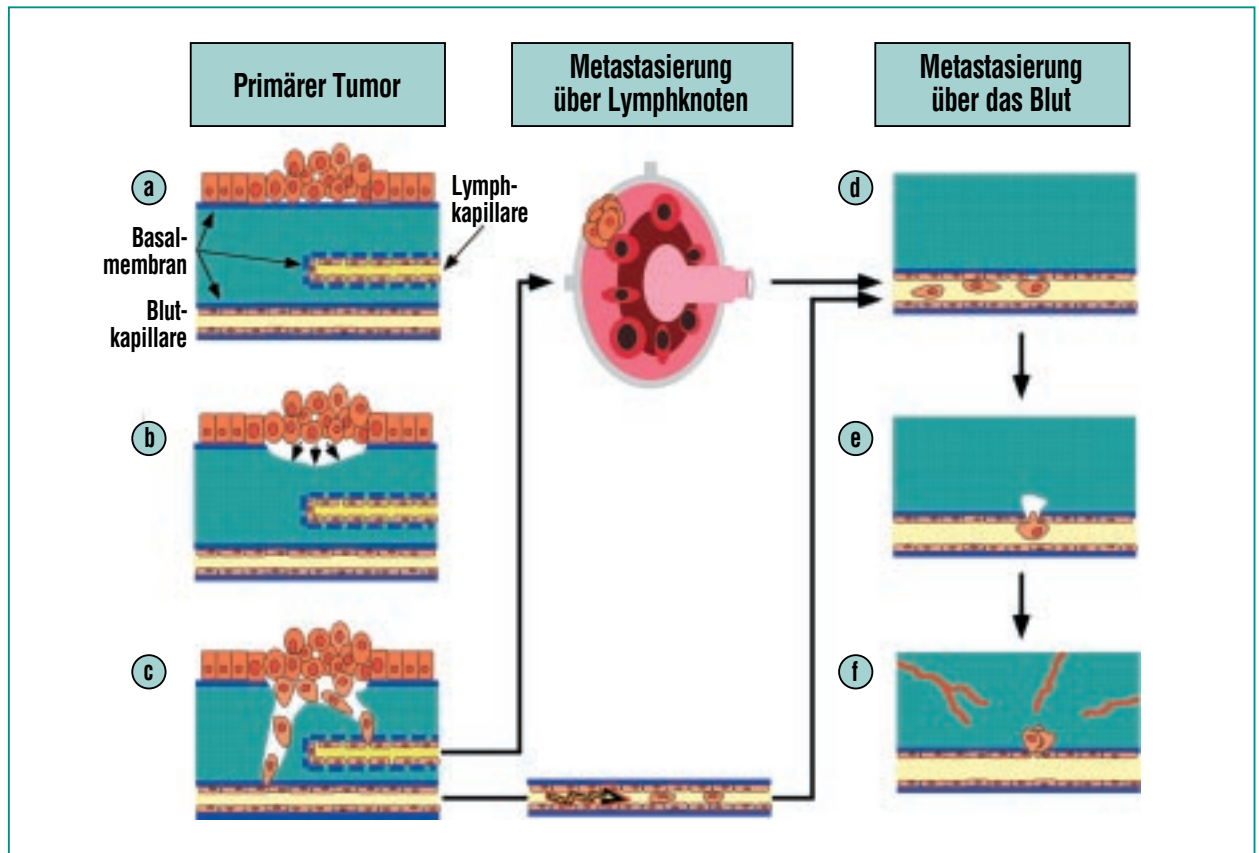


Abb. 1: Darstellung der wichtigen, während der Metastasierung auftretenden zellulären und molekularen Prozesse. Geänderte adhäsive Eigenschaften (a), die Sekretion, Induktion und Aktivierung von Proteasen (b) und der Erwerb von Bewegungsfähigkeit (c) tragen alle zum Eindringen der Tumorzellen in die Blut- oder Lymphkapillaren bei. Die losen zellulären Verbindungen und unvollständigen bzw. fehlenden Basalmembranen machen die Lymphkapillaren für die in das Kreislaufsystem eindringenden Tumorzellen zu einem einfacheren Angriffspunkt als die Blutkapillaren. Innerhalb des Lymphsystems können sich Metastasen bilden, wenn sich die Tumorzellen in den subcapsulären Sinusoiden der Lymphknoten ansiedeln. Diese Metastasen können sekundäre Ansiedelungen bilden oder über den Blutstrom in andere Organe gelangen. Die Schlüsselereignisse in der Bildung von aus dem Blutstrom hervorgehenden Metastasen sind die Adhäsion an und die Ablösung vom Endothelium (d), die Sekretion, Induktion oder Aktivierung von Proteasen zusammen mit der Bewegungsfähigkeit (e) und die Induktion von Angiogenese (f).

die darunterliegende Basalmembran abzubauen, um dann in die darunterliegenden Gewebe einwandern zu können. Andererseits sind Tumorzellen häufig nach Eindringen in die lymphatische Gefäße im Lymphknoten gefangen und bilden dort Metastasen. Wenn sich Tumorzellen an einem entfernten Ort etabliert haben,

muss es ihnen möglich sein, progressiv zu wachsen, sonst bleiben sie Mikrometastasen. Man nimmt an, dass dabei Eigenschaften, wie die Fähigkeit, Angiogenese (neue Bildung von Blutgefäße) zu induzieren oder auf lokal produzierte Wachstumsfaktoren zu reagieren, sehr wichtig sind.

Veränderte Genexpression: Die treibende Kraft hinter der Metastasierung.

Es ist klar, dass Tumorzellen viele Eigenschaften erwerben müssen, wenn sie fähig sein sollen, zu metastasieren. Wie entstehen im primären Tumor Zellen, die die

Eigenschaft zur Metastasierung besitzen? Die Eigenschaften einer Zelle wird bestimmt durch die Gene (diskrete Abschnitte der DNA, die Einheiten von genetischer Information kodieren), die sie exprimieren. Genexpression bedeutet, dass eine Zelle die molekulare Maschinerie anschaltet, die benötigt wird, um genetische Information, die in einem Gen kodiert ist, in ein Protein umzuwandeln. Verschiedene Proteine haben verschiedene Funktionen und genau welche Reihe von Proteinen eine Zelle besitzt, bestimmt ihr Verhalten. Im Falle von Tumoren würde man somit erwarten, dass sich die Expression vieler Gene quantitativ und qualitativ verändern muss, um die Tumorzellen mit Eigenschaften auszustatten, die für den komplexen Prozess der Metastasierung nötig sind.

Es ist nicht überraschend, dass während des Studiums der Metastasierung, die differenzielle Expression einer Reihe von Genen mit einem metastasierenden Phänotypen assoziiert worden sind. Was jedoch ungeklärt bleibt ist, wie viele Gene genau ihr Expressionsmuster verändern, wenn Tumorzellen die Fähigkeit entwickeln zu metastasieren. Mehr noch ist irgend eines dieser Gene absolut notwendig für die Ausbildung von Metastasen, oder kann die gleichen Eigenschaften, die notwendig für Metastasierung ist, durch einige verschiedene Gene oder Gengruppen besorgt werden? Bis zu welchem Ausmaß werden Gene, die keine Rolle in der Metastasierung spielen, während der Entwicklung in einen metastasierenden Phänotypen, hochreguliert? Um Antworten auf diese wichtigen Fragen zu finden,

wäre es nötig, das Repertoire von Genen, die spezifisch in metastasierenden Zellen, aber nicht in ihren nicht-metastasierenden Genstücken exprimiert werden, zu beschreiben und zu vergleichen.

Unterschiedliche Testmethoden sind verwendet worden, um Gene zu überprüfen, die während des Fortschreitens zu metastatischer Kompetenz hoch- und herunterreguliert werden und jede dieser Studien hat ein oder mehrere solcher Gene identifiziert. Keine dieser Studien war jedoch fähig, die Unterschiede in den Genexpressionsprofilen von metastasierenden im Vergleich zu nicht-metastasierenden Zellen effektiv und vollständig zu analysieren. Wir haben uns dieser Frage zugewendet, indem wir die Suppression Subtractive Hybridisation

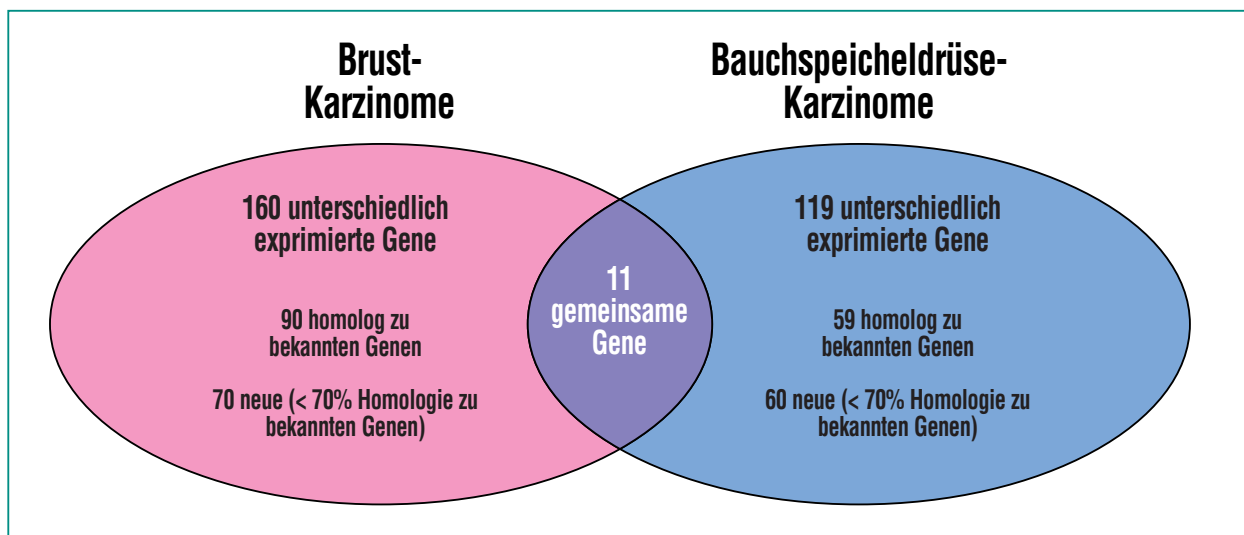


Abb. 2: Zusammenfassung der Gene, die durch SSH identifiziert wurden, welche unterschiedlich in metastasierenden Zellen im Vergleich zu ihren verwandten, nicht metastasierenden Zellen exprimiert sind. Im Brustkarzinom-SSH-Test wurden MTPa-Zellen (nicht-metastatisch) mit MTLy-Zellen (metastatische Zellen) verglichen. Im Bauchspeicheldrüsekarzinom-SSH-Test wurden 1AS-Zellen (nicht metastatisch) mit ASML (metastatische Zellen) verglichen. Insgesamt wurden 268 unterschiedlich exprimierte Gene identifiziert, von denen 11 in beiden Brust- und Bauchspeicheldrüsekarzinom-SSH-Tests nachgewiesen wurden. Für weitere Details siehe [3].

(SSH) verwendeten, in der Erwartung vollständiger die globalen Veränderungen der Genexpression beschreiben zu können, die sich ereignen, wenn Tumore metastatische Eigenschaften entwickeln [3]. Speziell verglichen wir die Genexpressionsprofile von genetisch verwandten metastatischen und nicht-metastatischen Zellen.

Unsere SSH-Tests weisen darauf hin, dass der genetische Hintergrund der Tumormetastasierung ziemlich komplex ist (Abb. 2). Wir isolierten 268 unabhängige, unterschiedlich exprimierte Gene, zirka die Hälfte von ihnen sind bereits bekannte Gene (vollständige Information über diese Gene sind erhältlich unter <http://igtmv1.fzk.de/www/itg/sleeman/sleeman.html>). Die Expression einiger dieser bekannten Gene, ist schon mit Metastasierung assoziiert worden. Die verbleibenden Gene, die wir isoliert haben, sind neue vorher nicht publizierte Sequenzen. Nur 11 dieser Gene wurden in beiden SSH-Tests isoliert und somit wurde die Mehrzahl der Gene in nur einem der Tests, aber nicht in dem anderen, isoliert. Als wir jedoch zufällig die Expression der Gene überprüfen, die in nur einem der SSH-Tests isoliert wurden, wurde beobachtet, dass eine große Anzahl von ihnen differentiell in Metastasen verwandten Brust- und Bauchspeicheldrüsenkarzinom-Modellen exprimiert sind [3]. Dies weist auf zwei Dinge hin. Erstens: der Vorrat an Genen, die differentiell in Brust- und Bauchspeicheldrüsenkarzinom-Modellen exprimiert werden, ist viel größer als die 11 Gene, wel-

che in beiden SSH-Tests isoliert wurden. Zweitens: die Anzahl von Genen, die unterschiedlich in den von uns verwendeten metastasierenden und nicht-metastasierenden Zellen exprimiert sind, müssen bedeutend höher sein als die 268 unabhängigen Sequenzen, die wir erhalten haben.

Warum verändert sich das Genexpressionsmuster in Tumoren?

Unsere Daten zeigen, dass während des metastatischen Fortschreitens viele Gene ihr Expressionsmuster verändern. Genomische Instabilität ist möglicherweise die genetisch treibende Kraft hinter diesen Veränderungen. Die Genome von Tumorzellen sind instabil, aufgrund von Mutationen und dem Ausfall von Genen wie z.B. p53, die eine entscheidende Rolle spielen in der Zellantwort auf DNA-Zerstörung. Dies hat zur Folge, dass Zellen mit geschädigter DNA überleben und proliferieren, mit der Gefahr, dass Veränderungen bestehen und/oder Gene amplifiziert werden. Diese Mutationen und chromosomalen Veränderungen, die so entstehen, sind zellspezifisch und werden in einem sich entwickelnden Tumor zu einem heterogenen Genexpressionsmuster führen. Während der Tumorausbreitung werden nur solche Tumorzellen die zahlreichen Selektionsdrücke überleben und zu progressiven sekundären Tumoren wachsen, die Veränderungen in der Genexpression erworben haben, die ihnen Eigenschaften verleihen, die sie für die Metastasierung benötigen. Viele Veränderungen in der Genexpression,

die aus genomischer Instabilität resultieren, haben jedoch keine funktionelle Relevanz für die Metastasierung, da in Folge der genomischen Instabilität nicht nur das Expressionsmuster der Gene verändert wird, die relevant für Metastasierung sind, sondern auch Gene, welche keine oder eine nur untergeordnete Rolle in der Metastasierung haben. Mehrnoch, nicht alle Gene, die unterschiedlich in metastasierenden Zellen exprimiert werden, sind tatsächlich notwendig für den Prozess der Metastasierung.

Welche der Gene, die wir identifiziert haben, sind wichtig für die Metastasierung?

Um solche Gene zu identifizieren, die die stärkste Relevanz in Bezug auf Metastasierung besitzen, haben wir eine Vielzahl von Testmethoden verwendet. Erstens, haben wir Northern Blots verwendet, um solche Gene zu identifizieren, deren Expression in vielen Tumormodellen mit Metastasierung assoziiert ist. Zu solchen Genen zählen CD24 und das ribosomale Protein S7 [3]. Wir haben gezeigt, dass CD24 und S7 auch in humanen metastasierenden Tumoren hochreguliert sind. Ihre funktionelle Bedeutung für die Metastasierung wird gerade durch Geninaktivierung und durch ecotopische Expression getestet. Zweitens, verstärkte Beweglichkeit ist oft eine Eigenschaft von metastatischen Zellen, deshalb haben wir in unseren Tests auch nach Genen gesucht, die in aktivierten Lymphozyten und in Makrophagen (bewegliche Zellen des Immunsystems) exprimiert sind. Da-

bei identifizierten wir das unmittel-
bar frühe Gen Pip92 und ein neu-
es Gen, welches bis jetzt noch
nicht beschrieben ist. Wiederum
waren diese Gene in bestimmten
humanen Tumoren hochreguliert
und momentan überprüfen wir, ob

ihre Expression eine wichtige
Funktion für Metastasierung be-
sitzt. Weiterführende Studien mit
unseren Genen, die mit Metasta-
sierung assoziiert sind, werden
weitere wichtige Einblicke in die
genetischen Grundlagen der Tu-

mormetastasierung geben und
vielleicht Zielobjekte für therapeu-
tische Ansätze in der Metastase-
nerkrankung identifizieren.

Literatur

- [1] *Deutsche Krebshilfe.*
Siehe [http://www.krebshilfe.de/
neu/medieninfos/stat.html](http://www.krebshilfe.de/neu/medieninfos/stat.html)
- [2] J.P. Sleeman,
*The lymph node as a bridgehead in
the metastatic dissemination of
tumors.*
Recent Results Cancer Res 2000;
157: 55-81
- [3] A. Nestl, O.D. von Stein, K. Zatloukal,
W.-G. Thies, P. Herrlich, M. Hofmann,
J.P. Sleeman ,
*Gene expression patterns associated
with the metastatic phenotype in
rodent and human tumors.*
Cancer Res 2001; in press