

2.2 Zellzyklus und Apoptose

PETER DANIEL

Widmung

Meinem Vater, Werner Daniel
(*21. 2. 1925 † 12. 6. 1999)

Denn wir sind nur die Schale und das Blatt
Der große Tod, den jeder in sich hat,
das ist die Frucht, um die sich alles dreht.
R. M. Rilke

Inhaltsverzeichnis

2.2.1	Einleitung	130	2.2.4	Einfluss chromosomaler Translokationen und von Fusionsgenen auf Zellzyklus und Apoptose	166
2.2.2	Zellvermehrung	131	2.2.4.1	MLL-AF4	166
2.2.2.1	Zellzyklusregulation und der G ₁ -Restriktionspunkt	132	2.2.4.2	E2A-HLF	167
2.2.2.2	S-Phase und G ₂ -Checkpoint	138	2.2.4.3	AML1 und CBF	168
2.2.2.3	Kontrolle des Mitoseendes durch den Mad-Signalweg	140	2.2.4.4	PML-Fusionsgene	169
2.2.2.4	Zellzyklus und Apoptose	141	2.2.4.5	NFκB-Signalweg, Überlebenssignale und Bcl-10	169
2.2.2.5	DNA-Reparatursignalwege, genetische und chromosomale Stabilität	146	2.2.4.6	Caspasen, Inhibitorproteine und API2/MALT1	171
2.2.2.6	Inaktivierung der Zellzyklusregulation in Tumoren	150	2.2.5	Erkrankung mit gesteigerter Apoptose	172
2.2.3	Zelltodsignalwege	152	2.2.5.1	DNA-Reparaturdefektsyndrome	172
2.2.3.1	Death-Rezeptoren	153	2.2.5.2	Myelodysplastisches Syndrom	173
2.2.3.2	Mitochondrien und Apoptose	156	2.2.5.3	Virale und bakterielle Infektionen, Toxine und Entzündung	174
2.2.3.3	Endoplasmatisches Retikulum und Apoptose	158	2.2.6	Therapieinduzierte Apoptose, Therapieresistenz von Tumorzellen und neue Therapieansätze	174
2.2.3.4	Vernetzung der Apoptosesignalwege	158	2.2.7	Ausblick	176
2.2.3.5	Exekution des apoptotischen Zelltods	159	2.2.8	Literatur	176
2.2.3.6	Störung von Zelltod- und Überlebenssignalen in Tumoren	160			

2.2.1 Einleitung

Die Regulation von Zellproliferation und Zelltod erfolgt durch eng miteinander verknüpfte Signalwege. Im normalen und ausgereiften, adulten, sich aber dennoch ständig selbst erneuernden Gewebe besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Zellproliferation durch mitotische Teilung und Zelleruntergang durch programmierten Zelltod (Apoptose) (Kerr et al. 1972; Meier et al. 2000; Evan u. Vousden 2001). Beide Phänomene werden durch komplizierte Regulationssysteme engmaschig kontrolliert (Krammer et al. 1994; Daniel 2000). Dies spiegelt sich auch in der Bedeutung dieser beiden zellbiologischen Phänomene bei der Entstehung von benignen (McDonnell et al. 1989) und malignen Tumoren wieder (Tsujimoto et al. 1984; Vaux et al. 1988; Burns et al. 1991; Yonish-Rouach et al. 1991; Soengas et al. 1999).

Die ungehemmte Aktivierung von Zellzyklus aktivierenden Signalwegen erleichtert die Tumorentstehung, ebenso wie die Inaktivierung von Zelltodsignalwegen (Wyllie et al. 1999). Eine onkogene Kooperation zwischen Zellzyklus- und Apoptosederegulation konnte z.B. bei der malignen Transformation durch das *c-myc*- und das *bcl-2*-Gen in transgenen Mäusen gezeigt werden (McDonnell u. Korsmeyer 1991). Überexpression von *bcl-2* im B-Zell-Kompartiment allein löste eine Hyperplasie der B-Zell-Regionen in den Lymphgeweben aus. Die spontane oder transgene Überexpression des *c-myc*-Gens führte hingegen zu hochmalignen B-Zell-Lymphomen. Ebenso fördert das *K-ras*-Onkogen nicht nur Zellwachstum, sondern hemmt auch Zelltodsignalwege (Adjei 2001).

Alle malignen Tumoren weisen solche Störungen der Proliferations- und der Zelltodkontrolle auf (Abb. 2.2.1). Maligne Tumoren sind häufig genetisch instabil und akkumulieren nach den initia-

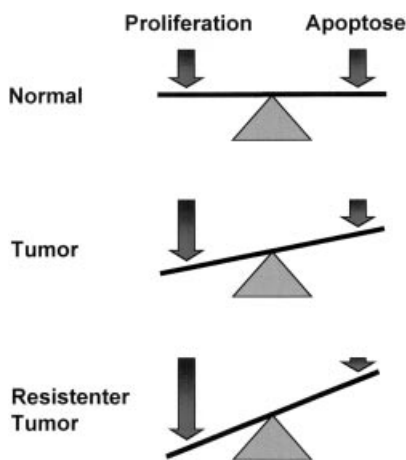


Abb. 2.2.1. Balance von Zellvermehrung und Zelluntergang. In normalem Gewebe herrscht ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod. Unerwünschte Zellen werden durch Apoptose eliminiert. In malignen Tumoren entsteht ein Ungleichgewicht: Zellproliferation nimmt zu und Apoptose ist gehemmt. In der malignen Progression, z.B. durch Entstehung von Resistenz gegen zytotoxische Therapien oder bei Metastasierung, nimmt diese Imbalance weiter zu

len transformierenden genetischen Ereignissen weitere, sekundäre genetische Veränderungen (Hoeijmakers 2001). Dies kann zu einem weiteren Verlust der Proliferationskontrolle und noch stärkerer Apoptoseresistenz führen. Solche Veränderungen werden im Rahmen der Tumorphysion beobachtet, d.h. bei der Entstehung aggressiverer und therapieresistenter Tumoren (Abb. 2.2.1), z.B. als Folge einer Chemo- oder Strahlentherapie.

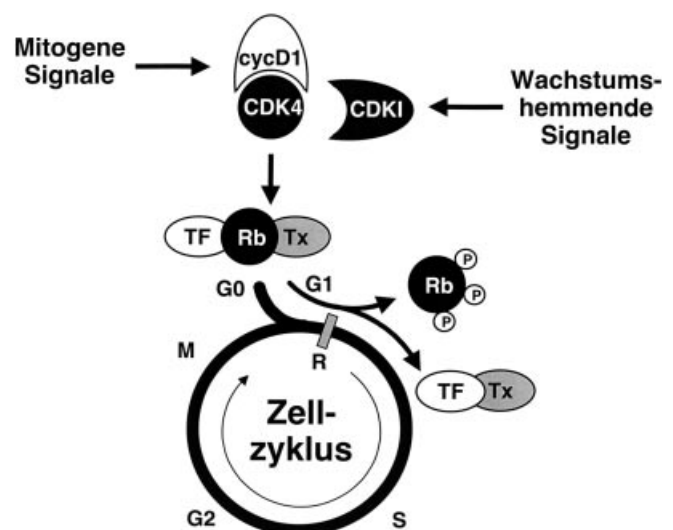
Neuere Daten zeigen, dass die Hemmung von Zelltod zumeist nicht direkt an der eigentlichen

malignen Transformation beteiligt ist, sondern nur das Überleben der betroffenen Zellen verlängert, es entsteht ein hyperplastisches Gewebe. Hierdurch wird allerdings die Akkumulation genetischer Veränderungen erleichtert, die dann sekundär zum Verlust der Proliferationskontrolle führen. Beide Phänomene können also nicht isoliert betrachtet werden, und die beteiligten Signalwege sind auf einer Vielzahl von Ebenen engmaschig miteinander verknüpft.

2.2.2 Zellvermehrung

Zellwachstum entsteht durch Progression der Zelle durch den Zellzyklus (Gillett u. Barnes 1998), der sich aus 4 definierten, voneinander abgrenzbaren Phasen zusammensetzt: G₁-, S-, G₂- und M-Phase. Das Fortschreiten einer Zelle aus der G₀-Ruhephase in die G₁-Phase (Gap-Phase 1) des Zellzyklus und aus der G₁-Phase in die S-Phase wird durch den G₁-Restriktionspunkt in der späten G₁-Phase reguliert (Abb. 2.2.2) (Sherr u. Roberts 1999; Donjerkovic u. Scott 2000). Ist dieser Kontrollmechanismus durch physiologische Stimuli, wie z.B. Wachstumsfaktoren (s. unten) oder Deregulation von Kontrollgenen (in Tumorzellen), aufgehoben, geht die Zelle in die S-Phase über und beginnt mit der DNA-Synthese. Ist die S-Phase abgeschlossen, gelangt die Zelle nach Durchlaufen der G₂-Phase, in der die Segregation der replizierten DNA vorbereitet wird, in die M-Phase, die Mitose. Die Zellteilung wird im Anschluss beendet und die aus

Abb. 2.2.2. Zellzyklus, mitogene und wachstumshemmende Signale. Wachstumsfördernde, mitogene Signale lösen den Eintritt ruhender Zellen aus der G₀- in die G₁-Phase und aus der G₁- in die S-Phase aus. Wesentlich ist die Steigerung der Cyclinexpression, wobei Cycline als Kofaktoren cyclinabhängige Kinasen (CDK) aktivieren. Wachstumshemmende Signale wirken z.B. über Steigerung der Expression von CDK-Inhibitoren (CDKI). Aktive Cyclin-CDK-Komplexe phosphorylieren Mitglieder der Rb-Proteinfamilie, die daraufhin ihren hemmenden Einfluss auf Transkriptionsfaktoren (TF) verlieren. Diese Transkriptionsfaktoren sind zumeist Heterodimere aus TF und Dimerisierungspartnern (Tx), die erst die DNA-Bindung und Promotoraktivierung ermöglichen (z.B. E2F- und Dp-Proteine, Myc und Max, c-Fos und c-Jun). Diese TF induzieren die Expression von Genen, die den Eintritt in die nächste Zellzyklusphase vermitteln. CDKI vermitteln Zellzyklusarrest



der Mitose hervorgegangenen Tochterzellen befinden sich nun wieder in der G₁-Phase.

Wesentliche Erkenntnisse zur Regulation der Proliferation wurden in Hefezellen gewonnen, v.a. der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* und der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* (Kuntzel et al. 1996; Stern u. Nurse 1996; Moser u. Russell 2000). Defektmutanten führten zur Entdeckung der Cycline als Motor des Zellzyklus. Die Expression dieser Proteine oszilliert, und zu bestimmten Phasen des Zellzyklus werden bestimmte Cycline hoch- oder herunterreguliert (Hunt 1991). Die Cycline (Johnson u. Walker 1999) regulieren die Enzymaktivität cyclinabhängiger Kinasen (CDK, s. unten), die über die Phosphorylierung von Substratproteinen das Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus koordinieren (Hengstschlager et al. 1999; Li u. Blow 2001).

Zudem steuern weitere Gene die Aktivität dieser Kinasen und ermöglichen hierdurch die Kontrolle des Fortschreitens der Zelle durch die Phasen des Zellzyklus. Dies erfolgt an bestimmten Zeitpunkten, die bestimmte Schlüsselsignale erfordern, um ein Fortschreiten im Zellzyklus zu ermöglichen, und daher als Check- oder auch Restriktionspunkte bezeichnet werden (Funk 1999; Johnson u. Walker 1999). Im engeren Sinn sind Checkpunkte „Mechanismen, die eine Abhängigkeit zwischen 2 ansonsten biochemisch nicht miteinander vernetzten Regelwerken herstellen“. Die einzelnen Abschnitte des Zellzyklus setzen sich aus einer ganzen Reihe solcher, in festgelegter Folge ablaufender und zeitlich aufeinander abgestimmter Prozesse zusammen, die letztlich zur Teilung der Zelle in 2 Tochterzellen führen. Hierbei sind die exakte Verdopplung und Verteilung des Genoms in die beiden Tochterzellen zu fordern, um genetische Stabilität zu gewährleisten. Solche Checkpunkte, die mittlerweile in jeder Zellzyklusphase bekannt sind, gestatten das Fortschreiten der Zelle im Zyklus nur dann, wenn bestimmte Signalkombinationen vorliegen. Ist dies nicht der Fall, werden Signalwege aktiviert, die zu Zellzyklusarrest und Reparatur oder programmiertem Zelltod, Apoptose, führen.

Checkpunktkontrolle muss also v.a. dann stattfinden, wenn ein nachgeschalteter Vorgang auch ohne den korrekten Abschluss des vorigen Prozesses beginnen und hierdurch der Zelle irreparablen Schaden zufügen könnte. Diese Regelwerke sind in malignen Tumoren häufig gestört, was sich in der Aneuploidie und dem häufig komplexen Karyotyp verschiedenster Tumorzellen in Folge genetischer und chromosomaler Instabilität widerspiegelt.

2.2.2.1 Zellzyklusregulation und der G₁-Restriktionspunkt

Mitogene, also wachstumsstimulierende Signale vermitteln den Eintritt der Zelle aus der G₀-Ruhephase in die G₁-Phase und aus der G₁- in die Synthesephase (S-Phase), indem sie die Transkription der G₁-Phase-Cycline (D-Typ-Cycline und Cyclin E) (Johnson u. Walker 1999) auslösen und die entsprechenden cyclinabhängigen Kinasen aktivieren (Kasten u. Giordano 1998; Ekholm u. Reed 2000). Wachstumshemmende Signale hingegen stimulieren die Transkription und die Aktivität von Inhibitoren der cyclinabhängigen Kinasen (CDKI, s. unten) und aktivieren hierdurch Checkpunkte wie den G₁-Restriktionspunkt (Abb. 2.2.2).

Die Progression von Säugerzellen aus der G₁- in die S-Phase ist durch spezifische Veränderungen im Genexpressionsprofil gekennzeichnet. Die ersten induzierten Gene sind so genannte Immediate-early-Gene, deren Transkription wenige Minuten nach der mitogenen Stimulation beginnt und ihr Maximum innerhalb der ersten 30–60 min erreicht. Immediate-early-Gene sind zumeist Transkriptionsfaktoren, wie z.B. die *c-fos*- und *c-jun*-Protoonkogene, die den AP-1-Faktor kodieren. Ihre Transkription, also mRNA-Expression, kann nicht durch Hemmer der Proteinbiosynthese wie z.B. Cycloheximid blockiert werden, ist durch präformierte, konstitutiv exprimierte Proteine der entsprechenden Signaltransduktionskaskaden vermittelt (immediate) und erfolgt daher früh nach Aktivierung (early). Eine 2. Klasse von Genen, die der Delayed-early-Gene, wird 3–6 h nach mitogener Stimulation exprimiert und durch die Immediate-early-Faktoren vermittelt. Zu diesen Delayed-early-Genen gehören die G₁-Cycline (Cyclin D, Cyclin E) und auch E2F und *c-myc*. Eine 3. Gengruppe wird erst spät in der G₁-Phase exprimiert, und diese Gene sind Vorboten der G₁-S-Phasen-Progression, also des Übergangs von der G₁- in die S-Phase. Die Expression dieser Gene wird durch *c-myc* und Mitglieder der E2F-Familie stimuliert (s. unten) bzw. durch hypophosphorylierte Rb-Familienmitglieder gehemmt.

Neben dem G₁-Restriktionspunkt sind zusätzliche Checkpunkte aktiv, die den Fortschritt der Zelle durch jede der Phasen des Zellzyklus kontrollieren. Zellen sind während des Zellzyklus sehr empfindlich und können wesentlich leichter irreversibel und letal geschädigt werden. Die Checkpunkte werden z.B. nach DNA-Schädigung durch Zytostatika oder ionisierende Bestrahlung aktiviert, wodurch die Zelle nicht nur in der G₁-Phase,

sondern auch in der S-, v.a. aber auch in der G₂- und den einzelnen Schritten der M-Phase arretiert werden kann, um die entstandenen Schäden zu reparieren.

Die Progression der Zelle durch den Zellzyklus wird durch den Rb-Signalweg kontrolliert.

Zellzyklushemmung durch die Retinoblastom(Rb)-Genfamilie

Die Rb-Familie besteht aus den funktionell und strukturell nahe verwandten Genen *pRb*, *p107* und *p130* (Grana et al. 1998; Kasten u. Giordano 1998; Kaelin 1999; Tamrakar et al. 2000; Vidal u. Koff 2000; Classon u. Dyson 2001). Die Inaktivierung beider pRb-Allele, vorwiegend durch Keimbahnmutationen, ist mit der Entstehung von Retinoblastomen assoziiert. Diese malignen Tumoren der Netzhaut treten im frühen Kindesalter auf. Das Spektrum somatischer und hereditärer Keimbahnmutationen ist durch Mutation kleiner Genabschnitte geprägt, die sich durch erhebliche Heterogenität auszeichnen und über das gesamte Rb-Gen verteilt gefunden werden. Einige der Mutation betreffen das Spleißen der mRNA oder führen prä-mature Stoppkodons ein und resultieren in der Expression trunkierter, verkürzter und somit funktionsdefekter Proteine bzw. hemmen die Proteinexpression vollständig. Mit wenigen Ausnahmen entwickeln von solchen Mutationen betroffene Kinder bilaterale, beide Augen betreffende Netzhauttumoren. Neben diesen familiär schon im frühen Kindesalter auftretenden Tumoren wird eine Inaktivierung von Rb infolge somatischer Mutationen oder Deletion des Genlocus in einer Vielzahl von Tumoren, auch beim Erwachsenen, beobachtet.

Die wachstumskontrollierende Funktion von Rb-Proteinen beruht auf ihrer Fähigkeit, reversibel an Transkriptionsfaktoren wie z.B. E2F (s. unten) zu binden (Johnson u. Schneider-Broussard 1998). Rb ist ein transkriptioneller Repressor, der durch die Interaktion mit diesen E2F-Transkriptionsfaktoren spezifisch die Promotoraktivierung Zellzyklus regulierender Gene hemmt. Wird Rb durch die Bindung an E2F an einen Promotor gebunden, hemmt es ebenfalls umgebende Transkriptionsfaktoren und blockiert hierdurch die Transkriptionsmaschinerie für das betroffene Gen. Dadurch wird die Transkription Zellzyklus-promovierender Gene gehemmt, und die Zelle wird im Zellzyklus (in diesem Fall in der G₁-Phase) arretiert.

Die Bindungstasche in Rb (Pocketdomäne) für diese Transkriptionsfaktoren prägte den Begriff „Pocketproteine“, der häufig synonym für die Rb-Proteinfamilie gebraucht wird (Classon u. Dyson

2001). Die A- und die B-Domäne in pRb und seinen Homologen p107 und p130 sind evolutionär konserviert und bilden das Repressormotiv der Bindungstasche, über das die Bindung an E2F und der dominant-negative Effekt auf die Transkription von S-Phase-Proteinen vermittelt wird.

Die Bindung von pRb an E2F wird durch den Phosphorylierungsstatus von pRb reguliert (s. unten) (Kaelin 1999; Tamrakar et al. 2000). In seiner hypophosphorylierten Form inhibiert pRb Transkriptionsfaktoren der E2F/Dp-Familie und verhindert hierdurch die Hochregulation von Genen, die z.B. für die Aktivierung der DNA-Synthese während der S-Phase benötigt werden. Um im Zellzyklus fortschreiten zu können, muss Rb daher phosphoryliert und hierdurch funktionell inaktiviert werden.

Das mehrfach phosphorylierte Rb kann nicht mehr mit E2F-Faktoren interagieren, die nun mit den Dimerisierungspartnern der Dp-Familie (Yamasaki 1999), Dp1-1 und Dp1-2, in Wechselwirkung treten und hierdurch biologisch aktive Transkriptionsfaktoren bilden (Johnson u. Schneider-Broussard 1998; Kaelin 1999). Vergleichbares gilt für die Interaktion von Myc-Proteinen mit dem Dimerisierungspartner Max (Amati et al. 1992; 1993a,b). Die aus der Bindung an Dp-Proteine resultierende Aktivierung von E2F und Aktivierung entsprechender S-Phase-spezifischer Genpromotoren löst die G₁-S-Transition aus und aktiviert die Transkription von Genen, wie z.B. Histonen, PCNA (proliferating cell nuclear antigen), Thymidylatsynthase, Dihydrofolatreduktase und Ribonukleotidreduktase. Hierdurch wird die Transition der Zelle aus der späten G₁-Phase in die S-Phase ermöglicht (s. unten) (Johnson u. Schneider-Broussard 1998).

Diese Rb-Phosphorylierung wird durch cyclin-abhängige Kinasen (cyclin-dependent kinases, CDK) vermittelt (Li u. Blow 2001). Die Aktivität dieser Kinasen wird durch spezifische Kofaktoren, die Cycline, reguliert, deren Expression in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus rasch ansteigt und ebenso rasch gegen Ende der jeweiligen Zellzyklusphase wieder abfällt, also oszilliert (Abb. 2.2.3).

Die Rolle von Rb in den späteren Zellzyklusphasen ist weniger gut definiert (Grana et al. 1998; Kasten u. Giordano 1998; Kaelin 1999; Tamrakar et al. 2000). Sicher ist, dass Rb in der G₂-M-Phase dephosphoryliert wird. Auch in der S-Phase wurde eine hemmende Wirkung von (dephosphoryliertem) Rb auf die DNA-Synthese beschrieben. Rb bleibt daher über die S- und G₂-Phase phosphoryliert, bis es dann gegen Ende der Mitose dephos-

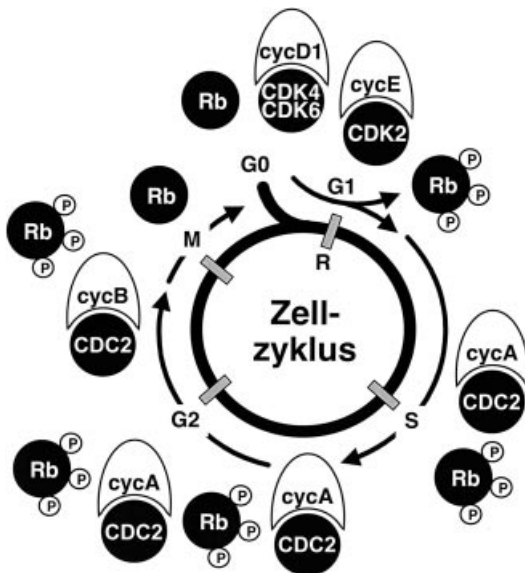


Abb. 2.2.3. Regulation der Rb-Phosphorylierung. In der G₁-Phase werden Rb-Proteine in 2 Schritten phosphoryliert: in der frühen G₁-Phase durch Cyclin D1, D2 oder D3 und CDK4 oder CDK6. In der späten G₁-Phase vermittelt der Cyclin-E-CDK2-Komplex den zweiten Phosphorylierungsschritt und löst hierdurch S-Phase-Progression aus. Die CDK CDC2 (CDK1) erhält Rb über die S-Phase (CDK-Kofaktor Cyclin A) und die G₂-Phase (CDK-Kofaktor Cyclin B1 bzw. B2) hinweg im hyperphosphorylierten Zustand. Mit Eintritt in die M-Phase wird Cyclin B herunterreguliert und abgebaut, sodass Rb dann über die Rb-Phosphatase PP1 und auch indirekt über PTEN dephosphoryliert werden kann und die Tochterzellen erneut in der G₁-Phase sind, bis der nächste Zellzyklus aktiviert wird. Rb kann auch hypophosphoryliert werden, indem CDK durch den Abbau von Cyclin-CDK-Komplexen über das Proteasom inaktiviert werden, wie z.B. durch den APC-Komplex, der Ubiquitylierung und Abbau von B-Typ-Cyclinen auslöst

phoryliert wird, und die Zelle hierdurch erneut in der G₁-Phase arretiert ist (Abb. 2.2.3). Rb-Dephosphorylierung erfolgt u.a. durch die PP1-Proteinphosphatase (Tamrakar et al. 2000). Auch für die PTEN-Phosphatase (s. unten, Abschnitt 2.2.3.6 „Störung von Zelltod- und Überlebenssignalen in Tumoren“, Unterabschnitt „Kinasignalwege und Apoptoseresistenz: die PTEN-Phosphatase“) wurde eine, allerdings indirekte Wirkung auf die pRb-Phosphorylierung beschrieben. Eine Überexpression des *pten*-Tumorsuppressorgens kann die Proliferation von Tumorzellen hemmen und geht mit einer Dephosphorylierung von pRb einher. Dieser Effekt wird über die PI3- und Akt-Kinase vermittelt (vgl. Abschnitt 2.2.3.6 „Störung von Zelltod- und Überlebenssignalen in Tumoren“, Unterabschnitt „Kinasignalwege und Apoptoseresistenz: die PTEN-Phosphatase“).

Zellzyklusregulation

durch Cycline und cyclinabhängige Kinasen

Der Übergang von einer in die nächste Phase des Zellzyklus wird durch cyclinabhängige Kinasen (cyclin dependent kinases, CDK) reguliert. Diese Enzyme bilden einen Komplex mit jeweils spezifischen Kofaktoren, den Cyclinen. Die aktiven Cyclin-CDK-Komplexe phosphorylieren Substratproteine, z.B. die Pocketproteine der Rb-Familie (Abb. 2.2.4). Cyclin-CDK-Komplexe regulieren hierdurch die entscheidenden Kontrollpunkte des Zellzyklus.

Werden ruhende Zellen durch Wachstumsfaktoren stimuliert, erfolgen die Regulation der initialen Schritte der Zellvermehrung und der Eintritt in die S-Phase durch D-Typ-Cycline (Cyclin D1, D2 und D3) und ihre katalytischen Partner CDK4 und CDK6. Solche proliferationsaktivierenden Signale, z.B. über die RAS-Aktivierung und die MAP-Kinase-Kaskade (Malumbres u. Pellicer 1998) oder NFκB-Aktivierung, stimulieren die Expression von Cyclin D1 bzw. dessen beiden Homologen Cyclin D2 und D3. Die neu gebildeten Cycline binden an CDK4 und CDK6, wodurch deren Kinaseaktivität angeschaltet wird. Diese Cyclin-CDK-Komplexe vermitteln dann die Phosphorylierung von pRb.

Dieses Prinzip der Aktivierung einer CDK durch ein spezifisches Cyclin findet sich in allen Zellzyklusphasen. So interagiert in der frühen G₁-Phase Cyclin D mit CDK4 und CDK6, gefolgt von Cyclin E/CDK2 in der späten G₁-Phase, Cyclin A/CDK2 in der S-Phase, Cyclin A/CDC2 (CDK1) in der späten S-Phase und dem S-G₂-Übergang sowie Cyclin B/CDC2 (CDK1) in der G₂-Phase und dem G₂-M-Übergang (Abb. 2.2.4). Während in epithelialen Zellen vorwiegend D1-Cyclin funktionell relevant ist, sind in hämatopoetischen Zellen besonders D2- und D3-Cyclin exprimiert (Suzuki et al. 1999).

Die D-Typ-Cycline (Cyclin D1, D2, D3) kontrollieren gemeinsam mit Cyclin E (Keyomarsi u. Herliczek 1997) den G₁-Restriktionspunkt (Abb. 2.2.3 und 2.2.4). Rb wird durch diese D-Cycline und die assoziierten Kinasen CDK4/6 phosphoryliert, wodurch es zur Hochregulation von Cyclin E kommt, das wiederum durch Aktivierung von CDK2 einen 2. Rb-Phosphorylierungsschritt in der späten G₁-Phase auslöst (Keyomarsi u. Herliczek 1997; Vidal u. Koff 2000). CDK2 vermittelt, gemeinsam mit Cyclin E, nicht nur die Progression in die S-Phase und den Beginn der DNA-Replikation, sondern auch die Duplikation des Zentrosoms, den ersten Schritt zur Verdopplung der Chromosomen.

Die CDK zeigen im Verlauf des Zellzyklus eine relativ lange Halbwertszeit. Im Gegensatz hierzu oszillieren die Expressionsspiegel der Cycline in

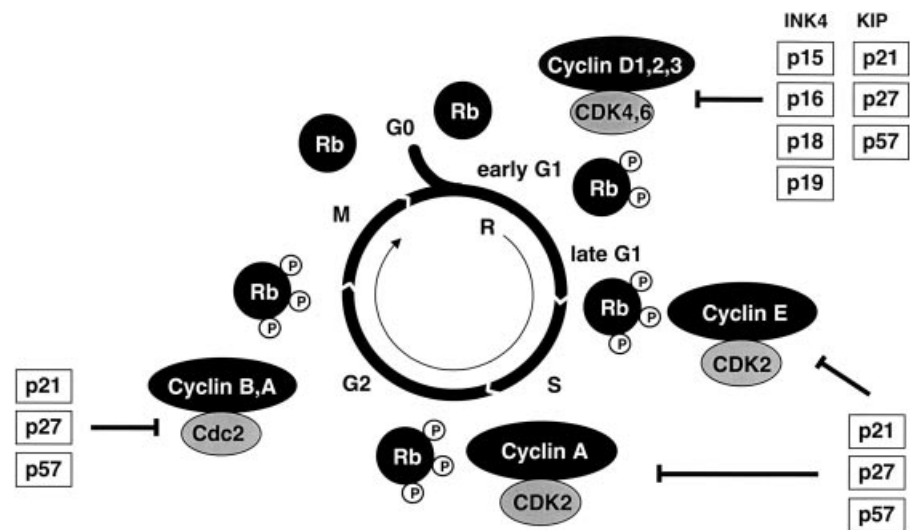


Abb. 2.2.4. Regulation der Zellzyklusphasen durch Cycline und cyclinabhängige Kinasen (CDK). In jeder der Zellzyklusphasen sind spezifische Cycline exprimiert, die mit spezifischen CDK interagieren und sie hierdurch aktivieren. Diese CDK phosphorylieren Rb und ermöglichen den Fortschritt der Zelle durch den Zellzyklus, bis Rb gegen Ende des Zellzyklus durch Phosphatasen dephosphoryliert wird

und die aus der Mitose hervorgegangenen Tochterzellen nach Ende der M-Phase erneut in der G₁-Phase sind. CDKI können diese Cyclin-CDK-Komplexe in jeder Zellzyklusphase hemmen und Zellzyklusarrest auslösen. Die CDKI der INK4a-Familie hemmen G₁-Phase-Cycline während die CDKI der KIP-Familie auch S- und G₂-Phase Cyclin-CDK-Komplexe hemmen

den verschiedenen Phasen des Zellzyklus, und die phasenspezifischen Cycline werden rasch beim Übergang in die nächste Phase des Zellzyklus nach Export aus dem Zellkern in das Zytoplasma ubiquitinyliert und über das Proteasom abgebaut, begleitet vom Anstieg des Expressionsniveaus des nächsten Cyclins. Demzufolge führt die Herunterregulation der Cyclin-B-Spiegel am Ende der G₂- und Beginn der M-Phase zur Hypophosphorylierung von Rb und ermöglicht somit, im Zusammenspiel mit dem APC-Mad-Signalweg und Deaktivierung des Anaphasecheckpunkts das Ende des Zellzyklus nach Abschluss der Mitose (Abb. 2.2.3 und 2.2.4) (Peters 1999).

Inhibitoren der cyclinabhängigen Kinasen

Die Aktivität der CDK wird durch spezifische Inhibitoren negativ reguliert. Diese werden als CDKI bezeichnet (cyclin-dependent kinase inhibitors). Bisher konnten 2 Unterfamilien der CDKI identifiziert werden:

1. die CIP/KIP-Familie, die multiple verschiedene Cyclin-CDK-Komplexe hemmen kann, und
2. die INK4-Familie, die spezifisch CDK4 und CDK6 hemmt (Abb. 2.2.3).

Die Aktivität von CDK2 (assoziiert mit Cyclin E) kann durch CIP/KIP-CDKI-Proteine gehemmt werden (p21^{Waf1/Cip1}, p27^{Kip1} und p57^{Kip2}). Diese CIP/

KIP-Faktoren verfügen über eine konservierte, homologe Domäne, die die Bindung und Hemmung von CDK2 und CDK4 vermittelt. Diese Proteine wirken stöchiometrisch und hemmen bevorzugt CDK2-Komplexe, obwohl sie in vitro mit allen in der G₁-Phase gebildeten CDK-Komplexen interagieren können.

Die INK4-Familie (inhibiert CDK4) besteht aus 4 nahe verwandten Faktoren: p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} und p14^{INK4d} (Roussel 1999). Die INK4-Familienmitglieder verhindern die Progression aus der G₁-Phase in die S-Phase des Zyklus, indem sie die Phosphorylierung von Rb verhindern. Dies erfolgt durch Hemmung der D-Cyclin-abhängigen CDK4 und CDK6. Das somit hypophosphorylierte Rb hemmt wiederum die Aktivität von Transkriptionsfaktoren (z. B. E2F) und verhindert hierdurch die Expression von Cyclin E und weiteren für die S-Phase-Progression benötigten Faktoren (Abb. 2.2.4). Dies erklärt auch, warum INK4-CDKI für ihre Wirkung Rb benötigen.

CDC25-Phosphatasen

Die Mitglieder der CDC25-Familie sind Phosphatasen und gehören zu den Delayed-early-Genen nach Mitogenstimulation. (Das Kürzel „CDC“ stammt aus der Hefegenetik und steht für „cell division cycle“). Sie spielen in der Regulation der Progression durch die verschiedenen Zellzyklusphasen eine

zentrale Rolle (Nilsson u. Hoffmann 2000; Takizawa u. Morgan 2000; Smits u. Medema 2001; Taylor u. Stark 2001). CDC25 wurde ursprünglich in der Spaltheife *S. pombe* identifiziert, und zwar als Phosphatase, die CDC2/Cyclin-B-Aktivität reguliert und den Eintritt in die Mitose vermittelt. CDC2 wird durch CDC25 an einem evolutionär konserviertem Tyrosinrest (Tyr15) dephosphoryliert und hierdurch aktiviert (Millar u. Russell 1992).

Säugerzellen besitzen 3 CDC25-Homologe, CDC25A, -B und -C (Nilsson u. Hoffmann 2000). Diese Phosphatasen können CDK in vitro dephosphorylieren und sie hierdurch aktivieren. CDC25A vermag weiterhin, die CDC2-CDK zu aktivieren und die Bindung des CDKI-p21^{Cip/WAF-1} kompetitiv zu blockieren. Die 3 CDC25-Homologe sind während den Phasen des Zellzyklus unterschiedlich exprimiert.

Nach mitogener Stimulation wird *cdc25a* als Delayed-early-Gen in der Mitte der G₁-Phase exprimiert. *cdc25b* hingegen wird später, während der S-Phase, hochreguliert, während *cdc25c* in der G₂-Phase induziert wird. Neben der Regulation der *cdc25*-Aktivität durch transkriptionelle Aktivierung der entsprechenden *cdc25*-Gene werden diese Phosphatasen auch durch Phosphorylierung posttranslational reguliert. So wird CDC25A durch CDK2/Cyclin E in der späten G₁-Phase aktiviert und kann in vitro auch durch Cyclin-B-Komplexe phosphoryliert werden. Die Inaktivierung von CDC25A hemmt den Eintritt in die S-Phase, was zeigt, dass CDC25A für die G₁-S-Phase-Progression essenziell ist. CDC25A kann aufgrund dieser Zellzyklusprogression vermittelnden Funktion auch bei der experimentellen malignen Transformation von Fibroblasten als Onkogen mit RAS kooperieren.

CDC25C hingegen reguliert die Progression der Zelle aus der G₂-Phase heraus. Die Dephosphorylierung von CDC2 durch CDC25C aktiviert den Cyclin-B/CDC2-Komplex und reguliert den Eintritt der Zelle aus der G₂- in die M-Phase (Smits u. Medema 2001). CDC25C spielt somit eine zentrale Rolle bei der Regulation des S- und des G₂-Restriktionspunkts, der z.B. nach DNA-Schädigung bzw. Störung der DNA-Replikation, z.B. Hemmung der DNA-Replikationsgabel durch Hydroxyharnstoff (Hydroxyurea, HU) aktiviert wird. Durch solche Störungen erfolgt über Phosphorylierung die Aktivierung der CHK1- und CHK2-Kinasen (s. unten), z.T. über ATM/ATR-Kinase-abhängige Signale, wodurch die CDC25C-Phosphatase phosphoryliert und somit gehemmt und über Bindung an das 14-3-3 σ -Protein der Ubiquitinylierung und dem Abbau über das Proteasom zugeführt wird

(Fu et al. 2000; Tzivion u. Avruch 2001). Letztlich wird hierdurch die Dephosphorylierung von CDC2 durch CDC25C gehemmt und die CDC2-CDK verbleibt in ihrer inaktiven Form, wodurch ein Arrest in der G₂-Phase (oder in der S-Phase, s.u.) ausgelöst wird (Coleman u. Dunphy 1994). Die Dephosphorylierung durch CDC25C hingegen aktiviert die CDK CDC2, wodurch der Checkpoint überwunden wird und M-Phase-Progression resultiert. Über diesen Mechanismus der 14-3-3 σ -Induktion vermag z.B. p53 (neben seiner Funktion am G₁-Restriktionspunkt) auch G₂-Arrest zu vermitteln (s. unten) (Chan et al. 2000).

Inaktivierung phasenspezifischer Regulatoren durch das Ubiquitin-Proteasom-System

Die Aktivierung und der Abfall der CDK-Aktivität werden durch koordinierte Bildung und Abbau der Cycline reguliert. Das zeitgerechte Erscheinen und Verschwinden von Cyclinen ist für den korrekten Ablauf des Zellzyklus und die Wachstumskontrolle entscheidend: Überschießende Aktivität, z.B. des Cyclin-E-CDK2-Komplexes resultiert in vorzeitigem und unkoordiniertem Beginn der DNA-Synthese und vermittelt hierdurch genetische Instabilität.

Der programmierte, zeitgerechte Abbau einer Vielzahl Zellzyklus regulierender Proteine erfolgt über das Ubiquitin-Proteasom-System. Eine Kaskade von Enzymen, die als E1, E2 und E3 bezeichnet werden, katalysiert die Konjugation von Polymeren des kleinen Proteins Ubiquitin an die abzubauenen Substratproteine. Dieses Polyubiquitinmarkiert die Substratproteine für die Erkennung durch das 26S-Proteasom, über das sie abgebaut werden. Die Spezifität des Ubiquitin-Ligase-Systems wird hauptsächlich durch die E3-Enzyme gewährleistet, deren Komplexe mit anderen Faktoren als Ubiquitinligasen bezeichnet werden.

Als SCF (Skp1-CDC53-F-Box-Protein-Komplexe) bezeichnete Ubiquitinligasen sind für den Beginn der S-Phase von besonderer Bedeutung. SCF-Komplexe bestehen aus 3 zentralen Untereinheiten, die mit verschiedenen F-Box-Proteinen interagieren können. Der Bezeichnung „F-Box“ leitet sich aus einer in Cyclin F (Bai et al. 1994) identifizierten homologen Domäne ab. So bindet das F-Box-Protein CDC4 (Archipelago/Fbw7) an das Cyclin E und das Skp2-F-Box-Protein an den CDKI p27^{Kip2} (Abb. 2.2.5). Beide Proteine müssen für die Bindung an die F-Box-Proteine phosphoryliert sein (Skowyra et al. 1997). Die Bindung an die F-Box-Proteine resultiert dann in Ubiquitinylierung und konsekutivem proteasomalem Abbau (Schwab u. Tyers 2001; Strohmaier et al. 2001). F-Box-Proteine

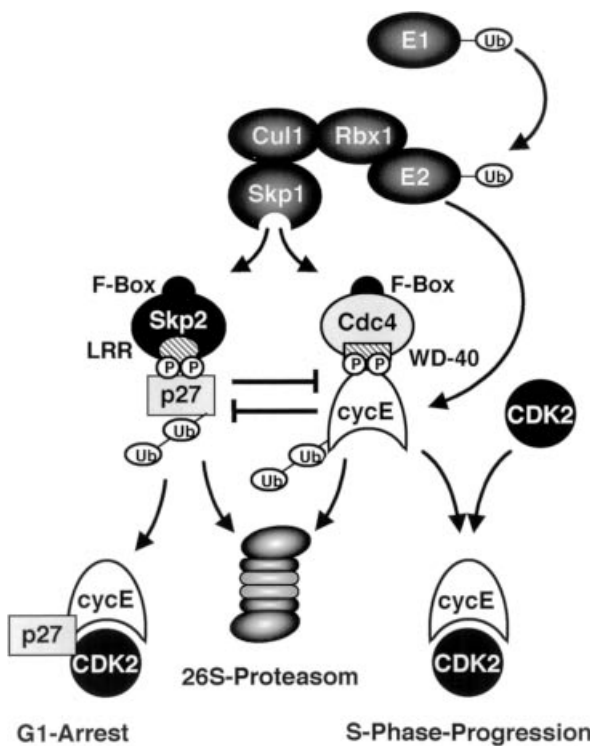


Abb. 2.2.5. Inaktivierung phasenspezifischer Zellzyklusregulatoren über das Ubiquitin-Proteasom-System. Die cyclinabhängige Kinase CDK2 wird in der späten G₁-Phase durch den Kofaktor Cyclin E aktiviert. Der Cyclin-E-CDK2-Komplex wird durch den Kinaseinhibitor p27^{Kip2} gehemmt. Neben der transkriptionellen Aktivierung werden die Expressionsspiegel von Cyclin E und p27^{Kip2} über Ubiquitinylierung und Abbau über das Proteasom kontrolliert. Der Abbau erfolgt über Ubiquitinligasen (E1, E2, E3), die sich sequenziell aktivieren, Substratproteine mit Ubiquitin konjugieren und diese hierdurch für den Abbau über das 26S-Proteasom markieren. Der entscheidende Schritt ist die Bindung des Substratproteins an F-Box-Adapterproteine. Über die F-Box bindet das F-Box-Protein Skp2 phosphoryliertes p27 an den E3-Ligase-Komplex, der aus den Untereinheiten Skp1, Rbx1, Cul1 und der E2-Ligase besteht und auch als SCF bezeichnet wird. Phosphoryliertes Cyclin E hingegen wird durch das F-Box-Protein CDC4 (Archipelago) erkannt. Wachstumsfaktoren stimulieren die Expression von Skp2 und Cyclin E und ermöglichen hierdurch Abbau von p27, die Aktivierung von Cyclin E/CDK2 und Eintritt in die S-Phase. Über CDC4 wird nach Eintritt in die S-Phase bzw. in ruhenden Zellen Cyclin E abgebaut. WD40 und LRR sind Proteindomänen, die Substratproteine binden. Vergleichbare Mechanismen wurden auch für andere Cycline und deren Inhibitoren beschrieben

enthalten eine C-terminale Domäne, die das Substratprotein bindet (WD40-Domäne in CDC4 und LRR-Domäne in Skp2), sowie ein F-Box-Motiv, über das die Interaktion mit Skp1 vermittelt wird. Skp1 wiederum fungiert als Adapterprotein zum E3-Ligase-Komplex (SCF), der aus den Proteinen Cul1/CDC53, Rbx (Hrt1/Roc1) sowie der E2-Ubi-

quitin-Ligase CDC34 besteht (Winston et al. 1999). In Folge des proteasomalen Abbaus wird der entsprechende Zellzyklusregulator, z.B. Cyclin E, eliminiert, und die Zelle kann regelrecht im Zyklus fortschreiten. Durch phasengerechte Synthese und koordinierten Abbau über die jeweiligen F-Box-Proteine, Ubiquitinligasen und das Proteasom oszilliert die Proteinmenge phasenspezifischer Regulatoren wie der Cycline während des Zellzyklus.

Zellzyklus-G₁-S-Transition und S-Phase-Progression durch E2F und *c-myc*-Transkriptionsfaktoren

Die E2F-Familie von Transkriptionsfaktoren besteht aus 6 Mitgliedern (E2F-1–E2F-6) (Cartwright et al. 1998; Johnson u. Schneider-Broussard 1998). Zur Bildung des aktiven Transkriptionsfaktors wird jedoch, wie auch bei anderen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. *c-Myc*, *c-Fos/c-Jun* oder NFκB, ein Dimerisierungspartner benötigt: die Dp1-Proteine (Abb. 2.2.6) (Yamasaki 1999). Die Rb-Familienmitglieder assoziieren in unterschiedlicher Affinität mit diesen E2F-Faktoren (Kasten u. Giordano 1998; Kaelin 1999). PRb bindet hauptsächlich E2F-1–E2F-4, wohingegen p130 und p107 bevorzugt an E2F-4 und -5 binden. Hypophosphorylierung von Rb führt zur Freisetzung und Aktivierung der E2F-Faktoren. Transkriptionelle Zielgene von E2F sind weitere Zellzyklus regulierende Gene (Cyclin E, Cyclin A, *cdc2*, der CDKI *p21*, das Protoonkogen *c-myc*) und Faktoren, die im DNA-Metabolismus eine Rolle spielen (Dihydrofolatreduktase, Thymidinkinase, Thymidylatsynthase, usw.) (Muller et al. 2001). Hierdurch wird die G₁-S-Progression ausgelöst, also der Übergang aus der späten G₁- in die S-Phase. Die Akkumulation von D-Cyclinen während der G₁-Phase sequestriert zudem CDK2-Inhibitoren der CIP/KIP-Genfamilie, wodurch die Wirkung von E2F-abhängigen Regulationsschritten, z.B. vermittelt durch Cyclin E/CDK2, verstärkt und die G₁-S-Transition erleichtert wird.

Myc-Proteine sind Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität durch Dimerisierung mit gewebespezifischen Kofaktoren vermittelt wird (Eisenman 2001). Für die Regulation hämatopoetischer Zellen und deren maligne Transformation ist v.a. das *c-myc*-Gen entscheidend (Nesbit et al. 1999). Über ein Leucinzippermotiv dimerisiert *c-Myc* mit dem im Überschuss vorliegenden Max-Protein und bildet hierdurch das DNA bindende Myc-Max-Heterodimer, das die Transkription S-Phase-spezifischer Gene induziert (Coller et al. 2000), hierdurch die S-Phase unterhält und weiter vorantreibt (Amati et al. 1993). Wie auch im Fall von E2F wird

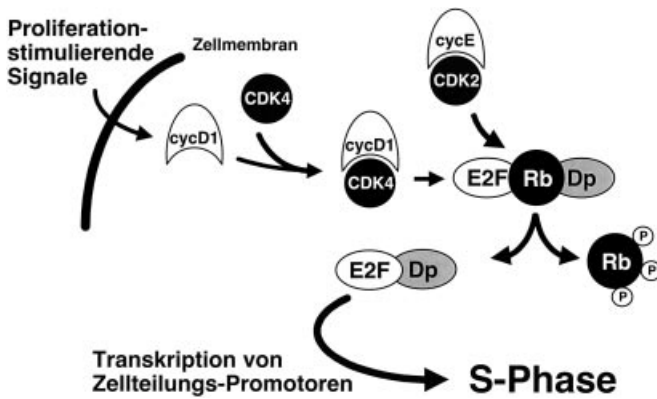


Abb. 2.2.6. Regulation der S-Phase Progression durch E2F. Nach mitogener Stimulation werden Rb-Proteine in 2 Schritten phosphoryliert. Der erste Phosphorylierungsschritt wird durch D-Cycline und CDK4 und CDK6 vermittelt. Der 2. Phosphorylierungsschritt erfolgt durch den Cyclin-E-CDK2-Komplex. Das nun mehrfach phosphorylierte Rb kann Transkriptionsfaktoren wie E2F nicht mehr inhibieren und die nun freien E2F-Dp-Heterodimere können Promotoraktivierung vermitteln und Gene aktivieren, die S-Phase-Progression auslösen (S-Phase-Promotoren)

die Aktivierung von *c-myc* durch Bindung an unphosphoryliertes Rb gehemmt (Grana et al. 1998; Kaelin 1999). *c-myc*-Expression wird u.a. von E2F-Transkriptionsfaktoren induziert und amplifiziert die G₁-S-Phasen-Transition durch transkriptionelle Aktivierung von S-Phase-Genen, verstärkt aber auch die Cyclin-E-Expression im Sinn einer positiven Rückkopplung (Johnson u. Schneider-Broussard 1998; Muller u. Helin 2000).

Die Expression von *c-myc* ist bei einer Vielzahl maligner Tumoren dereguliert (Nesbit et al. 1999). Dies kann durch Genamplifikation oder, wie im Fall der hochmalignen Burkitt-Lymphome, bevorzugt in Folge einer t(8;14)-Translokation erfolgen, die das *c-myc*-Gen unter die Kontrolle des Immunoglobulinschwerkettenenhancers bringt und zu deregulierter Expression führt (Nesbit et al. 1999). Eine weitere Ursache für erhöhte *c-myc*-Aktivität sind Punktmutationen, die die Bindung des p107-Rb-Proteins inaktivieren. Ähnlich wie bei E2F genügt die Überexpression von *c-myc* allein, um Zellen in die S-Phase zu treiben.

Liegen keine adäquaten Aktivierungsbedingungen vor, lösen E2F und *c-myc* allerdings nicht die G₁-S-Phasen-Transition, sondern Apoptose aus (Evan et al. 1992; Muller et al. 2001). Ein Fortschreiten im Zellzyklus erfordert daher, dass gleichzeitig Zelltod hemmende Signale aktiviert werden, z.B. durch Hemmung des mitochondrialen Apoptosesignalwegs. Dieses Prinzip der Aktivierung von Zelltodsignalwegen schützt vor ungehemmter Zellproliferation, und zwar v.a. dann, wenn neben dem mitogenen, Zellzyklus aktivierenden Signal, entsprechende Zelltod hemmende Signale fehlen. Wie im Fall von E2F kann die deregulierte Aktivierung von *c-myc* also Apoptose auslösen, wenn nicht gleichzeitig die Apoptosesignalkaskade gehemmt wird, z.B. durch hohe Expression des Apoptose hemmenden Bcl-2 oder Bcl-

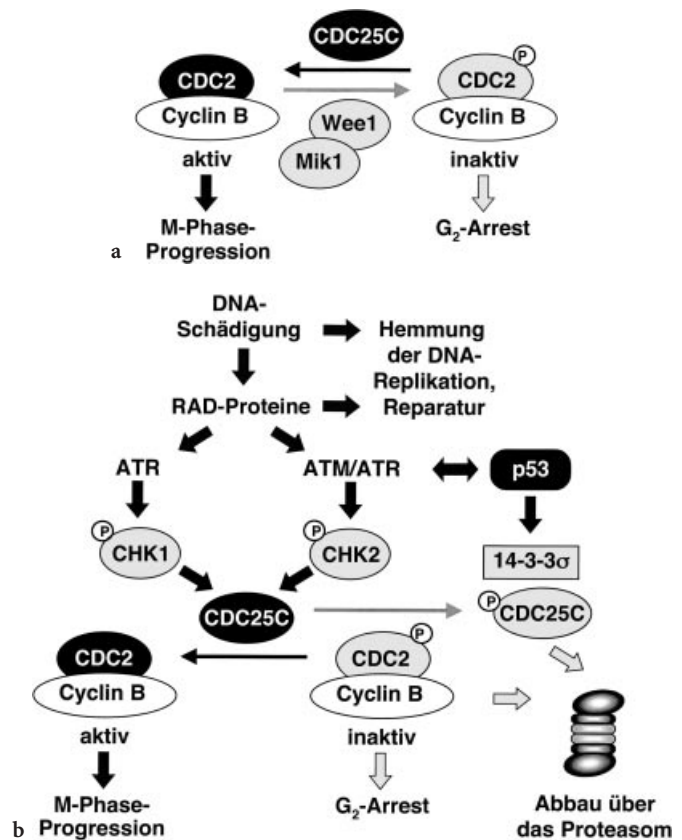
xL oder Inaktivierung des p53-Signalwegs, z.B. durch p53-Mutation, p14^{ARF}-Verlust oder *mdm2*-Überexpression (Sherr u. Weber 2000). Auch die Deregulation des *ras*-Signalwegs (s. unten) (Adjei 2001) kann solche antiapoptotischen Kosignale vermitteln. Eine Reihe von Untersuchungen zeigte, dass die durch E2F bzw. *c-myc* induzierte Apoptose über einen p14^{ARF}- und p53-abhängigen Mechanismus vermittelt wird (s. unten) (Weber et al. 2000; Lin u. Lowe 2001).

2.2.2.2 S-Phase und G₂-Checkpunkt

Während der S-Phase findet die Replikation der DNA statt, die durch Checkpunkte in der S-Phase und nach Abschluss der S-Phase in der G₂-Phase überwacht wird (Nigg 2001). Der korrekte Ablauf der S-Phase ist für das Überleben der Zelle essenziell, was sich auch in der hohen Empfindlichkeit von S-Phase-Zellen gegenüber DNA-Schädigung und Zelltodaktivatoren widerspiegelt. Störungen der DNA-Replikation durch ionisierende Bestrahlung, DNA-Schädigung und Hemmer der DNA-Replikation, wie z.B. Hydroxyharnstoff (Hydroxyurea, HU), einem Hemmer der Ribonukleotidreduktase und der DNA-Replikationsgabel, aktivieren den S-Phase-Checkpunkt. Hierdurch wird die weitere DNA-Replikation gehemmt, Reparaturmechanismen werden aktiviert und hierdurch die Reparatur der geschädigten DNA ermöglicht (Rhind u. Russell 2000). Proliferierende Zellen mit defektem S-Phase-Checkpunkt sind überempfindlich gegenüber Störungen der DNA-Replikation und sterben rasch nach Behandlung mit HU oder ionisierender Strahlung (Lydall u. Weinert 1996).

Eine Schädigung der DNA und des Replikationsvorgangs aktiviert DNA-Reparaturmechanismen (s. dort), die wiederum in engem Zusammen-

Abb. 2.2.7 a, b. Regulation von M-Phase-Progression und G₂-Arrest. **a** Der Komplex aus der CDK CDC2 und Cyclin B vermittelt den Eintritt in die M-Phase des Zellzyklus. Um biologisch aktiv zu sein, muss CDC2 dephosphoryliert werden. Ist CDC2 phosphoryliert, wird der Cyclin-B-CDC2-Komplex über das Proteasom abgebaut. Die Kinasen der Wee-Familie, wie *Wee1* und *Mik1*, phosphorylieren CDC2 und bremsen hierdurch den Zellzyklus. Die Dephosphorylierung wird durch die CDC25C-Phosphatase vermittelt. **b** Genotoxische Schäden z.B. nach Bestrahlung oder chemischer DNA-Schädigung und Hemmung der DNA-Replikation aktivieren über RAD-Proteine wie z.B. RAD51 und RAD9, die *ATM*- und *ATR*-Kinasen, die dann die *CHK1*- und *CHK2*-Kinasen phosphorylieren und hierdurch aktivieren. *CHK1* aktiviert die Wee-Kinasen und hemmt hierdurch die M-Phase-Progression (nicht in der Abbildung hervorgehoben). *CHK1* und *CHK2* phosphorylieren CDC25C und hemmen hierdurch die Phosphatase, die im phosphorylierten Zustand an 14-3-3σ bindet und nach Ubiquitylierung über das Proteasom abgebaut wird. Hierdurch wird die Dephosphorylierung von CDC2 gehemmt und G₂-Arrest ausgelöst. *ATM* und *ATR* aktivieren zudem *p53* und vermitteln hierdurch einen Anstieg der 14-3-3σ-Expressionsspiegel, wodurch die CDC25C-Inaktivierung verstärkt wird. Auch *CHK1* kann *p53* phosphorylieren



hang mit Zellzykluscheckpunkten und Apoptose stehen (Rhind u. Russell 2000). Diese Checkpunkt-signalwege werden in Folge der DNA-Schädigung aktiviert, arretieren die Zelle jedoch zumeist nicht in der S-Phase, sondern erst in der G₂-Phase, um aus dieser Phase heraus und vor Beginn der Mitose die Reparatur des genotoxischen Schadens zu erlauben. Der S-Phase-Checkpunkt und die regulierenden Faktoren stehen daher in engem funktionellem Zusammenhang mit dem G₂-Checkpunkt. Für beide Checkpunkte wird häufig synonym der Begriff DNA-Schädigungscheckpunkt verwendet. Hierbei handelt es sich aber um einen funktionell definierten Begriff, der nicht völlig kongruent mit den individuellen Zellzykluscheckpunkten ist, da DNA-Schädigung Checkpunkte in allen Zellzyklusphasen aktivieren kann.

Der G₂-Checkpunkt kontrolliert den Eintritt der Zelle in die Mitose nach Abschluss der DNA-Replikation (Abb. 2.2.7) (Russell 1998). Die Expression von Cyclin B und die Aktivität der CDK CDC2 sind kritische Ereignisse für den Eintritt der Zelle in die M-Phase (Smits u. Medema 2001). Die CDC2-CDK reguliert die G₂-M-Transition: In ihrer aktiven Form ist sie dephosphoryliert (Boddy et al. 1998). Die

CDC25C-Phosphatase reguliert diesen Checkpunkt, indem sie die CDC2-CDK dephosphoryliert. Hierdurch wird die CDC2-CDK aktiv und kann die G₂-M-Progression initiieren. Verbleibt CDC2 hingegen in der phosphorylierten Form, kann die Zelle diesen Checkpunkt nicht überwinden, es kommt zum Zellzyklusarrest in der G₂-Phase.

CDC2 wird durch die Kinasen Wee1 und Mik1 durch Phosphorylierung am Threonin 14 (T14) und Tyrosin 15 (Y15) inaktiviert (Rhind u. Russell 2001). Während Wee1 nukleär lokalisiert ist, wirkt Mik1 zytoplasmatisch. Diese Kinasen sorgen dafür, dass CDC2 phosphoryliert und inaktiviert wird, und wirken hierdurch proliferationshemmend (Abb. 2.2.7a). Die nukleär lokalisierte Kinase Wee1 phosphoryliert CDC2 an Y15. Die zytoplasmatische Kinase Myt1 hingegen phosphoryliert CDC2 sowohl an T14 als auch an Y15. Der CDC2-Cyclin-B-Komplex wird kontinuierlich vom Kern in das Zytoplasma und zurück transportiert (Takizawa u. Morgan 2000). Dies erklärt, warum sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Kinasen CDC2 inaktivieren können. Eine nukleäre Exportsequenz (NES) verhindert hierbei die Akkumulation des Cyclin-B-CDC2-Komplexes im Zellkern. Phospho-

rylierung von CDC2 durch Wee/Myt-Kinasen bzw. durch CHK-Kinasen (s. unten) führt zum Ausschluss des Cyclin-B-CDC2-Komplexes aus dem Kern und Sequestrierung im Zytoplasma (Rhind u. Russell 2001). Die CDC25C-Phosphatase wandert ebenfalls zwischen Kern und Zytoplasma hin und her. Der Transport von CDC25C aus dem Kern wird dabei durch 14-3-3-Proteine (allerdings nicht 14-3-3 σ) erleichtert (Tzivion u. Avruch 2001). Die CDC25C-Phosphatase überwindet diesen Zellzykluscheckpunkt, indem sie CDC2 dephosphoryliert und den Cyclin-B-CDC2-Komplex aktiviert (Nilsson u. Hoffmann 2000).

Dieser Checkpunkt wird nach DNA-Schädigung durch die Kinasen ATM, ATR (Abraham 2001) und die CHK1- und die CHK2-Kinase (Boddy et al. 1998) aktiviert und reguliert. DNA-Schädigung aktiviert über RAD-Proteine die ATM-Kinase (ATM steht für Ataxia teleangiectatica mutated) bzw. die verwandte ATR-Kinase (ATM/RAD3 related). ATM und ATR (und auch RAD3) sind Serin-Threonin-Kinasen, die Homologie zur Ser-Thr-Kinase PI3-Kinase aufweisen.

ATM und ATR aktivieren durch Phosphorylierung die Checkpunktkinase CHK2 (CDS1) (Matsuoka et al. 2000), wohingegen ATR die CHK1-Kinase reguliert (Liu et al. 2000). Hierdurch wird CHK2 aktiviert, die CDC25C phosphoryliert und der CDC25C-Abbau über Bindung an das 14-3-3 σ -Protein und das Proteasom ausgelöst (Sanchez et al. 1997). CHK1 kann ebenso CDC25C phosphorylieren, wird aber ATM-unabhängig aktiviert. Dieser Mechanismus wird, z.B. nach DNA-Schädigung, alternativ auch über p53 reguliert. P53 kann neben der Wirkung am G₁-Restriktionspunkt auch G₂-Arrest auslösen (Taylor u. Stark 2001). Dies erfolgt über transkriptionelle Aktivierung des 14-3-3 σ -Proteins, das CDC25C sequestriert, Export aus dem Zellkern in das Zytoplasma aktiviert und CDC25C der Ubiquitinylierung und dem Abbau über das Proteasom zuführt (Fu et al. 2000). Weiterhin kann p53 CDC2 und Cyclin B1 transkriptionell reprimieren (Taylor u. Stark 2001). Diese nach DNA-Schädigung aktivierten Mechanismen führen somit zur Hemmung der CDC2-CDK (Abb. 2.2.7b) und tragen zum Ausschluss des Cyclin-B-CDC2-Komplexes aus dem Kern, Sequestrierung im Zytoplasma und Abbau über das Proteasom bei (Peters 1999). Wird CDC2 hingegen adäquat durch die CDC25C-Phosphatase dephosphoryliert, ist diese B-Cyclin-abhängige Kinase enzymatisch aktiv, wird nicht im Zytoplasma sequestriert und kann Progression in die M-Phase, die Mitose, vermitteln.

2.2.2.3 Kontrolle des Mitoseendes durch den Mad-Signalweg

Der Mitosesignalweg kontrolliert die Segregation der Schwesterchromatiden, Aufteilung in die Tochterzellen, Lage und Wanderung der Chromosomen, Integrität der mitotischen Spindel und reguliert das Ende der Mitose (Russell 1998; Smits u. Medema 2001). Da diese Regulationsmechanismen evolutionär hochgradig konserviert sind, konnten in der Spaltheife *S. pombe* gewonnene Erkenntnisse nahezu unverändert auf die humane Zellteilungsregulation übertragen werden (Abb. 2.2.8).

Der Abbau Zellzyklus regulierender Proteine über das Ubiquitin-Proteasom-System ist die Basis für das koordinierte Ablaufen und Aufeinanderfolgen der Phasen des Zellzyklus. Nach Ausbildung der mitotischen Spindel am Ende der G₂-Phase des Zellzyklus und Übergang in die M-Phase wird der Eintritt der Zelle in die Anaphase durch die APC/C (Anaphase promovierender Komplex/Cyclosom)-E3-Ubiquitin-Ligase kontrolliert (Peters 1999). Die Regulation dieses Signalwegs wurde im Hefesystem detailliert analysiert: APC/C leitet die Anaphase durch Degradierung der Anaphaseinhibitoren Pds1 und Cut2 ein. So setzt die Proteolyse von Pds1 über das Proteasom den Faktor Esp1 frei (Rhind u. Russell 1998; Russell 1998). Hierdurch wird die Proteolyse von Cohesinen vermittelt, also von den Proteinkomplexen, welche die Schwesterchromatiden zusammenhalten (Peters 1999; Hirano 2000). Ist durch den proteolytischen Abbau der Cohesine diese Bindung der Chromatiden aneinander aufgehoben, beginnt die Anaphase, die letztlich zur Aufteilung der duplizierten Chromosomen in die beiden Tochterzellen führt. Interessant ist auch, dass G₂- und M-Phase-Restriktionspunkt funktionell miteinander verknüpft sind, da die CHK1-Kinase Pds-1 phosphoryliert, hierdurch stabilisiert und vor dem Abbau durch APC/C und CDC20 schützt. Somit vermag CHK1 neben dem G₂-Arrest auch M-Phase-Arrest zu vermitteln (Wang et al. 2001).

Ist die Trennung der beiden Kernanteile beendet, werden mitosespezifische Kinasen aktiviert, die den Abschluss der Mitose und Zytokinese der Tochterzellen einleiten (Cerutti u. Simanis 2000; Hirano 2000). Hierbei spielt die Aktivierung von Phosphatasen (z.B. CDC14 in der Hefe) eine wesentliche Rolle, da hierdurch die Anaphase und das Ende der Mitose eingeleitet werden. Der Anaphasecheckpunkt bestimmt, dass der Zellzyklus in der M-Phase arretiert wird, falls Chromosomen falsch ausgerichtet sind und ihre Zentromere nicht

Yuan 1998) Apoptose auslöst. Werden hingegen gleichzeitig Überlebenssignale wie z.B. durch Bcl-2 oder Bcl-xL oder andere Apoptosehemmer vermittelt, überlebt die Zelle das Proliferationssignal, geht nicht in die Apoptose und schreitet im Zellzyklus fort (Cory et al. 1999). Möglicherweise soll durch die gleichzeitige Aktivierung von Proliferations- und Zelltodsignalen die akzidentelle Aktivierung der Zellproliferation vermieden werden. Solche fehlerhaft proliferierenden Zellen würden dann über Apoptose absterben. Dies erklärt z.T., warum Tumoren häufig Inaktivierungen von Zelltodsignalwegen aufweisen.

Ebenso kann die Aktivierung von Zelltodsignalen im Zellzyklus gehemmt werden, indem die Zelle in der jeweiligen Zellzyklusphase zum adäquaten Zeitpunkt arretiert wird. Zellzyklusinhibitoren wie die CDK, v.a. $p21^{Cip/Waf}$, können daher antiapoptotische Wirkung zeigen (Waldman et al. 1996). Allerdings kann auch die kontinuierliche Arretierung von Zellen im Zellzyklus in Phasen außerhalb der G_0 - G_1 -Phase Zelltodsignalwege aktivieren. Hierdurch wird garantiert, dass nur solche Zellen überleben, die den Zellzyklus korrekt durchlaufen haben. Dies erklärt, warum lang anhaltender Zellzyklusarrest an verschiedenen Checkpunkten Apoptoseprogramme aktiviert. Dies gilt insbesondere für Zellen in denen gleichzeitig proliferationsaktivierende und den Zellzyklus arretierende Signale aktiv sind, also divergierende, konkurrierende Signalwege aktiviert wurden. Dies könnte erklären, warum für alle CDKI [v.a. $p16$ (Sandig et al. 1997), $p21$ (Kadowaki et al. 1999) und $p27$ (Katayose et al. 1997)] nach adenoviralem Gentransfer (der gleichzeitig auch die DNA-Replikationsmaschinerie der S-Phase aktiviert) eine Zelltod fördernde Wirkung gezeigt werden konnte.

Die Aktivierung dieser zellzyklusassoziierten Zelltodsignale wird über phasenspezifische Regulatoren vermittelt. Der gegenwärtige Stand der Erkenntnis ist allerdings noch sehr fragmentarisch.

Durch diese strenge Kontrolle von Zellzyklusarrest sowie von Apoptose oder Zellüberleben wird in normalen Zellen dereguliertes Wachstum verhindert. Die Koordination einer Vielzahl komplexer, nachgeschalteter Regulationswege war somit aus evolutionsgeschichtlicher Sicht die Basis für die Entwicklung komplexer vielzelliger Organismen.

$p14^{ARF}$ -Signalweg

Besonders gut untersucht ist die Regulation des G_1 -Restriktionspunkts. Eine Deregulation des G_1 -Restriktionspunkts führt über *ras*, *c-myc* und

E2F vermittelte Signale neben der Transkription von S-Phase-Genen auch zur Induktion des $p14^{ARF/INK4a}$ -Proteins (Sherr u. Weber 2000). In der Maus wird das entsprechende Homolog als $p19^{ARF}$ bezeichnet (Serrano 2000). ARF steht hierbei für „alternatives Leseraster (reading frame)“. $P14^{ARF}$ ist, neben dem CDKI $p16^{INK4a}$, das 2. Genprodukt des *ink4a*-Genlocus und wird durch Verwendung eines eigenen Promotors und eines alternativen Exons 1 (Exon 1 β) in mRNA translatiert und gespleißt. Dieses alternative Spleißen resultiert bei der Proteintranslation in einem anderen, verschobenen Leseraster des Exons 2 (Abb. 2.2.9). Durch dieses alternative Leseraster entsteht ein Protein mit völlig anderer Aminosäuresequenz und Funktion als $p16^{INK4a}$ (Serrano 2000; Sherr u. Weber 2000). Während $p16^{INK4a}$ vorwiegend Zellzyklusarrest vermittelt, induziert $p14^{ARF}$ bevorzugt Apoptose (Abb. 2.2.10).

$p14^{ARF}$ bindet an das MDM2-Protein (mdm steht für *murine double minute*, da das Gen initial in der Maus entdeckt wurde; das humane *mdm2* wird daher auch als *hdm2* bezeichnet). Unter normalen Bedingungen bewirkt MDM2 durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus, dass die Proteinspiegel von p53 sehr niedrig sind: p53 ist ein transkriptioneller Aktivator des *mdm2*-Gens. Das MDM2-Protein wiederum bindet an p53, bewirkt die Ubiquitinylierung und den Abbau von p53 über das Proteasom (Hay u. Meek 2000). Die p53-Protein-Expression und -Aktivität wird somit über diesen Regulationsmechanismus vorwiegend posttranslational reguliert.

Die Bindung von $p14^{ARF}$ an MDM2 destabilisiert jedoch MDM2, indem es die Ubiquitinylierung und den Abbau von MDM2 über das Proteasom vermittelt (s. unten) (Honda u. Yasuda 1999;

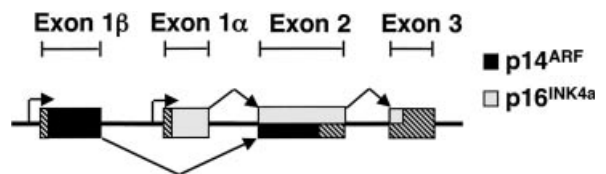


Abb. 2.2.9. Intron-Exon-Struktur des *ink4a*-Gen-Locus. Alternatives Spleißen und Verwendung von Exons resultiert in der Expression zweier verschiedener Gene vom selben Genlocus. Beide Gene werden hierbei von unabhängigen Promotoren kontrolliert, die in Tumorzellen unterschiedlich inaktiviert sein können. Der CDK-Inhibitor $p16^{INK4a}$ wird vom Exon 1 α , Exon 2 und Exon 3 gebildet. Im Gegensatz hierzu wird das auf Aminosäureebene komplett nichthomologe $p14^{ARF}$ von Exon 1 β und einem Teil von Exon 2 kodiert. Exon 2 wird aufgrund des alternativen Spleißens in einem verschobenen Leseraster translatiert

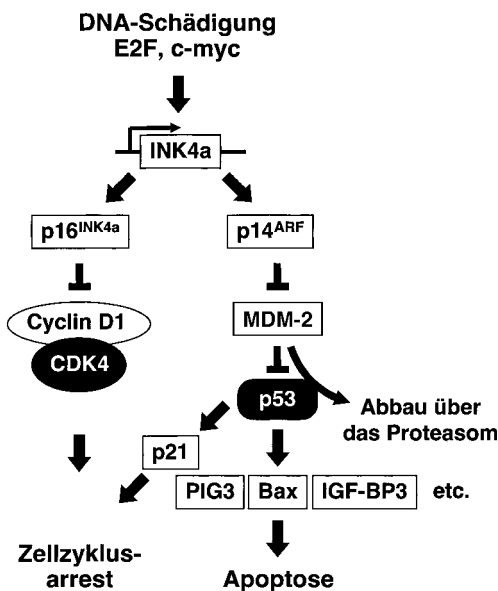


Abb. 2.2.10. $p14^{ARF}/p53$ -Signalweg. DNA-Schädigung oder die deregulierte Aktivierung den Zellzyklus fördernder Gene führen zur Aktivierung der Expression von $p16^{INK4a}$ und von $p14^{ARF}$. $p16$ vermittelt Zellzyklusarrest in der G_1 -Phase durch Hemmung von D-Typ-Cyclin-CDK4/6-Komplexen. $p14^{ARF}$ hingegen destabilisiert $MDM2$ und fördert dessen Abbau über das Proteasom. $MDM2$ ist ein Inhibitor von $p53$ und löst dessen Abbau über das Proteasom aus. Da $p14^{ARF}$ $MDM2$ inaktiviert, wird wiederum $p53$ stabilisiert, das nun nicht mehr über $MDM2$ dem Abbau über das Proteasom zugeführt wird. $p53$ kann nun seine Wirkung als transkriptioneller Aktivator von Zellzyklus hemmenden Genen (z. B. $p21^{Cip/WAF-1}$, $14-3-3\sigma$) und Apoptose fördernden Genen [z. B. Bax, APAF-1, PUMA, Noxa, $PIG3$ ($p53$ -induziertes Gen 3), $p53AIP1$ ($p53$ -apoptoseinduzierendes Protein-1), $IGF-BP3$, DR5, CD95/Fas] und transkriptioneller Repressor von Überlebensgenen (z. B. $bcl-2$) entfalten

Sherr u. Weber 2000). Durch die Verminderung der $MDM2$ -Protein-Menge wird der negative Rückkopplungssignalweg für $p53$ gehemmt: $p53$ wird hierdurch stabilisiert und die $p53$ -Protein-Expression erhöht (Abb. 2.2.11).

C-myc und E2F vermitteln folglich über einen $p14^{ARF}/MDM2/p53$ -abhängigen Signalweg Zelltod. Allerdings wurden mittlerweile auch $p53$ - (Weber et al. 2000) und $p21/p27$ -unabhängige Signalwege (Groth et al. 2000) von $p14^{ARF}$ zur Aktivierung von Zellzyklusarrest beschrieben, sodass wahrscheinlich an der $p14^{ARF}$ -vermittelten Apoptose noch weitere, $p53$ -unabhängige Signalwege beteiligt sind. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass $p14^{ARF}$ auch unabhängig von $p53$ und Bax den mitochondrialen Apoptosesignalweg aktivieren kann (Hemmati et al. 2002).

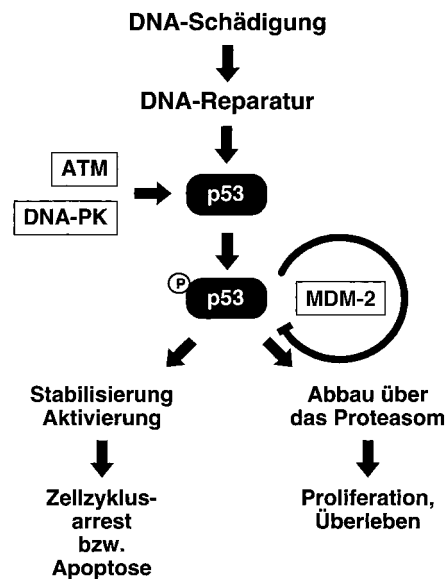


Abb. 2.2.11. Posttranslationale Regulation von $p53$. Protein-spiegel von $p53$ werden vorwiegend posttranslational reguliert. Unter normalen Bedingungen sequestriert $MDM2$ das $p53$ -Protein über Ubiquitynylierung und Abbau über das Proteasom. $p53$ übt hierbei einen negativen Rückkopplungsmechanismus aus, da es ein transkriptioneller Aktivator des $mdm2$ -Gens ist. Wird $MDM2$ gehemmt, wird die $p53$ -Proteinexpression durch Verlängerung der $p53$ -Halbwertszeit erhöht. Um biologisch aktiv zu sein und um als Tetramer an DNA binden zu können, muss $p53$ zudem durch Phosphorylierung aktiviert werden. Die $p53$ -Phosphorylierung kann durch eine Reihe von Kinasen wie ATM , ATR , $CHK1$, $CHK2$ und $DNA-PK$ erfolgen

Weitere Regulatoren

Ein weiterer Mechanismus der zellzyklusspezifischen Regulation von Apoptose wird durch das antiapoptotisch wirksame Survivin vermittelt. Survivin ist ein Mitglied der IAP-Familie (inhibitor of apoptosis protein) und ist in der Lage, Caspasen als Effektoren der Apoptose zu hemmen. Neben Survivin (Altieri et al. 1999) zählen cIAP2 (IAP1), cIAP1 (IAP2), XIAP (Deveraux u. Reed 1999), ILP-2 (Richter et al. 2001), Livin (Kasof u. Gomes 2001) und NAIP sowie die kürzlich identifizierten IAP-Proteine MLIAP und Apollon zu dieser Proteinfamilie, die im Gegensatz zu Survivin allerdings nicht zellzyklusspezifisch zu wirken scheinen. Das Expressionsniveau des Survivinproteins oszilliert während des Zellzyklus vergleichbar den Cyclinen. Unklar ist jedoch noch, ob es sich hierbei wirklich um einen zellzyklusspezifischen Apoptoseschutz handelt oder ob Survivin noch andere Funktionen im Zellzyklus erfüllt. Beschrieben wurde die Assoziation mit Cyclin B1 und dem zentromerbindenden CEN/P-Protein, sodass eine Zell-

zyklus regulierende Funktion von Survivin mittlerweile als gesichert gilt. Der Abbau der IAP-Proteine erfolgt, wie im Fall der Cycline, über das Proteasom.

Auch Apoptose fördernde Proteine wirken möglicherweise zellzyklusabhängig. Dies wurde kürzlich für das Apoptose fördernde Bcl-2-Homolog Bim gezeigt (O'Connor et al. 1998). Bim ist ein BH3-only-Protein (s. unten), das sehr wahrscheinlich als Apoptosesensor des Motordyneinkomplexes fungiert (Puthalakath et al. 1999). Bim bindet an diesen Motorkomplex. Wird es freigesetzt, bindet es an den Apoptoseeffektor Bax, aktiviert diesen und vermittelt hierdurch die Aktivierung der mitochondrialen Apoptoseantwort (s. unten) (Harris u. Johnson 2001). Bim könnte also z.B. den Zelltod nach Störung des tubulären Gerüsts durch Taxane oder Vincaalkaloide in der Mitose vermitteln.

Kontrolle von Zellzyklus und Apoptose durch p53

Das p53-Gen zählt zu den am häufigsten inaktivierten Genen in malignen Tumoren. Eine Reihe von Arbeiten zeigte, dass eine solche p53-Inaktivierung mit einer schlechteren Prognose der zugrunde liegenden Tumorerkrankung einhergehen kann (Lowe 1995). P53 wird nicht nur transkriptionell, sondern vorwiegend posttranslational reguliert (Taylor u. Stark 2001). Die basale Proteinexpression ist gering, wird jedoch durch genotoxische Schäden (Bestrahlung, Chemotherapie) oder andere zelluläre Stressfaktoren wie Hypoxie, virale Infektion oder Onkogenaktivierung (z.B. *e2f* und *c-myc*) erhöht, da diese Vorgänge, z.B. über p14^{ARF}, das p53-Protein stabilisieren, indem sie seinen Abbau über das Proteasom hemmen und seine Halbwertszeit verlängern (Abb. 2.2.11). P53 kann sowohl als Transkriptionsfaktor für Gene wie *apaf-1*, p21^{Cip/WAF}, Bax, PUMA, NOXA, p53-AIP1, 14-3-3, Gadd45, IGF-BP3, PIG usw. (Oda et al.

2000; Kannan et al. 2001a,b; Nakano u. Wousden 2001) dienen als auch als transkriptioneller Repressor die Expression anderer Gene direkt oder indirekt reprimieren (z.B. *bcl-2*, *cdc2* und Cyclin B) (Taylor u. Stark 2001). Bezüglich der p53-vermittelten Effektormechanismen wie Zellzyklusarrest oder Aktivierung von Apoptosesignalwegen existieren deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen, wodurch ein Teil der diversen Daten in der Literatur erklärt werden kann. Die Inaktivierung von p53-Homologen, wie p63 und p73, ist weniger gut untersucht. Mittlerweile liegen jedoch eine Reihe von Daten vor, die zeigen, dass diese Homologen über dieselben Effektormechanismen wirken wie p53 und, ebenso wie p53, durch Deletion der entsprechenden Genregion in malignen Tumoren inaktiviert werden können (Jost et al. 1997; Kaghad et al. 1997; Osada et al. 1998). Mutationen der p53-homologen Gene scheinen jedoch selten zu sein. Kürzlich wurden allerdings neben der Mutation von p53 auch Mutationen im p53-Homolog p63 (Yamaguchi et al. 2001) in der Blastenkrise der chronischen myeloischen Leukämie (CML) beschrieben. Das Homolog p73 dagegen ist in Tumoren extrem selten mutiert, wird aber in der Blastenphase der CML in aberranten Spleißvarianten exprimiert (Tschan et al. 2000). Solche N-terminal trunkeerten p73 Spleißvarianten können dominant-negative Wirkung entfalten und die Funktion von p53 und p73 hemmen.

Der p53-vermittelte Zellzyklusarrest und die Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen nach Bestrahlung oder chemischer Mutagenese ermöglicht es der Zelle, sich von der genotoxischen Schädigung zu erholen und zu überleben (Funk 1999; Zhou u. Elledge 2000). Versagen die Reparaturmechanismen, überwiegen die ebenfalls von p53 aktivierten Zelltodsignale, und die Zelle stirbt (Abb. 2.2.12). Experimentelle Daten hierzu

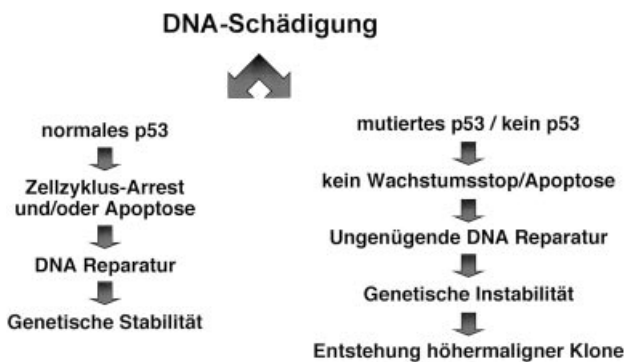


Abb. 2.2.12. Konsequenzen der Inaktivierung von p53 für die genetische Stabilität von Zellen. Schematische Darstellung, wie genetische Instabilität und höhere Malignität in Tumoren mit Inaktivierung von Apoptosegenen entstehen kann. Dies ist am Beispiel von des p53-Tumorsuppressorgens erläutert, gilt jedoch auch für eine Vielzahl anderer Gene, die Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur und Apoptose regulieren

kamen erstmals von der Gruppe von Vogelstein, die zeigten, dass der Knockout von p21^{Cip/Waf} (oder auch von p53, eines der transkriptionellen Aktivatoren von p21) die Fähigkeit von Tumorzellen inaktiviert, nach DNA-Schädigung im Zellzyklus bei G₁- und G₂-M-Restriktionspunkten zu arretieren (Waldman et al. 1996). Tumorzellen, die durch gezielten Gen-Knockout von p53 (Bunz et al. 1998) bzw. p21 (Waldman et al. 1996) oder 14-3-3 σ (Chan et al. 1999) einen G₂-Checkpointdefekt aufwiesen, wurden nach DNA-Schädigung durch Chemotherapie polyploid und starben daraufhin über Apoptose. P53 kann daher in einer solchen Situation also auch als den Zelltod hemmendes Gen wirken, indem es über seine zellzyklusarretierende Wirkung Apoptosemechanismen hemmt und Reparatur ermöglicht.

Dennoch haben p53-mutierte Tumorzellen aufgrund ihres Apoptosedefekts einen Selektionsvorteil. Ein Teil der malignen Zellen überlebt aufgrund des Apoptosedefekts die zytotoxische Behandlung und wird durch die Therapie selektiert (Griffiths et al. 1997). Klinisch resultiert dies in einem therapieunempfindlicheren Rezidivtumor. Prinzipiell gilt ein solcher Selektionsvorteil auch für Tumorzellen, die andere Defekte in Zelltodsignalwegen erworben haben, z.B. Inaktivierung von p14^{ARF} (Schmitt et al. 1999) oder auch Bax (Sturm et al. 1999; Sturm et al. 2001) und Rb (Almasan et al. 1995) usw.

Neben dem p53-vermittelten G₁- und dem G₂-Block im Zellzyklus wurde für p53 auch noch ein postmitotischer Zellzyklusblock beschrieben. Hierbei handelt es sich am ehesten um denselben Restriktionspunkt, den p53 auch in der G₁-Phase aktiviert. Der einzige Unterschied ist, dass die Zellen vor der Aktivierung des Blocks noch die S-, G₂- und M-Phase durchlaufen haben.

Zelltodsensoren in anderen Zellzyklusphasen

Neben den oben genannten Genen, die v.a. die Kontrolle des G₁-Restriktionspunkts und Zelltod vermitteln, existieren Apoptose kontrollierende Checkpunkte auch in anderen Phasen des Zellzyklus. Für die S-Phase ist bekannt, dass Zellen in dieser Phase am empfindlichsten für DNA-Schädigung sind (Loeb u. Kunkel 1982). Allerdings gibt es bisher kaum gesicherte Daten dafür, dass Zellen direkt aus dieser Phase heraus in die Apoptose gehen. Vielmehr führt die Mehrzahl der genotoxischen Noxen zur Aktivierung von Checkpunkten in der G₂- und der M-Phase, die häufig als G₂-M-Restriktionspunkt zusammengefasst werden (Ohi u. Gould 1999; Molinari 2000). Neuere Daten,

erneut aus dem experimentellen System in der HeFe, haben einzelne Signalkomponenten identifiziert und einen raschen Wissensfortschritt in den letzten Jahren ermöglicht.

Die ATM-, ATR- (Abraham 2001) und DNA-PK-Proteinkinasen (Kim et al. 1999), die bei DNA-Schädigung im Rahmen der DNA-Reparaturmechanismen aktiviert werden, können über eine Phosphorylierung von CHK2 und die G₂-Restriktionspunktkontrolle Zellzyklusarrest und, über einen p53-abhängigen Signalweg, Zelltod auslösen (Taylor u. Stark 2001). Die CHK1- und CHK2-Kinase und ihre Substratproteine wurden ebenfalls in *S. pombe* identifiziert und funktionell charakterisiert.

Der CDKI p21 wiederum kann den Zellzyklus in der G₁-, S- und G₂-Phase arretieren (Johnson u. Walker 1999; Taylor u. Stark 2001) und hierdurch die Progression geschädigter Zellen im Zellzyklus verhindern (Waldman et al. 1996). Hierdurch ermöglicht p21 die Reparatur ansonsten fataler Schäden. Wird p21 inaktiviert, z.B. durch Verlust von p53 oder durch genspezifischen Knockout in experimentellen Systemen, kommt es nach DNA-Schädigung zur Entkopplung von S-Phase (also DNA-Synthese) und Mitose. Ohne sich zu teilen, akkumulieren solche Zellen DNA und werden polyploid. Dies wird als Entkopplung von S-Phase und Mitose bezeichnet. Manche Autoren sprechen in diesem Zusammenhang auch, nicht ganz korrekt, von einer mitotischen Katastrophe, die letztlich zur Apoptose der betroffenen Zelle führt.

Nach Abschluss der G₂-Phase beginnt die Mitose charakterisiert durch Trennung der Schwesterchromatiden und Entstehung der beiden Tochterzellen (Russell 1998; Hirano 2000). In dieser Phase erfolgt die Anaphasecheckpunktkontrolle. Die Chromatiden werden über die Kinetochoren an die mitotische Spindel gekoppelt, die aktiv die Segregation der verdoppelten Chromatiden vermittelt (Russell 1998; Hirano 2000). Sind Kinetochore unbesetzt, wird der Mad-Signalweg aktiviert (vgl. Abb. 2.2.8) (Elledge 1998). Freie Kinetochore rekrutieren Bub-Kinasen, die die Aktivierung des APC/C-Komplexes verhindern. Die permanente Blockade dieser Signalmechanismen und permanenter Arrest der Zelle im Anaphasecheckpunkt, z.B. durch dominant-negative Mutanten von Signalproteinen wie der Bub1-Kinase, aktiviert die Apoptosesignalkaskade, und die Zelle stirbt über Apoptose.

2.2.2.5 DNA-Reparatursignalwege, genetische und chromosomale Stabilität

„Spontane“ Schäden des Genoms sind relativ häufig. So beläuft sich die Menge allein an DNA-Ab-schnitten mit Basenverlust, die ohne äußere Einwirkung durch Strahlung oder Chemikalien entstehen, auf etwa 10 000 pro Zelle und Tag. Hinzukommt eine Vielzahl induzierter DNA-Schäden, die z.B. durch UV-Exposition (in der Natur oder im Solarium), durch Aufnahme von Mutagenen in Nahrungs- und Genussmitteln (z.B. Nitrosamine, Benzoapyrene) oder bei einer Tumorbehandlung mit DNA-reaktiven Substanzen gebildet werden. DNA-Schädigung kann aber auch durch physiologische Vorgänge entstehen: Lese- und Schreibfehler bei der DNA-Replikation, Angriff der DNA durch Nebenprodukte oxidativer Stoffwechselvorgänge oder Fehler im Rahmen der V(D)J-Rekombination bei der T- und B-Zell-Rezeptor-Reifung in T- und B-Lymphozyten.

Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen, dass die Reparatur von DNA-Schäden nicht nur die Faktoren benötigt, die direkt an der Reparatur der geschädigten DNA beteiligt sind. Vielmehr ist für den korrekten Ablauf dieser Vorgänge die koordinierte Regulation von DNA-Replikation, Zellzyklusprogression und auch Zelltod notwendig. Die Exaktheit der Informationsübertragung während der Zellteilung wird nicht nur von der exakten Replikation der DNA-Stränge bestimmt, sondern auch von der Fähigkeit, spontane und induzierte DNA-Schädigung zu überleben und hierbei

die Übertragung von Mutationen auf die nachfolgenden (Zell-)Generationen zu minimieren. Um dies zu gewährleisten, haben Zellen Überwachungsmechanismen entwickelt, die die Struktur des Chromatins und die DNA-Reparatur kontrollieren (Hirano 2000). Hierbei handelt es sich z.T. um die gleichen Checkpunkte, die auch die Zellzyklusprogression kontrollieren (s. oben) (Russell 1998; Skibbens u. Hieter 1998; Rhind u. Russell 2001).

Unter Reparatur im engeren Sinn ist die unmittelbare enzymatische Entfernung von DNA-Schäden zu verstehen. Im weiteren Sinn umfasst DNA-Reparatur jedoch den gesamten Vorgang der Erkennung und des „Prozessierens“ von Schäden, der beispielsweise auch die zelluläre Toleranz gegenüber persistierenden DNA-Läsionen mit einschließt. DNA-Schädigung und DNA-Reparatur sind eng mit dem Mechanismus der Entstehung von Mutationen verbunden, und diese sind wiederum der Ausgangspunkt von somatischen Erkrankungen, insbesondere von Tumoren.

DNA-Schädigungssignalwege bestehen somit aus Sensoren, Signaltransduktoren und -effektoren (Abb. 2.2.13). Hierbei handelt es sich um ein eng miteinander verzahntes Regelwerk einer Vielzahl von Faktoren, die gemeinsam die Antwort auf die DNA-Schädigung vermitteln. Direkt oder indirekt an der Strangreparatur beteiligte Gene wie RAD-Proteine des 9-1-1-Komplexes (Caspari u. Carr 1999), Mismatch-Reparaturgene wie *mlh1*, *msh2* (Kolodner u. Marsischky 1999), sowie an der Doppelstrangbruchreparatur beteiligte Gene wie *brca1* usw. wirken hierbei als Sensoren, die wiederum Transduktoren wie ATM, ATR, NBS1 (Morgan u. Kastan 1997; Lim et al. 2000; Petrini 2000) rekrutieren, um Zielproteine wie RAD51, CHK2 und p53 zu modifizieren, wodurch dann Zellzyklusarrest ausgelöst wird.

Zelluläre metabolische Vorgänge wie DNA-Replikation und -Transkription können somit ohne Berücksichtigung von DNA-Reparaturvorgängen nicht ausreichend verstanden werden. So kann replikative nukleäre DNA-Synthese nur fehlerfrei ablaufen, wenn die DNA keine Strukturveränderungen enthält, die die Replikation blockieren, wie z.B. nach Bildung von DNA-Addukten durch Zytostatika. Die Verbindung von DNA-Reparatur zur Transkription wird auch dadurch ersichtlich, dass die DNA-Reparatur transkriptionsgekoppelt erfolgt: in transkriptionsaktiven Genen und dort im transkribierten DNA-Strang erfolgt die Reparatur von replikationsblockierenden DNA-Schäden bevorzugt. Umgekehrt wird immer mehr regulato-

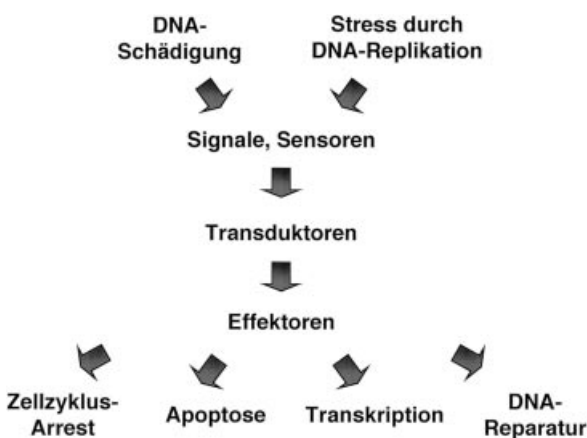


Abb. 2.2.13. Zelluläre Antwort auf genotoxische Schäden. Schematische Darstellung der Signaltransduktionsebenen, die zelluläre Antwort auf Schädigung der DNA und der DNA-Replikation vermitteln, z.B. nach Replikationsfehlern, Bestrahlung oder chemischer Schädigung

risch wirksamen Proteinen eine zusätzliche Funktion in der DNA-Reparatur zugeschrieben (z.B. p53, BRCA1 und BRCA2, ATM, NBS1). Ein gutes Beispiel hierfür ist p53 (Kastan et al. 1991), welches neben seiner Funktion als Transkriptionsaktivator eine Funktion bei der globalen Nukleotidexzisionsreparatur ausübt. Die „Brustkrebsgene“ *brca1* und *brca2* (Venkitaraman 2001) sind sehr wahrscheinlich an der Regulation der DNA-Reparatur und Zytostatikaresistenz auch von Lymphomen und Leukämien beteiligt. Dies zeigt, dass DNA-Reparatur im Zentrum einer Vielzahl von basalen zellulären Prozessen mit Auswirkungen auf eine Reihe sehr relevanter biologischer Endpunkte steht.

Demzufolge war es nicht überraschend, dass DNA-Reparatur und Aktivierung von Zelltodsignalwegen ebenfalls eng miteinander verknüpft sind. Besonders gut wurde dies mittlerweile für das DNA-Mismatch-Reparaturprotein MSH2 gezeigt. Überexpression von *msh2* und von *mlh1* induziert Zelltod (Zhang et al. 1999), und die Inaktivierung von *msh2* führt nicht nur zu genetischer Instabilität durch Inaktivierung des Mismatch-DNA-Reparatursystems, sondern auch zu erhöhter Apoptoseresistenz nach DNA-Schädigung (Wu et al. 1999). Weiterhin zeigen Mismatch-Reparaturdefiziente Zellen einen verkürzten G₂-Arrest nach DNA-Schädigung.

DNA-Reparatur und Tumorentstehung

Das Überleben komplexer Organismen hängt von der akkuraten Übertragung der genetischen Information auf die Tochterzellen ab. DNA-Reparaturgene sind für die Erhaltung der Integrität und Stabilität des Genoms verantwortlich. Sie minimieren Replikationsfehler und komplexe DNA-Rearrangements infolge aberranter Rekombinationen und entfernen geschädigte DNA-Abschnitte. Mechanismen der DNA-Schädigung und DNA-Reparatur haben eine herausragende Bedeutung für die Zyto- und Genotoxizität, Strahlen- und Zytostatikaresistenz, für erbliche Stoffwechselstörungen, für Entzündungsprozesse, für das Altern und für genetische Stabilität.

Defekte in DNA-Reparatursignalwegen und in den durch DNA-Schädigung aktivierten Restriktionspunkten des Zellzyklus sind entscheidend an der Entstehung maligner Tumoren beteiligt. Dies konnte mittlerweile für eine ganze Reihe verschiedener DNA-Reparatursignale gezeigt werden. Die Beteiligung nicht oder fehlerhaft reparierter DNA-Schäden in der Kanzerogenese und bei somatischen zellulären Funktionsstörungen wird eindringlich durch Reparaturdefektsyndrome belegt.

So werden zunehmend Tumorentitäten mit Veränderungen im zellulären DNA-Reparatursystem gefunden, die, wie beispielsweise durch Störung des Mismatch-Reparatursystems beim erblichen, nicht polypösen Kolonkarzinom (hereditary non-polyposis colon cancer, HNPCC), mit hoher Frequenz zur Tumorbildung führen (Peltomäki 2001) bzw. zusätzlich mit vorzeitigem Altern (Dyer u. Sinclair 1998) der betroffenen Personen einhergehen [z.B. Bloom-Werner-Syndrom (Epstein u. Motulsky 1996; Frei u. Gasser 2000; Hickson et al. 2001)].

Weitere Beispiele sind die Gene der Xerodermapigmentosa-Gruppe (XP-Gruppe-Gene), die für die Nukleotidexzisionsreparatur wichtig sind und mit einem 1000fach erhöhten Risiko von Hauttumoren verbunden sind. Ebenso können Störungen des Mismatch-Reparatursystems, der Basenexzisionsreparatur und weiterer Gene der Nukleotidexzisionsreparatur zu genetischer Instabilität führen, deren genaue Bedeutung für die Tumorgenese noch nicht hinreichend geklärt ist. Wesentlich besser untersucht sind die Bedeutung dieser Störungen in Zelllinienmodellen und die Bedeutung für die Entstehung von Therapieresistenz und die Selektion höher maligner Tumorzellklone.

In Knockout-Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von Mismatch-Reparaturgenen wie *msh2* und *msh6* die Entstehung von T-Zell-Lymphomen fördert (de Wind et al. 1999; Colussi et al. 2001). Hingegen sind solche Defekte des Mismatch-Reparatursystems in sporadischen, nicht familiären hämatologischen Tumoren selten (außer dem Burkitt-Lymphom), werden aber in einem hohen Prozentsatz der gastrointestinalen Tumoren beobachtet (Peltomäki 2001). Die Inaktivierung dieses Reparatursystems verhindert die Korrektur von Lesefehlern des DNA-Polymerasekomplexes, und zwar v.a. in Bereichen mit repetitiven Sequenzen, wie z.B. im Gen des TGF- β -Rezeptors II, dem Bax-, Caspase-5-, *bcl-10*- und *apaf-1*- und auch dem *msh2*-Gen (s. unten). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Individuen mit Keimbahnmutationen des *msh2*-Gens und hieraus resultierender Mismatch-Reparaturdefizienz im frühen Lebensalter Typ-1-Neurofibromatose und Lymphome entwickeln (Whiteside et al. 2002).

Ebenso sind Störungen in der Doppelstrangbruchreparatur (s. unten) und den nachgeschalteten Signaltransduktionswegen wie dem ATM-Signalweg (s. unten) mit erhöhter Tumorneigung bzw., falls es sich um Keimbahnmutationen handelt, mit schweren, sich bereits im frühen Kindesalter manifestierenden Syndromen, wie z.B. der Ataxia teleangiectasia usw., assoziiert.

S-Phase-Checkpunktkontrolle und DNA-Schädigungscheckpunkt

Die Signalwege, die den DNA-Schädigungscheckpunkt des Zellzyklus regulieren, sind hochgradig konserviert zwischen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Drosophila melanogaster*, *Cenorhabditis elegans* und Säugern. In *S. pombe* spielen die 6 *rad*-Gene *rad1*, *rad3*, *rad9*, *rad17*, *rad26* und *hus1* eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Veränderungen der DNA-Struktur (Caspari u. Carr 1999). Alle dieser 6 *rad*-Gene werden für die Aktivierung der DNA-Reparaturcheckpunkte benötigt (Ivanov u. Haber 1997). Genetische Untersuchungen in Defektmutanten in Hefen und Komplementierungsexperimente in solchen Defektmutanten haben gezeigt, dass alle 6 Gene im gleichen Signalweg agieren, und DNA-Integrität und die korrekte Funktion der DNA-Replikationsgabel kontrollieren (Brondello et al. 1999).

Zellen mit Mutation eines dieser Gene zeigen eine drastisch erhöhte Empfindlichkeit sowohl gegenüber Hemmern der DNA-Replikation, wie z.B. Hydroxyharnstoff, als auch DNA-Schädigung, z.B. in Folge ionisierender Strahlung, und zwar in allen Phasen des Zellzyklus, besonders aber in der S-Phase (Larner et al. 1997). Dies deutet darauf hin, dass diese Gene nicht ausschließlich in der S-Phase-Checkpunkt-Kontrolle wirken, sondern auch in anderen Zellzyklusphasen.

RAD1 ist eine potenzielle Exonuklease, die mit RAD9 und HUS1 einen stabilen Komplex bildet, der auch als 9-1-1-Komplex bezeichnet wird (911 ist die Notruftelefonnummer in den USA) (Burtelow et al. 2001). RAD17 zeigt hingegen nur eine schwache, transiente Wechselwirkung mit diesem Komplex. RAD3 und RAD26 bilden ebenfalls einen stabilen Komplex und RAD3 (jedoch nicht die anderen RAD-Proteine) vermittelt RAD26-Phosphorylierung nach DNA-Schädigung. Dies hat zur Hypothese geführt, dass der RAD3-RAD26-Komplex der initiale Sensor der DNA-Schädigung ist und die im Signalweg nachgeschalteten RAD-Proteine sowie Checkpunkt- und Zellzyklusarrest- bzw. Zelltodsinalwege kontrolliert.

Alle dieser 6 RAD-Proteine werden benötigt, um nach DNA-Schädigung die Checkpunktkinasen CHK1 und CHK2 (CDS1) zu phosphorylieren und hierdurch zu aktivieren (vgl. Abb. 2.2.7) (Brondello et al. 1999). Diese Studien in der Hefe haben die Grundlage zum Verständnis der Zellzykluscheckpunkt kontrollierenden Signalwege geliefert (Russell 1998; Caspari u. Carr 1999).

Mittlerweile wurden in Säugern, bis auf RAD26, Homologe für alle der genannten *rad*-Gene gefun-

den (Brondello et al. 1999). Das humane RAD9 (hRAD9), RAD1 (hRAD1) und RAD17 (hRAD17) können die DNA-Checkpunktkontrolle in Hefedefektmutanten teilweise komplementieren. Dies zeigt eindrucksvoll, wie hochgradig konserviert dieses archaische Regelwerk ist. Demzufolge bilden auch hRAD9, hRAD1 und hHUS1 einen stabilen 9-1-1-Komplex und auch hRAD1 und hRAD9 besitzen Exonukleaseaktivität. Weiterhin wurde gezeigt, dass der humane 9-1-1-Komplex nach DNA-Schädigung an das Chromatin bindet, möglicherweise über Bindung an hRAD17 (Rauen et al. 2000). Mäuse mit einem Defekt in *hus1* und *Cenorhabditis elegans*-Mutanten mit defektem *rad1* (*mrt-2*) zeigen genetische Instabilität und erhöhte Empfindlichkeit gegenüber DNA-Schädigung. Bezüglich der Kinase RAD3 in *S. pombe* konnten bisher 2 verwandte humane Kinasen identifiziert werden, ATM und ATR (Jeggo et al. 1998). Zellen mit defektem ATM sind überempfindlich gegen ionisierende Bestrahlung, aber nicht gegen UV-Licht und HU. ATM- bzw. ATR-defiziente Zellen zeigen multiple Defekte der G₁-, S- und G₂-M-Checkpunktkontrolle (s. unten) (Abraham 2001).

ATM-Signalweg und G₂-Restriktionspunkt

Eines der ersten Beispiele für die biologische Relevanz der Zellzyklus- und DNA-Reparaturcheckpunkte beim Menschen war das *atm* (Ataxia telangiectasia mutated)-Gen (vgl. Abb. 2.2.7, 2.2.11 und 2.2.14). Individuen mit einer biallelischen Inaktivierung des *atm*-Gens zeigen Schädigungen der Purkinje-Zellen des Kleinhirns, Immundefekte des T- und B-Zell-Systems und entwickeln in einem extrem hohen Prozentsatz maligne Tumoren. Ebenso wurden somatische Mutationen des *atm*-Gens mittlerweile bei Malignomen wie z.B. der B-PLL (Prolymphozytenleukämie) beschrieben. Zellen mit gestörtem *atm*-Gen zeigen Störungen der Doppelstrangreparatur (Jeggo et al. 1998), was wahrscheinlich auch die gestörte V(D)J-Rekombination bei der Bildung der antigenspezifischen B- und T-Zell-Rezeptoren verursacht und für die Immundefizienz verantwortlich ist. Langlebige Zellen wie die Purkinje-Zellen wiederum werden in Folge der gestörten Reparatur von DNA-Strangbrüchen, z.B. nach oxidativem Stress, geschädigt. ATM-Zellen zeigen einen gestörten G₁- und G₂-Arrest nach DNA-Schädigung (Kastan u. Lim 2000). Experimentelle Daten zeigten, dass die Inaktivierung von ATM- und der verwandten ATR-Kinase (ATR: AT and RAD3 related) mit einer gestörten Aktivierung des CHK1- und CHK2-Signalwegs am G₂-Restriktionspunkt einhergeht (Matsuoka et al.

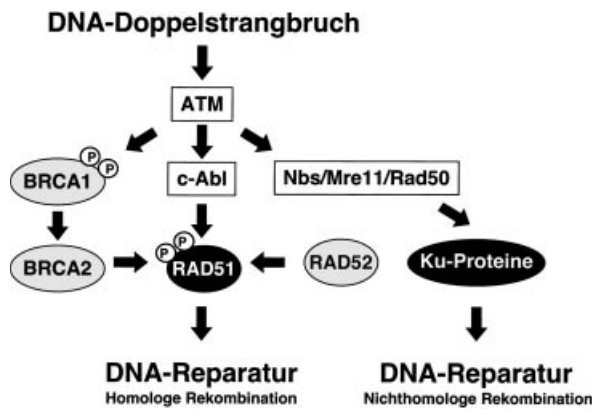


Abb. 2.2.14. DNA-Reparatur von Doppelstrangbrüchen. DNA-Doppelstrangbrüche können über homologe Rekombination bzw. nichthomologe Reparaturmechanismen (Endjoining) vermittelt werden. Homologe Reparatur erfolgt über RAD51-abhängige Mechanismen, wohingegen nichthomologe Reparatur über Ku-Proteine vermittelt wird.

1998; 2000). ATM und CHK2 vermögen, p53 zu phosphorylieren und hierdurch zu stabilisieren (Abb. 2.2.7 und 2.2.11) (Morgan u. Kastan 1997). Zellen mit defekter CHK2-Kinase zeigen konsequenterweise, wie ATM-defekte Zellen, einen Defekt in der G₂-Restriktionskontrolle nach Bestrahlung. Der G₂-Arrest nach Bestrahlung wird hierbei durch anhaltende Inaktivierung der CDC25C-Phosphatase vermittelt. Hierdurch wird die Aktivierung des Cyclin-B-CDC2-Komplexes gestört, der Cyclin-B-CDC2-Komplex aus dem Zellkern sequestriert, über das Proteasom abgebaut und die Zelle in G₂ arretiert.

VDJ-Rekombination, Doppelstrangbruchreparatur und chromosomale Translokationen

RAD51 wird im Rahmen der Doppelstrangreparatur durch die c-Abl-Kinase aktiviert, die wiederum durch die ATM-Kinase reguliert wird (Abb. 2.2.15) (Shaul 2000; Wang 2000). Weiterhin reguliert c-Abl auch die Aktivität von p53 und v.a. auch des p53-Homologs p73, worüber die c-Abl-Kinase Apoptose und Zellzyklusarrest induzieren kann (Shaul 2000). Neben RAD51 spielt ATM (s. oben) eine wesentliche Rolle im Rahmen der Signaltransduktion und Vermittlung der zellulären Antwort in Folge von DNA-Doppelstrangbrüchen.

Beim Nijmegen-breakage-Syndrom (NBS), das klinisch dem Ataxia-teleangiectasia-Syndrom ähnelt, ist hingegen das *nbs1*-Gen gestört. Das NBS1-Protein bildet einen Komplex mit hMRE11 und hRAD50 und vermittelt nichthomologes Endjoining und homologe Rekombination von Doppelstrangbrüchen bei der DNA-Reparatur. Die enzy-

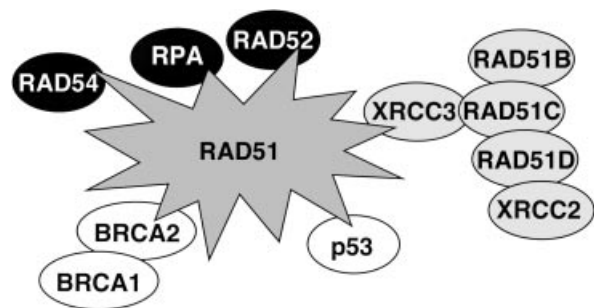


Abb. 2.2.15. Zentrale Rolle von RAD51. RAD51 interagiert physikalisch mit einer Vielzahl von DNA-Proteinen, wie den BRCA-Proteinen, Proteinen der Xeroderma-pigmentosa-Gruppe, v.a. XRCC3, das weitere Faktoren in den Reparaturkomplex binden kann. Auch p53, RPA, RAD52 und RAD54 interagieren mit diesem zentralen DNA-Reparaturfaktor.

matischen Funktionen der Einzelkomponenten des Proteinkomplexes sind jedoch nur unzureichend bekannt, jedoch weiß man, dass MRE11 sowie vermutlich auch RAD50 Exonukleasen sind. Wie Zellen mit inaktiviertem ATM oder MRE11, zeigen NBS1-defekte Zellen eine gestörte Doppelstrangbruchreparatur. Der Befund, dass ATM NBS1 phosphorylieren und hierdurch zu aktivieren vermag (Lim et al. 2000), unterstützt die Vermutung, dass beide Gene im selben Signalweg zusammenarbeiten. Im gleichen Komplex, d.h. zwischen NBS1, MRE11 und RAD50, konnte auch das brustkrebsassoziierte BRCA1 nachgewiesen werden, das ebenfalls durch ATM oder ATR phosphoryliert wird (Abb. 2.2.14) (Tibbetts et al. 2000).

Der oben erwähnte RAD50-MRE11-NBS1-Proteinkomplex übt ebenfalls eine (noch unverstandene) Funktion im Ku-vermittelten nichthomologen Endjoiningmechanismus aus (Chen et al. 2001). Hierfür spricht einerseits die kürzlich gefundene Interaktion des MRE11-Proteins mit Ku70 in Säugerzellen und andererseits die Tatsache, dass Mutationen in den entsprechenden 3 Genen in der Hefe zu einer ausgeprägten Abnahme der Ku-vermittelten Doppelstrangbruchreparatur führen können. Weiterhin spielen diese 3 Genprodukte (im Gegensatz zum Ku-Heterodimer) eine essenzielle Rolle in der meiotischen Rekombination (Goeddecke et al. 1999).

Die Untersuchung von Individuen mit Defekten in der Doppelstrangbruchreparatur führte zur Identifizierung verschiedener Gene, die bei der Doppelstrangbruchreparatur eine zentrale Rolle spielen und von denen *xrcc4-xrcc7* am besten charakterisiert sind. Die entsprechenden Genprodukte sind das XRCC4-Protein, das mit DNA-Ligase IV interagiert, und die 3 Komponenten der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) (Jeggo 1998).

Letztere bestehen aus der 86 kDa (XRCC5)- und 70 kDa (XRCC6)-Untereinheit des Ku-Heterodimers und der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase (DNA-PK_{CS}; XRCC7) (Smider u. Chu 1997). Diese 4 Faktoren sind Hauptbestandteile der auf nichthomologem Endjoining basierenden Doppelstrangbruchreparatur in Säugerzellen. Dabei könnte dem Ku70/86-Heterodimer aufgrund seiner Eigenschaft, sequenzunspezifisch an DNA-Enden zu binden, die Funktion eines Alignmentfaktors zukommen, der den Bruch zunächst erkennt, die DNA-Enden während der nachfolgenden enzymatischen Modifikationen zusammenhält und so den Reparaturkomplex auf der DNA stabilisiert. Ob sich die Funktion der DNA-PK_{CS} auf Signalprozesse (Zellzyklusarrest, Transkriptionsregulation, Rekrutierung weiterer Reparaturenzyme zum Bruch) beschränkt oder ob sie außerdem direkt am Reparaturprozess teilnimmt oder Apoptosesignalwege aktiviert, ist noch weitgehend ungeklärt. Weitere essenzielle Funktionen haben die *xrcc4-xrcc7*-Genprodukte bei der V(D)J-Rekombination und Erhaltung der Telomere (Lieber et al. 1997; Gellert et al. 1999).

Die Reparaturmechanismen der Doppelstrangbruchreparatur spielen auch in der Regulation der V(D)J-Rekombination des Antigenrezeptors von T- und B-Lymphozyten eine zentrale Rolle. Bei der V(D)J-Rekombination handelt es sich um ein sequenzspezifisches Genrearrangement, das zur Vielfalt des Antikörper- und T-Zell-Rezeptor-Reservoirs beiträgt. 2 lymphozytenspezifische Proteine, RAG1 und RAG2, starten diesen Vorgang an Rekombinationssignalsequenzen. Der RAG1-RAG2-Komplex bindet an diese Signalsequenzen und führt nach Ausbildung einer Haarnadelstruktur zu einem Doppelstrangbruch an den Signalsequenzen. RAG1 trägt hierbei das aktive Zentrum für die V(D)J-Rekombination, während RAG2 essenziell für die Bindung an die Signalsequenz und die Spaltung der DNA ist. Nach Spaltung und Prozessierung der DNA werden die Doppelstrangbrüche durch den RAG-Komplex und DNA-Doppelstrangbruchreparaturproteine prozessiert und geschlossen. Die Variabilität im Zusammenfügen dieser Strangbrüche trägt zur Diversität des Antikörperrepertoires bei (Kim et al. 2000).

Defekte der Doppelstrangbruchreparatur, z. B. von Komponenten der DNA-PK (DNA-PK_{CS}, Ku70- und Ku86-Proteine, s. oben) (Jackson 1997), inaktivieren somit auch die V(D)J-Rekombination und resultieren in lymphozytären Reifungsstörungen (Smider u. Chu 1997), da heranreifende T- und B-Lymphozyten, denen es nicht gelingt, einen un-

reifen Surrogatrezeptor bzw. einen funktionellen reifen Antigenrezeptor zu bilden, über Apoptose eliminiert werden. Zum Beispiel tragen Mäuse mit schwerem kombiniertem Immundefekt (C.B17 scid/scid) einen Defekt der DNA-PK_{CS}, der katalytischen Untereinheit der DNA-PK (Jeggo et al. 1996) und zeigen neben erhöhter Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung einen Reifungsdefekt und fast vollständiges Fehlen sowohl reifer T- als auch B-Lymphozyten.

Störungen dieses Signalwegs scheinen auch für chromosomale Translokationen unter Beteiligung des T- und B-Zell-Rezeptors in Leukämien und Lymphomen von Bedeutung zu sein. Die meisten lymphatischen Neoplasien werden durch solche chromosomalen Translokationen zwischen Immunglobulin- bzw. T-Zell-Rezeptor-Gensegmenten und zellulären Protoonkogenen ausgelöst. Bei vielen dieser Ereignisse werden illegitime V(D)J-Rekombinationen als Ursache für die Translokation vermutet, was kürzlich für LMO₂, TAL2 und TAL1 bei der T-zellulären akuten lymphoblastischen Leukämie (T-ALL) gezeigt werden konnte. Im Gegensatz hierzu scheinen Translokationen unter Beteiligung des *bcl-1*- (Cyclin D1) und *bcl-2*-Gens durch einen Vorgang zu entstehen, bei dem nur der IgH (Immunglobulinschwerkettenenhancer)-Strangbruch durch V(D)J-Rekombination induziert wird.

2.2.2.6 Inaktivierung der Zellzyklusregulation in Tumoren

c-myc, Deregulation des G₁-Restriktionspunkts und S-Phase-Progression

Maligne Tumoren sind durch Deregulation der Zellproliferation gekennzeichnet. Es ist daher auch nicht überraschend, dass über verschiedenste Veränderungen, die in vielen Fällen noch völlig ungeklärt sind, den Zellzyklus aktivierende Gene dereguliert werden, die dann den Eintritt aus der G₁- in die S-Phase ermöglichen. Neben den Cyclinen D1, D2 und D3 sind dies v. a. E2F-Homologe und das *c-myc*-Gen.

c-myc nimmt hierbei eine besondere Stellung ein, da es bei hochmalignen B-Zell-Lymphomen durch Genamplifikation oder auch durch chromosomale Translokation dereguliert werden kann. So sind v. a. Burkitt-Lymphome durch die Deregulation des *myc*-Onkoproteins gekennzeichnet. In der Mehrzahl der Burkitt-Lymphome erfolgt dies durch t(8;14)-Translokation oder anderen Translokationen, die das *c-myc*-Gen unter die Kontrolle von Immunglobulinenhancersequenzen bringen,

die dann die konstitutive Expression des *c-myc*-Gens vermitteln. Beschrieben wurden auch Punktmutationen, die die Bindung und Inaktivierung durch pRb blockieren. Ein weiterer Mechanismus der *myc*-Deregulation ist die Genamplifikation, die bei etwa 10% der hochmalignen B-Zell-Lymphome nachgewiesen werden kann (Nesbit et al. 1999). Neben Burkitt-Lymphomen sind solche *c-myc*-Aktivierungen (und auch andere Burkitt-assoziierte genetische Veränderungen) bei Aids-assoziierten Burkitt-like-Lymphomen nachweisbar. In niedrigmalignen B-Zell-Lymphomen, akuten und chronischen Leukämien sind diese Veränderungen jedoch eher selten.

Inaktivierung von CDK-Inhibitoren

Störungen von hemmenden Zellzyklusregulatoren können in nahezu jedem Tumor nachgewiesen werden: Eine Vielzahl maligner Tumoren zeigt eine gestörte CDKI-Aktivität. Als mögliche Ursachen der Inaktivierung kommen in Frage:

1. verminderte Expression durch Promotormethylierung,
2. Deletion der entsprechenden Region,
3. Mutation des CDKI,
4. Mutation der entsprechenden CDK und
5. Störung eines Regulators der CDKI-Expression.

Die Bedeutung einer Deregulation der CDKI für die Tumorbilogie ist noch nicht vollständig geklärt. Sicher ist, dass ein Verlust dieser Zellzyklusinhibitoren die Deregulation des Zellzyklus ver-

stärkt. Unklar ist jedoch, ob es sich hierbei um ein primäres Ereignis handelt, das ursächlich an der Tumorentstehung beteiligt ist, oder ein sekundäres genetisches Ereignis im Rahmen der Tumorentstehung.

Der Verlust solcher CDKI ist häufig mit einer schlechten Prognose der Erkrankung verbunden. Besonders gut untersucht wurde dies im Fall von p16 (Siebert et al. 1996; Sturm et al. 2001). Im Gegensatz zu soliden Tumoren, die häufig eine *p16*-Überexpression zeigen, ist das Expressionsniveau von *p16* bei Leukämien und Lymphomen eher niedrig. Dennoch konnte für Mantelzonenlymphome gezeigt werden, dass ein Verlust der entsprechenden chromosomalen Region (9p) mit einem höheren Proliferationsindex, einer deutlich schlechteren Krankheitsprognose bzw. der Transformation zu hochmalignen Lymphomen assoziiert ist (Pinyol et al. 1998). Bei der chronischen lymphatischen Leukämie hingegen spielen *p21*- und *p16*-Expression anscheinend keine entscheidende Rolle. Allerdings konnte gezeigt werden, dass der Verlust der *p27*-Expression (und eine hohe Cyclin-E-Expression) mit einer schlechteren Krankheitsprognose einhergehen (Erlanson u. Landberg 2001). P27 kann auch durch hohe Cyclin-E-Spiegel überwunden werden (wie auch andere CDKI). Dies kann, neben gesteigerter transkriptioneller Aktivierung der Genexpression, auch durch Hemmung des Abbaus erfolgen. Mutationen des F-Box-Proteins CDC4 führen zu erhöhten Cyclin-E-Spiegeln, die Wildtyp-p27 überwinden können (vgl. Abschnitt 2.2.2.1 „Zellzyklusregulation“).

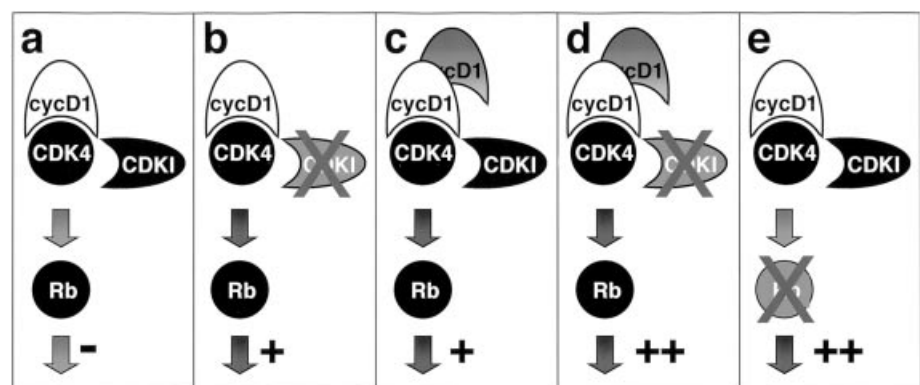


Abb. 2.2.16a–e. Störung des Rb-Signalwegs in Tumoren. Verschiedene Mechanismen können zur Inaktivierung der Zellzykluskontrolle durch Rb und Inaktivierung des G₁-Restriktionspunkts führen. **a** In nichtmalignen Zellen fördern CDK-Cyclin-D-Komplexe die Progression aus der G₁- in die S-Phase des Zellzyklus. Dieser Vorgang wird durch CDK-Inhibitoren, wie z.B. p16^{INK4a} und Proteine der Rb-Familie gehemmt. Die folgenden Ereignisse können die Kontrollfunk-

tion des G₁-Restriktionspunkts inaktivieren: **b** Verlust von p16^{INK4a} (oder anderer CDKI wie der CIP/KIP-Familienmitglieder p27 oder p21^{Cip/Waf-1}), **c** Überexpression von Cyclinen wie Cyclin D1 oder Cyclin E, **d** die kombinierte Deregulation mehrerer Gene wie Verlust von p16 und deregulierte Cyclinexpression (woraus ein noch aggressiveres Wachstum resultieren kann) und **e** Verlust von Rb

und der G₁-Restriktionspunkt“, Unterabschnitt „Zellzyklus-G₁-S-Transition und S-Phase-Progression durch E2F und *c-myc*-Transkriptionsfaktoren“ (Moberg et al. 2001). Ebenso spielen der Verlust von p16 (und auch p15, das in der Nähe des *p16^{INK4a}*-Gens lokalisiert ist) bei der akuten lymphoblastischen Leukämie des Kindesalters keine entscheidende Rolle.

Hieraus wird auch klar, dass in verschiedenen Tumoren unterschiedliche Ereignisse den G₁-Restriktionspunkt deregulieren können. Die Defekte können auf jeder Ebene des Signalwegs auftreten. Das Resultat ist das Gleiche: Deregulation von S-Phase-Progression. Häufig sind diese Defekte alternativ, d.h. es ist entweder p16 oder Cyclin D1 oder Rb betroffen (Abb. 2.2.16). Allerdings können Tumorzellen auch mehrere Defekte akkumulieren. Unklar ist jedoch noch, ob solche kombinierten Defekte nur redundant sind oder synergistisch wirken und mit einer höheren Malignität und noch rascherem Wachstum korrelieren.

2.2.3 Zelltodsignalwege

Programmierter Zelltod, Apoptose, wird durch distinkte Signale und Signalwege reguliert (Abb. 2.2.17). Ein diesen Signalwegen gemeinsames Prinzip ist die Ausbildung eines zytosolischen Signaltransduktionskomplexes (DISC; death-inducing signaling complex), an den sich die kaskadenartig verstärkende Aktivierung einander nachgeschalteter apoptosefördernder Faktoren anschließt, welche die Aktivierung exekutierender Enzyme, der Caspasen, vermitteln (Krammer 2000). Dies ist ein evolutionär konserviertes Prinzip, das zu solch archaischen Organismen wie dem Wurm *Cenorhabditis elegans* und wahrscheinlich noch älteren Organismen wie Schleimpilzen (*Dictyostelium*) und sogar Bakterien zurückverfolgt werden kann (Daniel 2000; Meier et al. 2000).

Die bisher am besten molekular definierten DISC-Signalwege werden durch Mitochondrien (Kroemer u. Reed 2000) und die Death-Rezeptoren der TNF-Rezeptorsuperfamilie vermittelt (Krammer 2000; Daniel et al. 2001). Seit kurzer Zeit gibt es Hinweise, dass auch andere Zellkompartimente wie das endoplasmatische Retikulum (ER) über die Aktivierung der Caspase-12 Apoptose induzieren können, z.B. bei Stressreaktionen des ER im Rahmen deregulierter Entleerung des Kalziumspeichers oder massiver Akkumulation pathologischer Proteine

(unfolded protein response, UPR) bei Virusinfektionen oder Amyloidprotein beim Morbus Alzheimer. Allerdings tragen die meisten Menschen (ausgenommen Schwarzafrikaner) eine die Expression der Caspase-12 verhindernde Keimbahnmutation. Neuere Ergebnisse zeigen aber, dass auch Caspase-2 und -8 als Initiatorcaspasen am ER wirken können und ER-Stress-induzierte Apoptose vermitteln.

Die Ausbildung und Aktivierung eines DISC resultiert in der raschen Rekrutierung von Inducercaspasen (wie der Caspase-2, -8, -9, -10 oder -12). Diese Inducercaspasen aktivieren in der Signalkaskade nachgeschaltete Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7), die dann die Apoptose exekutieren und hunderte von regulatorischen Proteinen degradieren sowie andere Proteasesysteme und Endonukleasen aktivieren (Nicholson 1999). Vergleichbar den Enzymkaskaden der Blutgerinnung oder des Komplementsystems wird durch die Aktivierung der Caspasesignalkaskade eine lawinenartige Verstärkung des initialen Signals erreicht. Hierdurch wird die irreversible Zerstörung der Zelle eingeleitet. Die Bildung eines DISC wurde erstmals für Death-Rezeptor-vermittelte Apoptose für den CD95/Fas-Rezeptor beschrieben (Kischkel et al. 1995). Durch Rezeptoroligomerisierung durch Bindung des Liganden oder durch agonistische Antikörper erfolgt die Bindung von FADD (Fas associated death domain)-Adapterproteinen, die wiederum über ihre DED (death effector domain) die Procaspasen-8 bzw. -10 rekrutieren können. SOD-Proteine (silencer of death domain) können die Rekrutierung von FADD hemmen (Jiang et al. 1999). Ebenso können FLIP-Proteine die Bindung (kurze und lange Spleißvariante, FLIP_S, FLIP_L) bzw. die Aktivierung der Procaspase-8 hemmen (FLIP_L) (Tschopp et al. 1999).

Ein vergleichbarer Komplex (nichthomologer) Signalproteine wurde dann für den mitochondrialen Apoptosesignalweg definiert. Hier wird der DISC von dem zytosolischen Adapterprotein APAF-1 gebildet, das mitochondriale Kofaktoren (Cytochrom c und ATP) bindet und hierdurch aktiviert wird (Li et al. 1997). Aktiviertes APAF-1 rekrutiert über die nun zugängliche CARD-Domäne die Procaspase-9, die sowohl im Zytosol lokalisiert ist als auch aus Mitochondrien freigesetzt wird. Dieser Proteinkomplex aus APAF-1, Cytochrom c und Procaspase-9 sowie ATP, stellt den mitochondrialen DISC dar, der auch als mitochondriales Apoptosom bezeichnet wird. Dieser Komplex kann auch noch weitere CARD-Proteine enthalten, die den Komplex möglicherweise stabilisieren (wie z.B. ARC: apoptosis repressor with a CARD; und CARD9, welches die

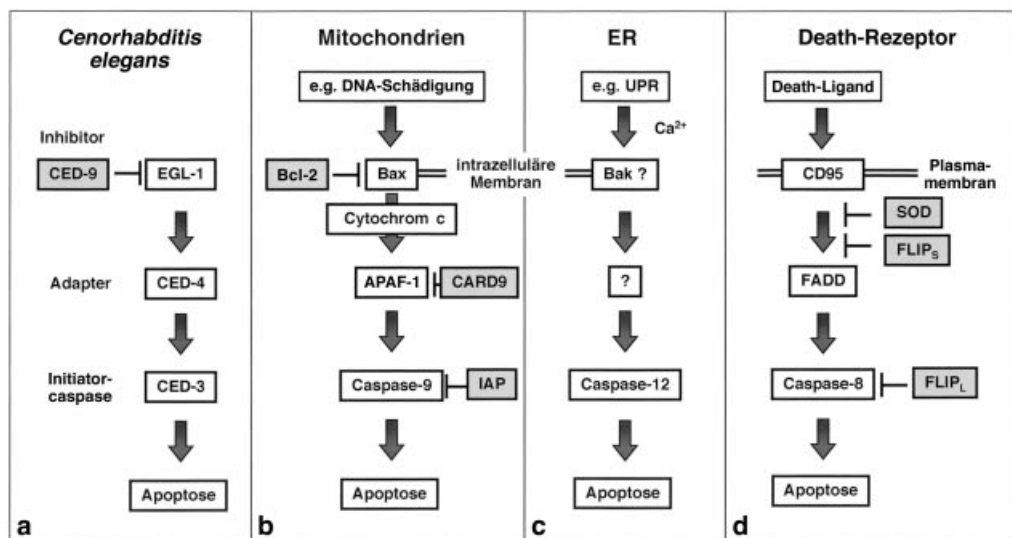


Abb. 2.2.17 a–d. Apoptosesignalwege. Das grundlegende Konzept der Aktivierung und Hemmung der Apoptosesignalkaskade kann evolutionsgeschichtlich bis zu archaischen Organismen wie dem Nematoden *Cenorhabditis elegans* (a) zurückverfolgt werden. **b** Der humane Apoptosehemmer *Bcl-2* ist ein Homolog des *Cenorhabditis elegans-ced-9*-Gens (*Cell-death-Gen-9*), das Apoptose fördernde *Bax* ist ein Homolog von *EGL-1*, *APAF-1* enthält eine Domäne mit Homologie zu *ced-4* und *Caspase-3* ist ein Homolog von *ced-3*. Die Aktivierung eines Zelltodeffektors wie *Bax* führt zur Bildung eines Apoptose induzierenden Signalkomplexes (death-inducing signaling complex, DISC) und zur Aktivierung von Initiatorcaspasen. **c** *Bak* lokalisiert besonders ausgeprägt auch im endoplasmatischen Retikulum (*ER*) und kann dort die Apoptoseinduktion nach *ER*-Stress vermitteln

[z.B. bei UPR (unfolded protein response)]. **d** Analog hierzu wird bei Aktivierung von Death-Rezeptoren durch die entsprechenden Liganden ein zytoplasmatischer DISC aus z.B. dem Adapterprotein FADD und der Procaspase-8 gebildet. Die Initiatorcaspasen aktivieren Effektorcaspasen, die den apoptotischen Zelltod exekutieren. Inhibitoren können diese Signalwege auf jeder Ebene inhibieren; auf der Ebene der Aktivatoren (z.B. *Bcl-2*), der Adapter (z.B. *Bcl-2*, *FLIP_s* und *FLIP_L*, *SOD*, *CARD-9*) bzw. auf der Ebene der Caspasen: *FLIP_L* und *IAP*. *CED* *Cenorhabditis elegans* death Gen, *ER* endoplasmatisches Retikulum, *UPR* unfolded protein response, *SOD* silencer of death domain, *FLIP_s* kurze Spleissvariante von Fas-linked inhibitory protein, *FLIP_L* lange Spleissvariante, *FADD* Fas-associated death domain, *IAP* inhibitor of apoptosis protein, *CARD* Caspaserekrutierungsdomäne

Rekrutierung von Caspase-9 zu blockieren vermag), deren genaue Rolle in diesem Signaltransduktionsweg aber noch nicht völlig geklärt ist.

4. TRAIL-Rezeptor 4,
5. TRAIL-Rezeptor 5 sowie
6. DR6, für den noch kein Ligand identifiziert wurde (Abb. 2.2.18).

2.2.3.1 Death-Rezeptoren

Diese in der Plasmamembran lokalisierten Transmembranrezeptoren sind durch ihre Primärstruktur repetitiver cysteinreicher extrazellulärer Domänen charakterisiert, welche die Trimerisierung dieser Rezeptoren vermitteln und die Bindung der ebenfalls trimeren Liganden ermöglichen. Zusätzlich enthalten sie im intrazellulären Teil eine als Death-Domäne (DD) bezeichnete Aminosäuresequenz, welche die Bindung von signaltransduzierenden Adapterproteinen und die Bildung des DISC vermittelt (Daniel et al. 2001). Gegenwärtig sind 6 Death-Rezeptoren bekannt:

1. 50 kDa TNF-Rezeptor (TNF-R1),
2. CD95/Fas,
3. TRAIL-Rezeptor DR3,

So genannte Decoy-Rezeptoren können Liganden der Death-Rezeptoren binden und sequestrieren, da es sich entweder um lösliche Moleküle oder Rezeptoren ohne funktionelle zytoplasmatische Death-Domänen handelt. Die biologische Funktion der Decoy-Rezeptoren für die Apoptoseregulation, v.a. in vivo, und für experimentelle Tumorthérapien mit Death-Liganden, wie z.B. TRAIL, ist jedoch noch völlig ungeklärt, insbesondere die Frage, ob hierdurch Resistenzen gegenüber diesen Apoptose induzierenden Liganden ausgelöst werden können.

Die Bindung der entsprechenden Liganden (CD95/Fas Ligand) (Suda et al. 1993), TNF (Tumornekrosefaktor) oder TRAIL (Wiley et al. 1995) (TNF-related apoptosis inducing ligand) vermittelt die Trimerisierung der Death-Rezeptoren (Banner et al. 1993) und erhöht die lokale Konzentration der Re-

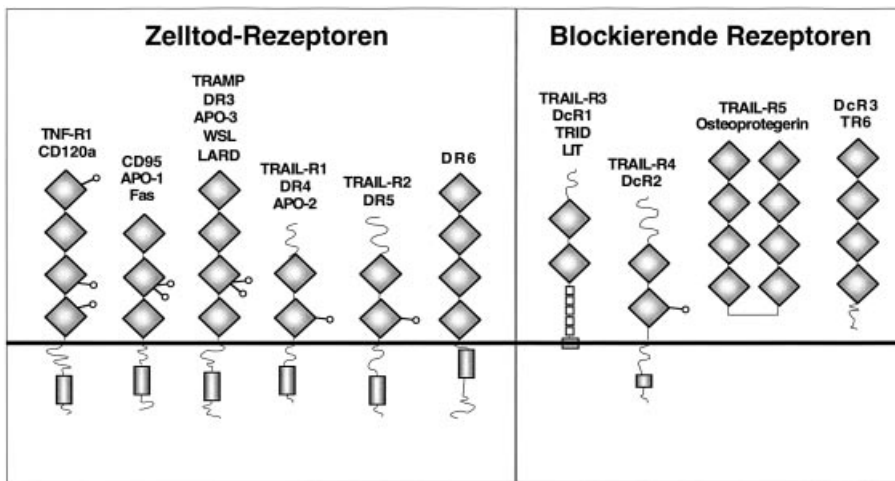


Abb. 2.2.18. Death-Rezeptoren und neutralisierende Decoy-Rezeptoren. Mitglieder dieser Untergruppe der TNF-Rezeptor-Superfamilie sind durch ihre intrazelluläre Death-Domäne (DD) charakterisiert, die als *graue Box* schematisch dargestellt ist. Die 2–4 Boxen im extrazellulären Teil symbolisieren homologe, cysteinreiche Domänen, die für Bindung der Death-Liganden und Trimerisierung der Rezeptoren ver-

antwortlich sind. Den TRAIL-Decoy-Rezeptoren *DcR1* und *DcR2* fehlt die intrazelluläre Domäne bzw. sie enthalten nur eine trunkierte, funktionell inaktive DD. Osteoprotegerin (OPG) und *DcR3* werden sezerniert und sind lösliche, nicht membranständige Moleküle. Angegeben sind die jeweiligen gebräuchlichen Bezeichnungen und deren Synonyme für die verschiedenen Death- und Decoy-Rezeptoren

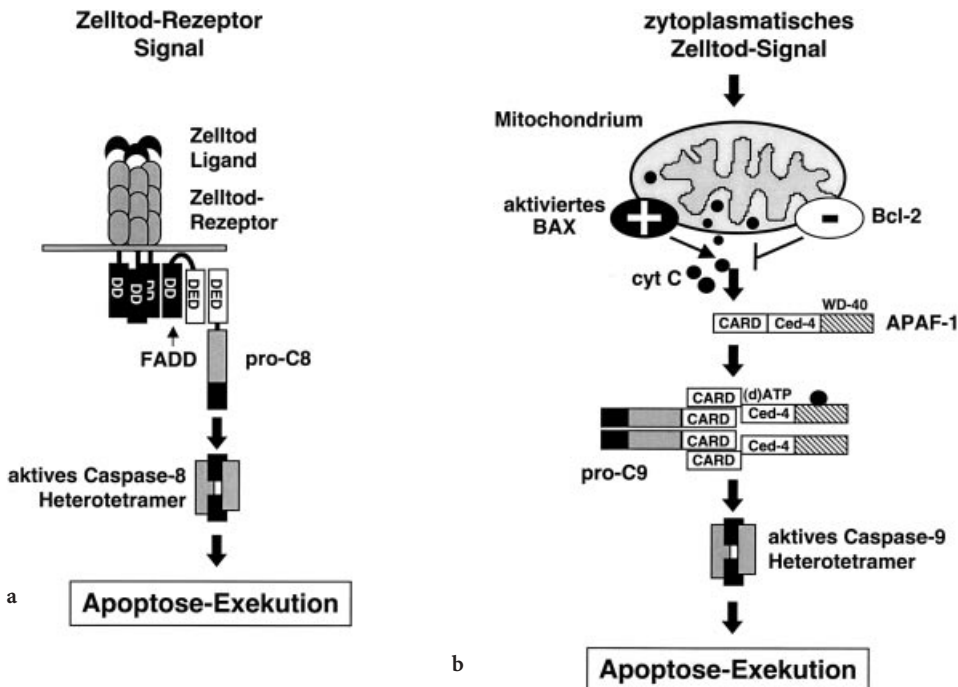


Abb. 2.2.19 a, b. Aktivierung des mitochondrialen und des Death-Rezeptor-vermittelten Apoptosesignalwegs. **a** Aktivierung von Death-Rezeptoren führt zur Bildung eines DISC. Im Fall des CD95-Fas-Rezeptors führt die Bindung des trimeren Fas-Liganden an ein Rezeptortrimer zur DISC-Bildung: das FADD-Adapterprotein wird über die Death-Domänen in CD95 und FADD rekrutiert. Dies stimuliert die Bindung von Procaspase-8 (C8) über die Death-Effektor-Domäne (DED) in *pro-C8*, wodurch die Aktivierung von *pro-C8* zur aktiven *Caspase-8* in-

duziert wird. **b** Der mitochondriale Apoptosesignalweg kann über die Aktivierung von p53, z. B. nach DNA-Schädigung, aktiviert werden. Über *Bax* wird die Freisetzung von Cytochrom c induziert. Dies führt zur Aktivierung des *Apaf-1*-Adapterproteins, wodurch die Rekrutierung von *pro-C9* in den Komplex ausgelöst wird. *Pro-C9* wird autokatalytisch aktiviert und die Effektorcaspasesignalkaskade wird aktiviert. DD Death-Domäne, DED Death-Effektordomäne, DISC death-inducing signaling complex, FADD Fas-assoziierte Death-Domäne

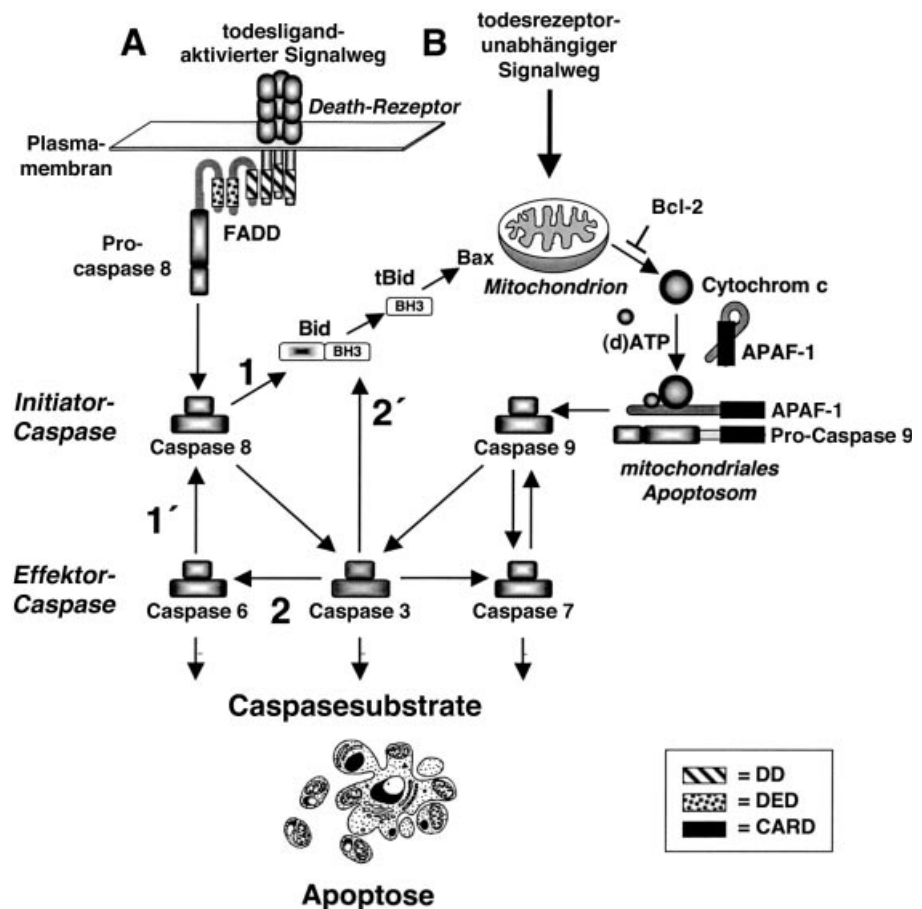


Abb. 2.2.20 A, B. Vernetzung von Signalwegen und Amplifikationsschleifen von Apoptosesignalwegen. A Ein wichtiger Signalweg wird durch Death-Liganden (z. B. CD95-Ligand, CD95L, FasL) aktiviert. Durch Bindung des Liganden wird ein membranständiger Signalkomplex (DISC) gebildet, der aus CD95L, CD95-Rezeptor, dem Adapterprotein FADD und der Initiatorcaspase *Procaspase-8* besteht, die hierdurch aktiviert wird. *Caspase-8* wiederum spaltet und aktiviert die Effektorcaspase-3. Dieser Signalweg kann amplifiziert werden durch (1) *Caspase-8*-vermittelte Spaltung von Bid bzw. (1') durch die *Caspase-6*-vermittelte Spaltung von *Caspase-8*, die beide den *Caspase-8*-Signalweg mit dem mitochondrialen Apoptosom (mitochondrialer DISC) verknüpfen. B Ein weiterer, rezeptorunabhängiger Signalweg wird durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli aktiviert, wie z. B. Zytostatika,

Bestrahlung, fehlgeschlagene DNA-Reparatur, Ceramid. Die Aktivierung des Mitochondriums über Bax und dessen Homologe führt zur Bildung und Öffnung von Kanälen, die *Cytochrom c* freisetzen und durch Ausstrom von Ionen, v. a. auch H^+ , zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotenzials führen. *Cytochrom c* und (d)ATP binden an das zytosolische APAF-1, das daraufhin die *Procaspase-9* rekrutiert und hierdurch das mitochondriale Apoptosom bildet. Die Initiatorcaspase *Procaspase-9* spaltet sich autokatalytisch und die aktive *Caspase-9* wiederum spaltet und aktiviert die Effektorcaspasen-3, -6, und -7. Dieser Signalweg kann entweder durch die *Caspase-6*-vermittelte Spaltung von *Caspase-8* (2) oder die *Caspase-3*-vermittelte Spaltung von Bid (2') amplifiziert werden. DD Death-Domäne, DED Death-Effektordomäne, CARD Caspaserekrutierungsdomäne

zeptoren am Ort der Ligandenbindung. Hierdurch wird auch die Rekrutierung der Adapterproteine FADD zur DD des Rezeptoroligomers vermittelt (Kischkel et al. 1995) (Abb. 2.2.19a, 2.2.20; FADD: Fas associated death domain; im TNF-R1 und CD95/Fas-Signalweg) bzw. RIP und RAIDD (Abb. 2.2.21; im TNF-R1 Signalweg) (Daniel et al. 2001). Die geclusterten Rezeptoren rekrutieren über diese Adapterproteine Inducer- bzw. Initiatorprocaspasen,

die hierdurch zu den aktiven heterotetrameren Caspasen gespalten und prozessiert werden. Caspase-8 ist die dominante rezeptoraktivierte Caspase und wird z. B. von den TRAIL-Rezeptoren (DR3, 4 und 5), CD95/Fas und TNF-R1 aktiviert (Muzio et al. 1996). Die der Caspase-8 nahe verwandte Caspase-10 wirkt vorwiegend im TRAIL-Rezeptorweg, kann aber Caspase-8 auch im CD95-DISC funktionell komplementieren (Kischkel et al. 2001). Der TNF-R1

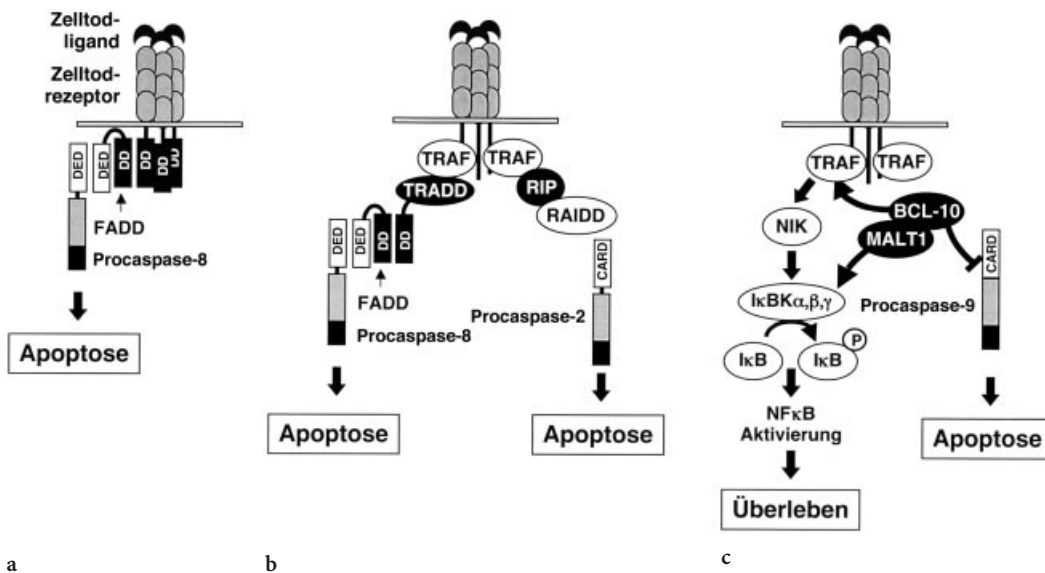


Abb. 2.2.21 a–c. Death-Rezeptorsignaltransduktion, BCL-10 und MALT1. **a** Death-Rezeptoren, eine Untergruppe der TNF-Rezeptorfamilie, aktivieren die Apoptosesignalkaskade über die Rekrutierung von Inducercaspasen über Bindung des FADD-Adapterproteins an die Death-Domäne (DD). Im Fall von z. B. CD95/Fas und TRAIL rekrutiert FADD die Procaspase-8 bzw. -10 über Interaktion der Death-Effektordomäne (DED) in beiden Molekülen. Durch die Bindung der Procaspasen in diesen DISC (death-inducing signaling complex) wird die Downstreamapoptosesignalkaskade aktiviert. **b** TNF- und ähnliche Death-Rezeptoren können über Rekrutierung von RIP- und RAIDD-Adapterproteinen auch die Procaspase-2 rekrutieren und Apoptose aktivieren. Über Rekrutierung von TRAF-Proteinen und Bindung des Adapterproteins FADD kann auch der Caspase-8-Signalweg von diesen Rezeptoren aktiviert werden. **c** TNF-Rezeptoren und andere Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Superfamilie können über TRAF-Adapterproteine und NIK-Kinase die IκB-Kinase (IKK) aktivieren, die aus 3 Untereinheiten, α, β, γ, besteht. IKK phosphoryliert

IκB und inaktiviert es hierdurch. Dies führt zur Freisetzung von NFκB aus der inaktivierenden Bindung an IκB. Die dann biologisch aktiven NFκB-Dimere translozieren in den Kern und aktivieren die Transkription antiapoptotischer (z. B. BCL-x, A1) und proliferationsfördernder Gene (z. B. Cyclin D1). MALT-Lymphome können aufgrund einer t(1;14)-Translokation das BCL-10 dereguliert exprimieren. BCL-10 kann durch Interaktion über seine CARD-Domäne mit der Procaspase-9 interagieren und diese hemmen. Über einen ähnlichen Mechanismus kann BCL-10 auch mit dem TRAF-Signalkomplex interagieren und NFκB-Aktivierung auslösen. Über Bildung eines Komplexes mit dem physiologischen MALT1-Gen kann BCL-10 die IκB-Kinase aktivieren und auch hierdurch den NFκB-Signalweg stimulieren. MALT1 ist zudem bei MALT-Lymphomen Ziel einer anderen chromosomalen Veränderung, der t(11;18)-Translokation, die zur Expression eines Fusionsgenprodukts, API2-MALT1, führt. Das API2-Gen kodiert für das cIAP2-Gen, das ebenfalls Caspaseaktivierung hemmen kann und NFκB-Aktivierung über TRAF stimuliert

kann die Procaspase-2 über die RAIDD- und RIP-Adapterproteine rekrutieren. Der Mechanismus der proteolytischen Aktivierung dieser Inducercaspasen ist nach wie vor unklar, erfolgt aber wahrscheinlich, wie im Fall der Procaspase-9, autokatalytisch in den multimeren DISC-Komplexen.

2.2.3.2 Mitochondrien und Apoptose

Die Aktivierung des mitochondrialen Apoptosesignalwegs (Abb. 2.2.19b) wird von Bcl-2, Bcl-xL und andere Apoptose hemmenden Mitglieder der bcl-2-Gen-Familie kontrolliert und gehemmt (Adams u. Cory 1998). Im Gegensatz hierzu vermögen Apoptose fördernde Mitglieder dieser Genfamilie, wie z. B. Bax (Oltvai et al. 1993), Bak (Farrow et al. 1995)

und Bok (Hsu et al. 1997), direkt Mitochondrien zu aktivieren. Der Verlust der Bax-Expression ist in den meisten Tumoren mit der Resistenz gegen zytotoxische Therapiemodalitäten verbunden (Sturm et al. 1999; Raisova et al. 2000; Bosanquet et al. 2002). Der Apoptose regulierende Mechanismus der Bcl-2-Familienmitglieder ist, obwohl *bcl-2* als eines der ersten Gene in dieser Signalkaskade identifiziert wurde, immer noch nicht vollständig klar. Als gesichert gilt, dass Bax und dessen Homologe direkt Mitochondrien aktivieren können, die daraufhin Cytochrom c und ATP aus dem Raum zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran freisetzen (Jürgensmeier et al. 1998). Dieser Vorgang kann durch Bcl-2 gehemmt werden (Yang et al. 1997).

Die Aktivierung der Mitochondrien kann hierbei in distinkte Aktivierungsschritte unterteilt werden:

1. Die Konformationsänderung im N-Terminus von Bax löst die Translokation vom Zytoplasma und Insertion in die äußere Mitochondrienmembran aus. Dort oligomerisiert Bax.
2. Dies führt als ein sehr frühes Ereignis zur Öffnung von Kanälen und zur Freisetzung von ATP und Cytochrom c.
3. Die Atmungskette als Energielieferant bleibt aktiv.
4. Erst später kommt es durch den Einstrom zytosolischer Ionen und H_2O zum Zusammenbrechen des mitochondrialen Membranpotenzials, der mitochondrialen Permeabilitätstransition ($\Delta\Psi_m$ Verlust) mit Anschwellen der Mitochondrien und Platzen der äußeren und später auch der inneren Membran.
5. Letztlich kommt es zum Zusammenbrechen der Atmungskette (Kroemer u. Reed 2000; Martinou u. Green 2001).

Es ist nach wie vor nicht völlig geklärt, wie diese Kanäle gebildet werden. Sowohl für Bcl-2 als auch Bax konnte gezeigt werden, dass diese Proteine nicht nur über die BH-Domänen (Bcl-2-Homologie) dimerisieren, sondern auch oligomerisieren können, um selbst Kanäle zu bilden (Shimizu et al. 2000). Neben dieser Kanalbildung regulieren Bcl-2 und Bax aber auch spannungsabhängige mitochondriale Kanäle (Shimizu et al. 2000), die in der äußeren Membran durch das VDAC-Protein (voltage dependent anion channel) (Tsujimoto u. Shimizu 2000) und in der inneren Membran durch das ANT-Protein (Adeninnukleotidtransporter) gebildet werden (Vieira et al. 2000). Die Aktivität dieser Kanäle kann durch den peripheren Benzodiazepinrezeptor, der auch in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert ist, moduliert werden.

Das nun zytosolische Cytochrom c bindet an APAF-1, und zwar an dessen WD40-Domäne (Benedict et al. 2000). Gemeinsam mit der Bindung von ATP bzw. dATP an die CED4-Homologiedomäne von APAF-1 wird hierdurch eine Konformationsänderung in APAF-1 ausgelöst, wodurch die CARD-Domäne (Caspaserekrutierungsdomäne) exponiert wird. Dies ermöglicht die Bindung der Procaspase-9 an die APAF-1-CARD-Domäne. Die WD40-Domäne vermittelt auch die Dimerisierung von APAF-1 (Hu et al. 1998), wodurch mindestens 2 Procaspase-9-Proteine in engen räumlichen Kontakt gelangen und sich autokatalytisch zum biologisch aktiven Caspase-9-Heterotetramer spalten (Srinivasula et al. 1998). Neuere Daten lassen vermuten, dass dieses mitochondriale Apoptosom durch weitere CARD enthaltende Proteine zu großen multimeren Protein-

komplexen assoziiert. Dies erleichtert die Aktivierung der Initiatorcaspase. Die aktive Caspase-9 kann durch limitierte Proteolyse die Effektorcaspasen-3, -6 und -7 aktivieren und hierdurch die Exekution der Apoptose einleiten (Nicholson 1999).

Neben Cytochrom c werden noch weitere Proteine aus den apoptotischen Mitochondrien freigesetzt, u. a.

1. AIF (apoptosis inducing factor)

AIF weist hohe Homologie zu bakteriellen Flavoproteinen auf, transloziert in den Zellkern und löst dort eine caspaseunabhängige Spaltung der genomischen DNA in hochmolekulare Fragmente aus (Susin et al. 1999). Die Morphologie des AIF-induzierten Zelltods ähnelt mehr der Nekrose. Der Beitrag dieses Faktors zum apoptotischen Zelltod ist allerdings nach wie vor nicht völlig geklärt.

2. SMAC (second mitochondrial activator of apoptosis)/DIABLO

SMAC (Du et al. 2000) hemmt die Aktivität der antiapoptotischen IAP (s. unten) und verstärkt hierdurch die Exekution der Apoptose.

3. HSP10 (heat shock protein 10 kDa)

HSP10 hat antiapoptotische Funktion und kann die Aktivierung der Procaspase-9 hemmen (Samali et al. 1999).

Die Apoptose hemmende Wirkung von Bcl-2 ist Gegenstand aktueller Diskussionen. Bis vor kurzem wurde die hemmende Wirkung von Bcl-2 im Apoptosom lokalisiert. Grundlage hierfür war, dass eine direkte Bindung von Bcl-xL über dessen Bcl-2-Homologie-Domäne Nr. 4 (BH4) an Ced-4, das *Cenorhabditis elegans*-Homolog von APAF-1 demonstriert wurde (Hu et al. 1998). Diese Interaktion ist jedoch physikalisch sehr schwach, und mittlerweile konnte durch zellbiologische Untersuchungen gezeigt werden, dass Bcl-2 die Apoptose fördernde Wirkung von APAF-1 nicht zu blockieren vermag. Als wahrscheinlichstes Modell wird daher zurzeit favorisiert, dass Bcl-2, Bcl-xL und deren funktionelle Apoptose hemmenden Homologe die Wirkung der Apoptosepromotoren Bax, Bak und Bok inhibieren. Dieser Effekt wird über die physische Interaktion über die Bcl-2-Homologie-Domänen BH1, BH2, v. a. aber auch über BH3 vermittelt. APAF-1 hingegen wirkt nachgeschaltet und übt seine Caspase aktivierende Funktion erst nach Freisetzung von Cytochrom c aus.

Die Unterfamilie der BH3-only-Proteine der *bcl-2*-Gen-Familie reguliert den Vorgang der Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs, indem sie Apoptose hemmende Proteine wie Bcl-xL und

Bcl-2 aus der Bindung an Bax verdrängen können und hierdurch Bax (oder auch Bak) aktivieren. Solche Wirkungen wurden mittlerweile für Bad, Bim und Bid gezeigt. Diese BH3-only-Proteine agieren wahrscheinlich als Bindeglieder zwischen spezifischen Signalkaskaden und der mitochondrialen Apoptosesignalkaskade.

2.2.3.3 Endoplasmatisches Retikulum und Apoptose

Ein erst vor kurzem entdeckter Mechanismus der Apoptose wird über das endoplasmatische Retikulum (ER) aktiviert (Abb. 2.2.17), z.B. durch eine ER-Stressantwort wie der UPR (unfolded protein response), die z.B. nach Hemmung des Protein-exports aus dem ER beobachtet wird (Rao et al. 2001). Dieser Signalweg wird durch die Procaspase-12 vermittelt, die spezifisch mit dem ER assoziiert ist. Caspase-12 wird durch ER-Stresssignale aktiviert, wie z.B. Störungen der Kalziumhomöostase im ER oder Akkumulation missgefalteter Proteine im ER. Die Mehrzahl der Daten zu Caspase-12 wurde im Maussystem erhoben. Durch eine Keimbahnmutation können die meisten Menschen, ausgenommen Schwarzafrikaner, jedoch keine Caspase-12 exprimieren. Wahrscheinlich wird diese Funktion im humanen System durch Caspase-2 und -8 übernommen. Die Aktivierung dieses Signalwegs ist unabhängig von Death-Rezeptor-Signalen und der mitochondrialen Apoptosesignalkaskade. Tunicamycin aktiviert diese Signalkaskade ebenfalls, da es die Proteinglykosylierung im Golgi-Apparat blockiert und zur Proteinretention im ER und einer UPR führt. Ebenso lösen kombinierte Hypoxie und Glukoseentzug eine ER-Stressantwort mit Induktion der ER-Chaperone Bip/grp78 und grp94 und Aktivierung der Caspase-12 aus. Dieser Mechanismus ist wahrscheinlich auch auslösend für den neuronalen Zelltod infolge der Akkumulation von Amyloidproteinen, z.B. beim Morbus Alzheimer (Nakagawa et al. 2000).

Interessanterweise ist die ER-induzierte Apoptose durch Bcl-2 hemmbar. Dieses Protein lokalisiert nicht nur in die Mitochondrienmembran, sondern auch in die äußere ER-Membran. Die molekularen Aktivoren dieser Stressantwort sind noch unbekannt, obwohl hier wahrscheinlich das Bax-Homolog Bak funktionell relevant ist, da es auch am ER lokalisiert sein kann.

Möglicherweise können Zelltodsignalwege auch durch andere Organellen oder funktionelle Strukturen der Zelle aktiviert werden. Einige Hinweise

deuten darauf hin, dass z.B. DNA-Schädigung über Komponenten des DNA-Reparatursystems nukleäre Apoptose aktiviert, die zur Aktivierung der Caspase-2 führt (Zhou u. Elledge 2000).

2.2.3.4 Vernetzung der Apoptosesignalwege

Analog zur multiplen Verknüpfung von Zellzyklus und Apoptose bzw. von DNA-Reparatur und Apoptose sind die verschiedenen Komponenten der Apoptosesignalwege funktionell miteinander vernetzt. Eine Vielzahl verschiedener Signale und Apoptosesignalwege führt zur Aktivierung der mitochondrialen Apoptosesignalkaskade über die Aktivierung von Bax (Oltvai et al. 1993) und der Bax-Homologe Bak (Farrow et al. 1995) und Bok/Mtd (Hsu et al. 1997). Eine besondere Stellung nehmen hierbei die BH3-only-Proteine der *bcl-2*-Gen-Familie ein. Sie enthalten lediglich die BH3-Domäne und sehr unterschiedliche Prodomänen, die, wie neuere Daten zeigen, über Phosphorylierung die Funktion dieser Proteine regulieren können. Zum Teil sind diese Proteine gewebespezifisch exprimiert und wahrscheinlich an der Regulation gewebe- und zelltypspezifischer Mechanismen beteiligt.

Das BH3-only-Protein Bad (Yang et al. 1995) ist ein Bindeglied zum PI3- und dem Akt/PKB-Kinase-Signalweg (Alessi et al. 1997) sowie dem RAS-Signalweg (Scheid u. Duronio 1998). Es interagiert mit Bcl-xL und inaktiviert es hierdurch funktionell. Bad wird über die PI3/Akt-Kinasekaskade phosphoryliert und inaktiviert (Alessi u. Cohen 1998). Hierdurch kann Bcl-xL aus der Bindung an Bad befreit werden und den mitochondrialen Apoptosesignalweg hemmen (Zha et al. 1996).

Bim (O'Connor et al. 1998) wiederum koppelt den Dyneinmotorkomplex an den mitochondrialen Zelltodsignalweg (Puthalakath et al. 1999) und ist an der Regulation der immunologischen Homöostase und der Verhinderung von Autoimmunität (Bouillet et al. 1999) sowie neuronaler Apoptose (Putcha et al. 2001) beteiligt. Das BH3-only-Protein BMF wiederum wird durch den Aktin-Myosin-Motor-Komplex reguliert (Puthalakath et al. 2001).

Noxa (Oda et al. 2000), Puma (Nakano u. Wousten 2001; Yu et al. 2001) und wahrscheinlich auch Hrk (Inohara et al. 1997) sind dagegen an der p53-vermittelten Apoptose beteiligt. Weiterhin werden neue Mitglieder der Familie der BH3-only-Proteine identifiziert.

Bid (Wang et al. 1996) verbindet Death-Rezeptor-vermittelte Apoptosesignalwege mit dem mitochondrialen Signalweg. Bid nimmt hierbei eine be-

sondere Stellung ein, da es über einen Caspase-8-abhängigen Mechanismus zu tBid (trunkiertes Bid) gespalten werden kann (Luo et al. 1998). Das trunkierte Bid kann mit Bax interagieren und Bax hierdurch aktivieren und dessen Umverteilung vom Zytoplasma in die äußere Mitochondrienmembran induzieren (Desagher et al. 1999) (Abb. 2.2.20). Analog hierzu kann Bid nach Spaltung durch die Caspase-3 über einen positiven Rückkopplungsmechanismus die mitochondriale Apoptosesignalkaskade amplifizieren (Crompton 2000).

BH3-only-Proteine wirken also proapoptotisch, indem sie in Bax und dessen Homologen eine Konformationsänderung auslösen und hierdurch Mitochondrienaktivierung und Freisetzung von Cytochrom c vermitteln. Ob dies ein direkter Effekt auf Bax-Homologe ist oder durch Sequestrierung von Apoptose hemmenden Bcl-2-Homologen erfolgt (wie im Fall von Bad) ist im Detail noch ungeklärt.

Durch derartige Vernetzungen wird eine Amplifikation der Apoptoseexekution erreicht. Weiterhin wird das System hierdurch redundant, und mögliche singuläre Signaldefekte können überspielt werden.

2.2.3.5 Exekution des apoptotischen Zelltods

Die Effektorcaspasen aktivieren weitere Proteasesysteme wie die der Calpaine und der Cathepsine. Hierdurch werden eine Vielzahl regulatorischer und struktureller Proteine inaktiviert, die für die Aufrechterhaltung der Integrität und das Überleben der Zelle von Bedeutung sind. Hierdurch werden Zytoskelett, Kernmembran und andere Strukturen zerstört. Caspasen aktivieren durch die proteolytische Spaltung auch antiapoptotische Proteine zu proapoptotischen Faktoren (Nicholson 1999). Caspase-3 kann Bcl-2 und Bcl-xL zu Molekülen mit Bax-ähnlicher Wirkung aktivieren (Cheng et al. 1997). Inhibitoren von Endonukleasen, z. B. DFF45/ICAD, werden gespalten und die CAD-Endonuklease wird zur aktiven DNase (Enari et al. 1998). Diese DNasen fragmentieren die genomische DNA in oligonukleosomale, etwa 180 Basenpaare oder deren Vielfaches messende DNA-Fragmente, die sich im Agarosegel als so genannte DNA-Leiter nachweisen lassen (Abb. 2.2.22) (Wyllie 1980; Daniel et al. 1999). Die Zerstörung der Kernmembran und die Aktivierung von Chromatin spaltenden DNasen führen zur Kondensation des nukleären Chromatins (Abb. 2.2.22) und Bildung von Mikronuklei, wie sie z. B. auch in Zellen, die gegenüber ionisierender Strahlung exponiert waren, nachgewiesen werden können. Die Zerstörung des Zytoskeletts führt zur

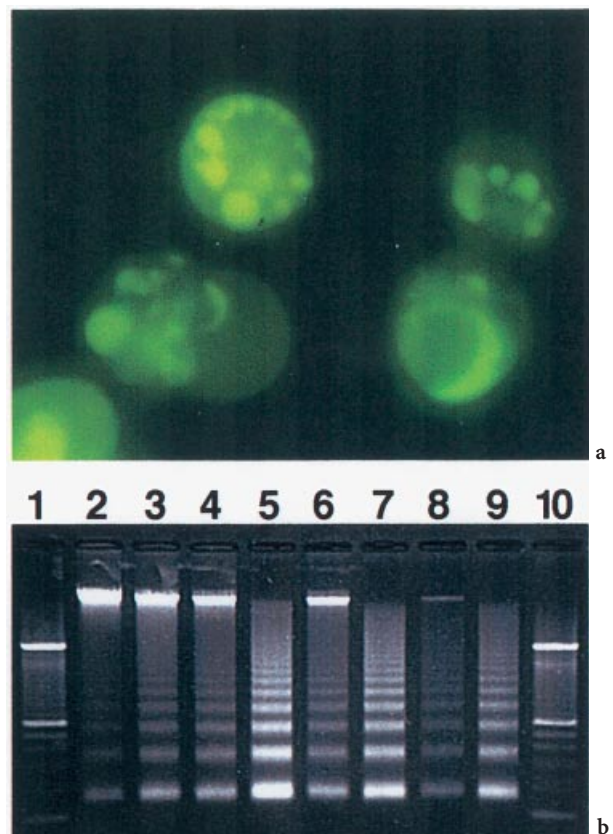


Abb. 2.2.22 a, b. Chromatinkondensation, Kern- und DNA-Fragmentierung bei Apoptose. **a** Apoptotischer Zelltod von B-Lymphomzellen. Die im Zellkern befindliche DNA (durch Bindung an Eiweiße des Zellkerns im so genannten Chromatin organisiert) wird durch das Apoptoseprogramm zerstört und ist perlschnurartig kondensiert. Der Zellkern in der linken unteren Bildecke ist noch nicht apoptotisch und zeigt eine homogene Verteilung des Chromatins. In den Tumorzellen wurde Apoptose durch Aktivierung eines Rezeptormoleküls auf der Zelloberfläche (Oberflächen-IgM) ausgelöst. **b** Oligonukleosomale DNA-Fragmentierung in apoptotischen Thymozyten. Thymozyten von 4 Wochen alten Balb/c-Mäusen wurden in vitro in Zellkulturmedium kultiviert (die Spuren 2, 4, 6, 8 zeigen eine langsam zunehmende Spontanapoptose in vitro) bzw. wurden mit Hilfe von 10^{-6} M Dexamethason aktiv in die Apoptose getrieben (Spuren 3, 5, 7, 9). Die Zellen wurden hierzu für 4 h (Spuren 2, 3), 24 h (Spuren 4, 5), 48 h (Spuren 6, 7) und 72 h (Spuren 8, 9) in vitro kultiviert. Nach diesen Zeitpunkten wurde aus den Zellen genomische DNA extrahiert und dann im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Niedermolekulare, fragmentierte DNA wandert schneller im elektrischen Feld. Apoptotische Zellen zeigen ein charakteristisches Bandenmuster von DNA-Fragmenten in der Länge von 180 Basenpaaren (bp) oder dessen Vielfachen. Spur 2 zeigt einen hohen Anteil genomischer, unfragmentierter DNA im oberen Teil des Gels und wenig Hintergrundapoptose, in den Spuren 5, 7 und 9 ist nach Apoptoseinduktion sämtliche DNA fragmentiert, und 100% der Thymozyten haben das Apoptoseprogramm aktiviert. Die Spuren 1 und 10 zeigen einen DNA-Größenstandard (100 bp und dessen Vielfaches). Kultivierte Thymozyten sterben nach kurzen Zeiträumen in vitro über Wachstumsfaktorentzug. Dies erklärt die zunehmende Hintergrundapoptose in den Kontrollkulturen

Bildung apoptotischer Körperchen durch Abschnürung von Zellanteilen, die auch Mikronuklei enthalten können. Dieser Vorgang wird auch als Zeiose oder Blebbing bezeichnet. In der Spätphase der Apoptose kommt es zur Depletion des ATP-Pools und hierdurch zur Inaktivierung von ATP-abhängigen Pumpen. Dies führt zur Vakuolisierung von Organellen, Mitochondrien und ER schwellen an.

Apoptose ist ein aktiver, energieabhängiger Mechanismus. Ist der Energiestoffwechsel der apoptotischen Zelle völlig zusammengebrochen, geht demzufolge die typische apoptotische Morphologie der Zelle in eine Nekrosemorphologie über (Martinou u. Green 2001). Im Gegensatz zur Nekrose bleibt bei der Apoptose jedoch initial die Plasmamembran erhalten. Allerdings wird die Lipidzusammensetzung verändert. Sphingomyeline werden gespalten und proapoptogene Ceramide gebildet, die die Apoptose weiter amplifizieren (Hanun u. Luberto 2000). Phosphatidylseringruppen, die normalerweise durch eine ATP-abhängige Flippase zur Innenseite der Membran sortiert werden, sind vermehrt auf der Außenseite der Zelle lokalisiert und machen sie hierdurch als apoptotische Zelle kenntlich (Savill u. Fadok 2000). Die von innen heraus degradierte Zelle kann nun von umliegenden Phagozyten wie z.B. Gewebemakrophagen eliminiert werden. Dieser Vorgang erfolgt in vivo sehr rasch, sodass Apoptose im intakten Gewebeverband extrem schwierig nachzuweisen ist. Dies erklärt auch, warum Apoptose als zellbiologischer Mechanismus erst sehr spät erkannt und definiert wurde. Allerdings kann Apoptose je nach Zell- und Gewebetyp sehr unterschiedlich erfolgen, und auch die Morphologie ist somit nicht einheitlich. Selbst Charakteristika wie Chromatinkondensation und oligonukleosomale DNA-Fragmentierung sind nicht obligat. Zudem ist mittlerweile klar, dass es fließende Übergänge zwischen Apoptose und Nekrose geben kann, z.B. beim Zelltod, der durch TNF ausgelöst wird. Besser ist es daher, bei aktiv ausgelöstem Zelltod von programmiertem Zelltod zu sprechen.

2.2.3.6 Störung von Zelltod- und Überlebenssignalen in Tumoren

Death-Rezeptor-Signalwege

Die Inaktivierung von Death-Rezeptoren und deren Liganden ist bei malignen Tumoren selten (Rozenfeld-Granot et al. 2001), tritt jedoch bei einigen wenigen Tumorentitäten gehäuft auf. Patienten mit Burkitt-Lymphomen akkumulieren z.B. Mutationen

im CD95/Fas-Rezeptor (Gutierrez et al. 1999). Einige der Patienten mit Canale-Smith-Syndrom zeigen Mutationen des CD95/Fas-Rezeptors bzw. der nachgeschalteten Caspase-10 (Nagata 1998). Beim letzteren Ereignis handelt es sich aber eher um einen genetischen Polymorphismus. Infolge der gestörten Lymphozytenapoptose kommt es zur Autoantikörperproduktion durch autoreaktive B-Lymphozyten mit resultierenden Lupus-erythematodes-ähnlichen Symptomen. Leitsymptom sind allerdings die benignen Lymphome, die durch die massive Akkumulation anergisierter, CD4-negativer, CD8-schwach-positiver T-Zellen entstehen. In sehr begrenztem Umfang zeigen diese Patienten eine familiäre Häufung maligner Lymphome (Jackson u. Puck 1999). Die Inaktivierung von Komponenten des CD95/Fas-Signalwegs durch Mutation scheint also kein entscheidender genereller Faktor bei der Entstehung maligner Lymphome zu sein. Solche genetische Veränderungen, wie sie z.B. bei den Burkitt-Lymphomen beobachtet werden, sind also am ehesten als sekundäre Veränderung infolge der genetischen Instabilität dieser Lymphome und Selektion zelltodresistenter Klone zu werten.

Virale Zellzyklusaktivatoren und Apoptosehemmer in Tumoren

Tumoren können nicht nur über die Inaktivierung Apoptose fördernder Faktoren einen Überlebensvorteil erlangen, sondern auch über die Überaktivität den Zelltod hemmender und proliferationsfördernder Signale. Solche Phänomene können in der Mehrzahl der malignen Tumoren gezeigt werden. Praktisch jede der derzeit bekannten Ebenen der Signaltransduktion ist hiervon betroffen. Dies ist insbesondere auch für die virale Pathogenese von Tumoren relevant, da viele virale Proteine zur Verlängerung des lytischen Zyklus Apoptosemechanismen hemmen oder durch Aktivierung des Zellzyklus die zelluläre DNA-, RNA- und Proteinsynthesemaschinerie zur Expression viraler Proteine ankurbeln. Diese Proteine wirken daher als Onkogene in der viralen Tumorgenese, z.B. beim Zervixkarzinom (humanes Papillomvirus, HPV), Kaposi-Sarkom (humanes Herpesvirus 8, HHV8), Burkitt-Lymphom (Epstein-Barr-Virus, EBV) und einer Reihe weiterer Tumoren.

Eine Enthemmung des Zellzyklus kann durch virale Zellzyklusaktivatoren wie z.B. das HHV8-*v-cycD*-Gen ausgelöst werden, das ein Homolog des humanen Cyclin D1 ist (Child u. Mann 2001). Ein vergleichbarer Effekt wird durch Inaktivierung von Zellzyklusinhibitoren durch virale Proteine erreicht, wie z.B. von Rb durch HPV16- und

HPV18-E7-Protein (McMurray et al. 2001) oder Adenovirus-E1a-Protein (Gallimore u. Turnell 2001) bzw. SV40-Virus-large-T-Antigen (Pipas u. Levine 2001). Andere virale Proteine inaktivieren z.B. p53 [humanes Papillomvirus HPV16- und HPV18-E6-Protein (McMurray et al. 2001), Adenovirus-E1b-55 kDa-Protein (McCormick 2000), SV40-large-T-Antigen (Pipas u. Levine 2001)] oder hemmen die Mitochondrienaktivierung aufgrund ihrer Homologie zu Bcl-2 [Adenovirus-E1b- 19 kDa-Protein (McCormick 2000), Epstein-Barr-Virus-BHRFII-Protein (Subramanian et al. 1995)] oder (v.a. in insektenpathogenen Viren gezeigt) Caspaseaktivierung [Kuhpocken-crmA-Protein (cytokine response modifier A) (Dbaibo u. Hannun 1998), vIAP (Eiben u. Duckett 1998) und das Baculovirus-p35-Protein, der zurzeit stärkste bekannte Inhibitor von Caspasen (Clem 2001)].

Death-Rezeptor-vermittelte Apoptose kann durch Überaktivität von zellulären (c) oder viral kodierten (v) Adapterproteinblockern gehemmt werden. Hierzu zählen v.a. die FLIP-Proteine (v-FLIP z.B. in HHV8 und *Molluscum-contagiosum*-Viren) (Djerbi et al. 1999). Die kurze Spleißvariante des physiologischen c-FLIP (cFLIP_s) blockiert die Interaktion der DED des FADD-Adapterproteins mit der DED der Procaspase-8 (oder -10) und hemmt hierdurch die rezeptorvermittelte Caspaseaktivierung. Die lange Spleißvariante, cFLIP_L, hemmt zusätzlich als dominant-negatives Caspasesubstrat die Aktivierung von Caspase-8 und -10. Virale vFLIP-Proteine wirken ebenfalls auf dieser Ebene des Signalwegs. Dieser Schritt der Caspaseaktivierung wird auch durch das adenovirale E1b-19 kDa-Protein gehemmt, das an das FADD-Adapterprotein binden kann und hierdurch die Rekrutierung von Procaspase-8 hemmt (Perez u. White 1998). Zusätzlich kann das E1b-19 kDa-Protein auch noch Bcl-2-ähnliche Wirkung entfalten (Subramanian et al. 1995) und somit, wie auch andere virale Apoptoseinhibitoren, auf multiplen Ebenen des Signalwegs agieren.

Inaktivierung des Rb- und des $p14^{ARF}$ -mdm2-p53-Signalwegs

Einer der ersten Apoptose- und Zellzyklusregulatoren, der mit Krankheitspathogenese und Therapieresistenz in Verbindung gebracht wurde, ist das p53-Tumorsuppressorgen (Taylor u. Stark 2001). p53 kann durch Mutation, bevorzugt in den Exonen 5 bis 8 der DNA-Bindungsdomäne bzw. durch Deletion (Chromosom 17p) inaktiviert werden. Die Inzidenz von Inaktivierungen des p53-Tumorsuppressorgens ist bei hämatologischen Neoplasien niedrig (Soussi u. Jonveaux 1991). Bei akuten mye-

loischen und lymphatischen Leukämien liegt sie unter 10%, bei der CLL bei etwa 15% und auch bei hochmalignen B-Zell-Lymphomen nur bei etwa 20%. Allerdings berichteten einige Autoren über höhere Frequenzen der p53-Inaktivierung bei Burkitt-Lymphomen (Ichikawa et al. 1993).

Auch die Richter-Transformation der CLL zu sekundär hochmalignen Lymphomen bzw. maligne Progression niedrigmaligner B-Zell-Lymphome zu hochmalignen B-Zell-Lymphomen geht häufig mit der Akkumulation von p53-Defekten einher (Catovsky 1997). Die Inaktivierung von Apoptosesignalwegen durch Mutationen von CD95/Fas, Bax, p53 oder Überexpression von *mdm2* oder *bcl-2* (s. unten) ist ein entscheidender Schritt bei der malignen Transformation der Burkitt-Lymphome infolge der Deregulation von *c-myc* (Gutierrez et al. 1999), da die alleinige *c-myc*-Aktivierung den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus gefolgt von Apoptose auslöst.

Die Inaktivierung von p53-Homologen wie p73 (Jost et al. 1997) ist ein seltenes Ereignis. p73 ist weitaus seltener als p53 inaktiviert und weniger Mutation als vielmehr Deletion des auf 1q gelegenen Gens wird beobachtet (Irwin u. Kaelin 2001). Dies ist allerdings ein seltenes Ereignis bei hämatologischen Neoplasien. Häufiger wird die Überexpression des p53-Inhibitors *mdm2* beobachtet. Bei akuten lymphatischen Leukämien des Kindesalters und auch Sarkomen ist die *mdm2*-Überexpression mit einer schlechteren klinischen Prognose (krankheitsfreies Überleben bis zum 1. Rezidiv) und Zytostatikaresistenz assoziiert (Zhou et al. 2000).

Wesentlich häufiger ist das $p14^{ARF}$ -Gen betroffen (Eischen et al. 1999). Die Deletion dieses Genlocus ist mit einer schlechten Prognose hoch- und niedrigmaligner B-Zell-Lymphome assoziiert (Gronbaek et al. 2000). Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass der Verlust von $p16^{INK4a}$ oder $p14^{ARF}$ mit einem schlechteren Therapieansprechen einhergeht, also möglicherweise an der Progression zum therapieresistenten Tumor beteiligt ist (Schmitt et al. 1999; Eischen et al. 2001). Die Bedeutung für akute lymphatische Leukämien und myeloische Neoplasien ist hingegen noch unklar. Ebenfalls unbekannt ist, ob die schlechtere klinische Prognose nun durch den Verlust von $p16^{INK4a}$ oder $p14^{ARF}$ (oder beiden) ausgelöst wird, da häufig beide Gene simultan durch Deletion der entsprechenden Genregion inaktiviert sind. Überexpression von MDM2 als Inhibitor von p53 wird ebenfalls bei einer Vielzahl von Tumoren beobachtet und ist z.B. bei der kindlichen ALL mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Zhou et al. 2000). Neben der reinen Überexpression wurden

auch Mutationen und Spleißvarianten beschrieben, die dominant-negativ mit Wildtyp-MDM2 interagieren und MDM2 funktionell inaktivieren können (Sigalas et al. 1996). Die pathogenetische und prognostische Relevanz dieser Spleißvarianten ist jedoch ebenfalls noch ungeklärt.

Neben der Deregulation von CDK-Inhibitoren und den Komponenten des $p53/p14^{ARF}$ -Signalwegs werden in einigen Lymphomen auch Störungen der Komponenten des Rb-Signalwegs beobachtet. Der eindrucksvollste Defekt ist hierbei die deregulierte Expression von Cyclin D1 in Mantelzonelymphomen (Donnellan u. Chetty 1998), die 2–10% aller Non-Hodgkin-Lymphome ausmachen. Bei der Mehrzahl der Patienten kann eine $t(11;14)$ -Translokation nachgewiesen werden, die das Cyclin-D1(*bcl-1/prad1*)-Gen unter die deregulierende Kontrolle des Immunglobulinschwerkettenenhancers bringt. Neben der $t(11;14)$ -Translokation kann Cyclin D1 auch infolge einer Amplifikation des Cyclin-D1-Gens überexprimiert werden. Im Rahmen der Progression der Erkrankung kann es zur Akkumulation zusätzlicher genetischer Schäden wie Mutation von *p53* oder Deletion des *ink4a*-Gen-Locus und Verlust von $p16^{INK4a}/p14^{ARF}$ kommen, die mit einer aggressiveren Tumorbilogie einhergehen (Pinyol et al. 1998).

Da die Expression von Cyclin D1 in normalen lymphatischen Zellen selten und schwach ist, ist der Nachweis von starker Cyclin-D1-Expression in malignen B-Lymphozyten ein deutlicher Hinweis auf das Vorliegen eines Mantelzonelymphoms. Cyclin-D1-Expression ist ansonsten nur in einigen wenigen anderen B-Zell-Lymphomen wie der Haarzellleukämie nachweisbar, dort jedoch wesentlich schwächer, und ist nicht Folge einer $t(11;14)$ -Translokation.

***bcl-2*-Gen-Familie und das mitochondriale Apoptosom**

Bcl-2-Familienmitglieder konnten mittlerweile als pathogenetisch und auch prognostisch relevante Faktoren bei nahezu allen hämatologischen Neoplasien identifiziert werden (Adams et al. 1999). Nahezu alle follikuläre Lymphome tragen die $t(14;18)$ -Translokation, die das *bcl-2*-Gen mit dem Schwerkettenenhancer des Immunglobulinkomplexes assoziiert (Bordeleau u. Berinstein 2000). Hierdurch kommt es zur deregulierten, konstitutiven Expression des Bcl-2-Proteins (Tsujimoto et al. 1985).

Die Überexpression von Bcl-2 in B-Lymphozyten in transgenen Mäusen allein führt nur zur B-Zell-Hyperplasie (McDonnell et al. 1989) und nur in einem geringen Prozentsatz zu malignen B-Zell-Lymphomen, in denen dann zusätzlich eine

Deregulation von *c-myc* nachgewiesen werden kann (McDonnell u. Korsmeyer 1991). Werden jedoch beide Transgene im B-Zell-Kompartiment zur Überexpression gebracht, entwickeln alle transgenen Mäuse hochmaligne B-Zell-Lymphome. *bcl-2* ist somit kein Onkogen im eigentlichen Sinn, sondern kooperiert bei der Onkogenese mit solchen Genen, die Proliferation deregulieren, für sich allein betrachtet aber in der betroffenen Zelle Apoptose auslösen würden.

Die $t(14;18)$ -Translokation kann auch bei einigen wenigen hochmalignen B-Zell-Lymphomen und chronischen lymphatischen Leukämien (CLL) nachgewiesen werden, ist für sich genommen aber nicht mit einer schlechteren klinischen Prognose assoziiert. Hingegen ist das Proteinexpressionsniveau, v. a. bei hochmalignen B-Zell-Lymphomen, mit einem schlechteren Ansprechen auf aggressive Polychemotherapie verbunden. Hohe Proteinexpression von *bcl-2* wird in diesen Tumoren also anscheinend durch von der $t(14;18)$ -Translokation unabhängige Faktoren reguliert (Gascoyne et al. 1997).

Bei der B-CLL wird im Vergleich zu anderen B-Zell-Lymphomen eine konstitutiv hohe *bcl-2*-Expression gefunden (Hanada et al. 1993). Die B-CLL ist durch niedrige Proliferationsrate verbunden mit der Akkumulation nicht teilungsaktiver, jedoch apoptoseresistenter Lymphozyten charakterisiert. Die hohe Expression von *bcl-2*, aber auch von dessen Homolog *mcl-1*, könnte somit ein entscheidender pathogenetischer Faktor sein, und individuelle Unterschiede im Proteinexpressionsniveau sind mit einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert (Kitada et al. 1998).

Ebenso kann bei einer Vielzahl von Tumoren der Verlust des proapoptotischen Bax-Proteins nachgewiesen werden. Bei einer Vielzahl von Tumoren geht der Verlust von Bax mit einem schlechteren Therapieansprechen bzw. einer schlechteren Prognose einher (Wagner et al. 1996; Sturm et al. 1999, 2000, 2001; Prokop et al. 2000; Raisova et al. 2000, 2001; Bosanquet et al. 2002). Die Ursache für den Verlust von Bax ist in den meisten Tumoren noch ungeklärt, liegt aber wahrscheinlich auf transkriptioneller Ebene, da der Bax-Promotor einen extrem hohen Gehalt an CpG-Inseln enthält, die aufgrund von Promotormethylierung für den Bax-Verlust verantwortlich sein könnten. Bax-Mutationen sind hingegen nur bei einem Teil der Patienten für den Expressionsverlust verantwortlich. Bax-Mutationen werden v. a. bei gastrointestinalen Tumoren (Magen- und kolorektale Karzinome) mit Defekten des DNA-Mismatch-Reparatursystems beobachtet (Rampino et al. 1997), sind aber bei den meisten hämatologi-

schen Neoplasien extrem selten. Allerdings können sie bei den klinisch sehr aggressiven Burkitt-Lymphomen gehäuft nachgewiesen werden (Gutierrez et al. 1999). Im Gegensatz zum Bax-Expressionsverlust ist die pathogenetische und klinische Relevanz der Bax-Mutation in diesen Tumoren jedoch noch ungeklärt.

Für APAF-1 konnte bisher nur ansatzweise eine pathogenetische Relevanz nachgewiesen werden. Mutationen von *apaf-1* wurden bisher bei Tumoren mit DNA-Mismatch-Reparaturdefizienz beschrieben, bei denen Frameshift-Mutationen mit Verschiebung des Leserasters gezeigt wurden, für die bisher aber kein Bezug zum Therapieansprechen bzw. Resistenzverhalten gezeigt werden konnte. Expressionsunterschiede von *apaf-1* korrelieren nicht mit der klinischen Prognose und Knockout-Mäuse zeigen keine erhöhte Tumorzinzidenz. Dies macht die Existenz weiterer, komplementärer Gene wahrscheinlich, die die Funktion von APAF-1 ersetzen können. In der Tat resultiert der kombinierte Ausfall von APAF-1 in Kombination mit gleichzeitiger Überexpression von *c-myc* in einer hohen Rate von Tumoren im Maussystem (Soengas et al. 1999). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass kürzlich in Melanomen die Inaktivierung von APAF-1 durch Promotormethylierung gezeigt wurde (Soengas et al. 2001).

Ein kürzlich klonierter Faktor, SMAC/Diablo, kann während der Apoptose aus Mitochondrien freigesetzt werden, IAP inhibieren und wirkt somit Apoptose fördernd (Srinivasula et al. 2001). Unklar ist jedoch noch, ob ein SMAC/Diablo-Verlust mit Therapieresistenz assoziiert ist. Ebenso gibt es bisher kaum Hinweise für die Beteiligung von Caspasedefekten an der Therapieresistenz von Tumoren. Die Mutation des Caspase-3-Gens resultiert in der MCF-7-Mammakarzinomlinie in einer nahezu vollständigen Hemmung der zytostatika- und bestrahlungsinduzierten Apoptose (Friedrich et al. 2001).

Kinasesignalwege und Apoptoseresistenz: die PTEN-Phosphatase

Viele zelluläre oder virale Onkogene sind Kinasen, die Proliferations- und Antiapoptosesignale vermitteln. Die Inaktivierung von Kinasesignalwegen zum richtigen Zeitpunkt ist daher von entscheidender Bedeutung für die negative Regulation der Zelle und die Verhinderung der malignen Transformation.

Das *pten*-Gen (Phosphatase- und Tensinhomolog) konnte als ein solcher Tumorsuppressor identifiziert werden und wirkt aufgrund seiner Funktion als Phosphatase als Kinaseinhibitor (Yamada u. Araki 2001). Zusätzlich kann es aufgrund seiner Homo-

logie zu Tensin an fokalen Adhäsionspunkten lokalisiert und mit Aktinfilamenten assoziiert sein. Das auf Chromosom 10q23 lokalisierte Gen ist bei Patienten mit Cowden-Syndrom (familiäre Neigung zu Hamartomen und malignen Tumoren) inaktiviert, und inaktivierende Mutationen wurden auch bei soliden Tumoren (verschiedene Karzinome, u. a. des Gastrointestinaltrakts, der Schilddrüse, der Brust, der Prostata und der Niere sowie ZNS-Tumoren), aber auch malignen Lymphomen beschrieben (Yamada u. Araki 2001). So zeigt ein Teil der Patienten mit t(14;18)-Translokation zusätzlich eine Deletion von 10q23 in den Tumorzellen. Solche Deletionen können bei 5–10% der Patienten mit B-Non-Hodgkin-Lymphomen nachgewiesen werden, und zwar eher bei höher- als bei niedrigmalignen Varianten. Ein geringerer Prozentsatz der Patienten zeigt inaktivierende Mutationen, die erneut bei Burkitt-Lymphomen gehäuft auftreten, bei denen auch bialelelische Deletionen nachgewiesen wurden. Ein höherer Prozentsatz von 10–24% von 10q23-Deletionen wurde kürzlich bei primär kutanen T-Zell-Lymphomen beschrieben (Sakai et al. 1998).

Das bevorzugte Substrat von PTEN ist Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP3), ein signaltransduzierender Lipid-Second-Messenger. PIP3 wird durch das Enzym PI3-Kinase gebildet, das durch andere Kinasesignalwege (vgl. RAS und BCR-ABL) und Signale von Zelloberflächenrezeptoren aktiviert werden kann. PI3-Kinase wiederum kann die Akt-Kinase (Proteinkinase B, PKB) aktivieren, die ebenfalls als Onkogen wirken kann und die Apoptose hemmt. Durch Verlust von PTEN können diese aktivierenden und Apoptose hemmenden Signale nicht mehr abgeschaltet werden.

Ähnliche Effekte können durch deregulierte Überaktivität rezeptorabhängiger Signalwege ausgelöst werden. Hierzu zählen z. B. Mutationen in Wachstumsfaktorrezeptoren (z. B. Flt3-Rezeptor, M-CSF-Rezeptor, G-CSF-Rezeptor usw.), wie sie bei akuten myeloischen Leukämien gehäuft beobachtet werden. Solche Mutationen können, wie für Flt3-Interne-Tandem-Repeat-Mutationen gezeigt, mit einer schlechteren Prognose der AML einhergehen (Whitman et al. 2001).

RAS-Signalweg und das *bcr-abl*-Fusionsgen

In die gleiche Kategorie wie die aktivierenden Mutationen von Wachstumsfaktorrezeptoren fallen aktivierende Mutationen von *ras*-Genen (K-, H-, N-*ras*). Durch diese Mutationen wird der RAS/MAP-Kinase-Signalweg aktiviert, der überwiegend Apoptose hemmend wirkt und proliferationsaktivierende Funktionen vermittelt (Roovers u. Assoian 2000).

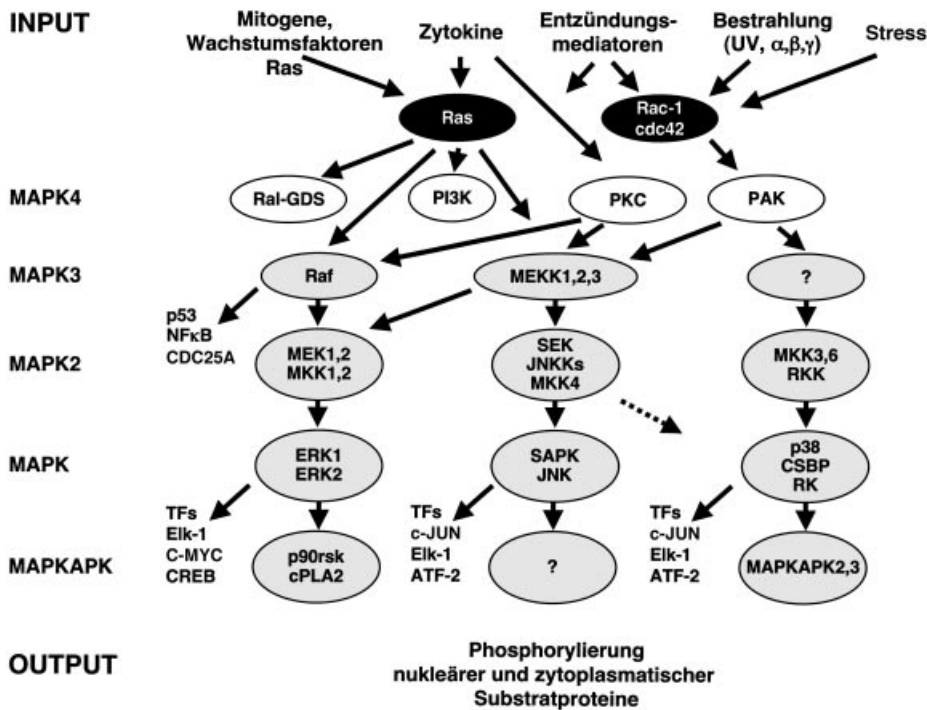


Abb. 2.2.23. Multiple Signaltransduktionskaskaden, vermittelt durch die MAP-Kinase-Kaskade. Diese Signalkaskaden lassen sich mehr oder weniger gut in 3 Proteinphosphorylierungskaskaden abgrenzen. Zwischen diesen Kinasesignalwegen herrscht jedoch eine erhebliche Quervernetzung, abhängig vom initialen Stimulus. Pfeile: Haupttrouten der Signalübertragung. Um die Übersicht zu erhalten, wurden eine

Vielzahl möglicher Interaktionen nicht dargestellt. Resultat der Signalketten ist die Phosphorylierung nukleärer und zytoplasmatischer Signalproteine, die dann den Effekt (Output) in Abhängigkeit vom initialen aktivierenden Signal (Input) vermitteln. TF Transkriptionsfaktor, cPLA2 zytosolische Phospholipase A2

RAS ist ein an der Plasmamembran lokalisiertes kleines, monomeres G-Protein, das nach extrazellulären Signalen z.B. über Wachstumsfaktor- oder Zytokinrezeptoren aus dem GDP-gebundenen inaktiven in den GTP-gebundenen aktiven Zustand wechselt. Diese rezeptorabhängige Aktivierung von RAS vermittelt die Signaltransduktion extrazellulärer Stimuli und verknüpft diese Signale mit einer ganzen Reihe von nachgeschalteten Signalkaskaden, die unterschiedlichste, zelltypspezifische Funktionen aktivieren, aber auch eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung von Zellproliferation, Überleben und, in einigen Fällen, auch Apoptose spielen (Abb. 2.2.23).

RAS-vermittelte Signale und der Wechsel vom GDP- zum GTP-gebundenen Zustand wird durch Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEF) und GTPase aktivierende Proteine (GAP) reguliert. GEF aktivieren RAS und GAP inaktivieren es. RAS ist eines der am häufigsten dereguliert aktivierten Signalproteine in myeloischen Leukämien (Beaupre u. Kurzrock 1999). Der RAS-Signalweg kann durch aktivierende RAS-Mutationen, Deregulation von

GEF und GAP konstitutiv aktiviert werden. Ebenso führen übergeordnete Signale, z.B. durch Überexpression oder aktivierende Mutation von Wachstumsfaktorrezeptoren, zellautonome Produktion von Zytokinen und kooperierende Onkogene wie das BCR-ABL-Fusionsgenprodukt zur Deregulation des RAS-Signalwegs. Diese Ereignisse spielen eine wesentliche pathogenetische und die Tumorbilogie und das Therapieansprechen bestimmende Rolle, indem sie Zelltodmechanismen inaktivieren und den Zellzykluseintritt und die Zellproliferation stimulieren. Im Gegensatz zu kolorektalen, Pankreas- und Bronchialkarzinomen, in denen häufig das K-ras-Gen betroffen ist, ist bei myeloischen Leukämien, Plasmazytom und Plasmazelleukämie häufiger das N-ras-Gen dereguliert (Rodenhuis 1992; Corradini et al. 1994).

RAS wird als inaktives Vorläufermolekül synthetisiert, das posttranslational modifiziert werden muss, um aktiv zu wirken. Der wichtigste Mechanismus ist hierbei die Prenylierung durch das Enzym Farnesyltransferase. Mutierte und biologisch aktive RAS-Proteine liegen in der farnesylierten

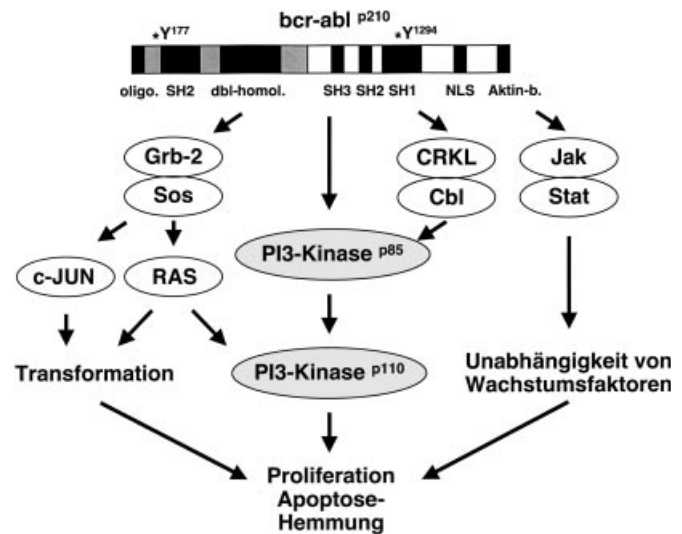


Abb. 2.2.24. Aktivierung von Kinasesignalwegen durch das BCR-ABL-Fusionsgenprodukt. Das BCR-ABL-Fusionsprotein ist konstitutiv in *bcr-abl*-positiven Leukämien exprimiert und aktiviert RAS, PI3-Kinase und MAP-Kinase-Signalwege sowie den Jak-Stat-Signalweg. Dies resultiert in der Aktivierung von Überlebenssignalwegen und Unabhängigkeit von exogenen Wachstumsfaktoren, Schutz vor Apoptose und Aktivierung des Zellzyklus

Form vor. Dieses aktivierte RAS rekrutiert Adapterproteine und aktiviert hierdurch nachgeschaltete Kinasesignalwege, v.a. die MAP-Kinase-Kaskade (Abb. 2.2.23) und antiapoptotische Kinasen wie Akt/PKB- und PI3-Kinase.

RAS fördert die Tumorgenese nicht nur durch seine proliferationsaktivierende Wirkung, sondern auch über die Hemmung von Apoptosesignalwegen. Dies ist bei *bcr-abl*-positiven Leukämien besonders eindrucksvoll (Abb. 2.2.24). Das durch die t(9;22)-Translokation entstehende Fusionsgen und das resultierende Protein aus dem Gen der *c-abl*-Tyrosinkinase auf Chromosom 9 und dem *bcr*-Gen auf Chromosom 22 ist in nahezu allen chronischen myeloischen Leukämien (CML), häufig bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom (MDS) und bei etwa 5% der akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) nachweisbar. Das p210-Fusionsprotein wird vorwiegend bei CML gefunden, wohingegen bei Patienten mit ALL bevorzugt das p190-Fusionsprodukt entsteht, was auf einen alternativen Mechanismus der Pathogenese schließen lässt. Die Biologie beider Fusionsproteine ist jedoch die Gleiche: die Überaktivität der ABL-Tyrosinkinase führt zur Unabhängigkeit der Zellen von Wachstumsfaktoren, aktiviert die Zellproliferation und vermittelt Apoptoseresistenz, z.B. über den PI3-Kinase-Akt/PKB-Kinase-Signalweg (Sawyers 1997). Letzteres erklärt das außerordentlich aggressive klinische Erscheinungsbild und die Therapieresistenz *bcr-abl*-positiver akuter Leukämien.

Das Verständnis dieser pathogenetischen Zusammenhänge hat zur Entwicklung spezifischer Therapeutika geführt: STI-571 (Imatinib), ein spezifischer Hemmer der c-ABL-Tyrosinkinase, blockiert effek-

tiv diesen Teil der durch BCR-ABL aktivierten Signalwege und hemmt das Wachstum und aktiviert die Apoptose *bcr-abl*-positiver Leukämiezellen (Druker u. Lydon 2000; Mauro u. Druker 2001). Proliferations- und Überlebenssignale, z.B. über den RAS-Signalweg (Adjei 2001) und die Akt-Kinase (Stambolic et al. 1999), werden hierdurch abgeschaltet. STI-571 hat bereits in den ersten klinischen Studien eindrucksvolle Effekte gezeigt. Die malignen Zellen werden im Wachstum gebremst, sterben spontan oder werden für weitere zytotoxische Therapien empfindlicher. Ähnliche Effekte konnten mittlerweile auch für Hemmer des RAS-Signalwegs, wie z.B. Farnesyltransferaseinhibitoren, gezeigt werden (Crul et al. 2001). Die Hemmung des RAS-Signalwegs und der damit verbundenen Apoptose-signalwege vermittelt auch eine erhöhte Empfindlichkeit der Leukämiezellen für zytotoxische Therapien, wie z.B. Zytostatika (Fang et al. 2000). Allerdings sind auch beim Einsatz dieser Substanzen Resistenzentwicklungen beobachtet worden (le Coutre et al. 2000; Hochhaus et al. 2001).

Während RAS-Mutationen bei *bcr-abl*-positiven Leukämien selten sind, kann dennoch bei vielen, v.a. akuten myeloischen Leukämien, eine konstitutive Aktivierung des RAS-Signalwegs nachgewiesen werden. Hierdurch kommt es zur Aktivierung weiterer Kinasesignalwege, z.B. über die PI3-Kinase bzw. Akt/PKB, die dann Apoptosehemmung vermitteln, z.B. über Hochregulation von Bcl-2, Bcl-xL und Inaktivierung von Bad (Abb. 2.2.25).

Die beteiligten Signalnetzwerke sind jedoch komplex. Dies gilt v.a. für die MAP-Kinase-Kaskaden (Abb. 2.2.23). Sowohl für JNK- und p38- Stresskinase als auch für in der Kaskade nachgeschaltete Gene

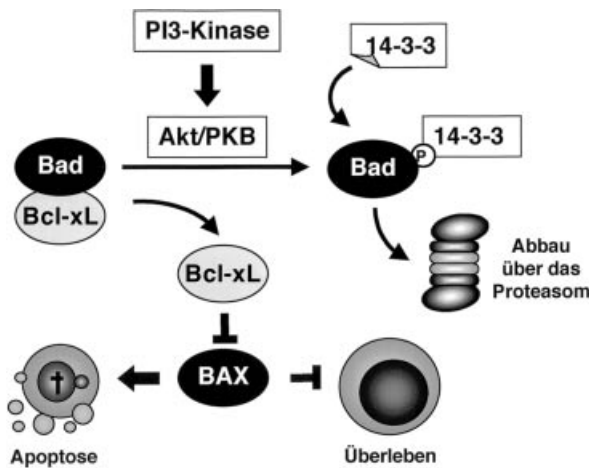


Abb. 2.2.25. Mechanismus der Apoptosehemmung durch den PI3-/Akt-Kinase-Signalweg. Die PI3-Kinase vermittelt Apoptosehemmung über die Aktivierung der Akt-Kinase (PKB-Kinase). Ein wesentlicher Mechanismus der Apoptosehemmung durch Akt ist die Phosphorylierung des Bad-Proteins, eines Apoptose fördernden Bcl-2-Homologs. Phosphoryliertes Bad bindet an 14-3-3 σ -Proteine und wird nach Ubiquitinylierung über das Proteasom abgebaut. Durch die Bindung und Sequestrierung von Bad wird das Apoptose hemmende Bcl-xL-Protein aus der inaktivierenden Bindung an Bad befreit und kann nun den mitochondrialen Apoptosesignalweg hemmen

wie den Transkriptionsfaktor JUN als Komponente des AP-1-Heterodimers oder Cyclin D1 wurden Zell-
tod fördernde und Zell-
tod hemmende Effekte be-
schrieben. Entscheidend für die maligne Trans-
formation, die durch RAS-Deregulation ausgelöst wird,
sind jedoch weitere genetische Veränderungen, die
mit der Zell-
tod hemmenden und proliferationssti-
mulierenden Wirkung des RAS-Signalwegs koope-
rieren. Hierzu zählt v.a. die Inaktivierung des
p14^{ARF}/p53-Signalwegs, für den bereits eine onko-
gene Kooperation mit dem RAS-Signalweg gezeigt
werden konnte (Serrano 2000; Sherr u. Weber 2000).

2.2.4 Einfluss chromosomaler Translokationen und von Fusionsgenen auf Zellzyklus und Apoptose

Chromosomale Translokationen können zur deregulierten Aktivierung von Genen führen, die Apoptose hemmen und Zellwachstum stimulieren. Einige wenige dieser Fusionsgene konnten mittlerweile charakterisiert werden, wie z.B. das *bcr-abl*-Fusionsgen bei der CML (Sawyers 1997) und Sonderformen der ALL (s. oben) oder Translokationen die zur konstitutiven Expression von *bcl-2*, *c-myc*, *cIAP2* usw.

führen. Die t(14;18)-Translokation (Tsujimoto et al. 1984), die in B-Zell-Lymphomen nachgewiesen werden kann und zur deregulierten Expression von *bcl-2* führt, wurde bereits in den vorangegangenen Textabschnitten erläutert. Gleiches gilt für die t(8;14)-Translokation (Hecht u. Aster 2000), die zur Deregulation von *c-myc* und somit der deregulierten S-Phase-Progression und Proliferation in Burkitt-Lymphomen beiträgt. Mantelzonenlymphome zeichnen sich durch die deregulierte Expression von Cyclin D1 infolge der t(11;14)-Translokation aus (Vandenberghe et al. 1991).

Ein hemmender Einfluss auf Zelltodsignalwege konnte für TEL-AML1 (Rubnitz et al. 1999), die häufigste Translokation in kindlichen akuten Leukämien, und andere, die PBX- oder MLL (mixed lineage leukemia)-Gene (Harrison 2001) betreffenden Translokationen bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden. Für einige andere chromosomalen Translokationen und die hierdurch in Leukämien deregulierten Genprodukte konnte aber ein hemmender Einfluss auf Zelltodsignalwege gezeigt werden. Die häufigsten Translokationsprodukte bei Leukämien sind bei der ALL das *bcr-abl*-Fusionsgen (Harrison 2001), bzw. MLL-AF4, E2A-HLF und PML-RXR/PZLF-Fusionsgene bei der AML, die alle mit Apoptoseresistenz und somit häufig auch mit einer schlechteren Prognose und Therapieresistenz assoziiert sind (Hayashi 2000). Im Gegensatz zu einigen Lymphomtypen oder der CML, bei denen bestimmte Translokationen nahezu pathognomonisch sind, zeigen akute Leukämien jedoch eine hohe Variabilität der beobachteten zytogenetischen Variationen.

2.2.4.1 MLL-AF4

Akute lymphatische Leukämien mit der t(4;11)-Translokation und Expression des resultierenden Fusionsgenprodukts des MLL- und des AF4-Gens zeichnen sich neben den hohen Leukozytenzahlen durch einen ausgeprägten extramedullären Befall multipler innerer Organe aus. Während die Proliferationsrate und die Verdopplungszeit von MLL-AF4-positiven Leukämien keinen signifikanten Unterschied zu MLL-AF4-negativen B-Zell-Leukämien aufweisen, ist dagegen eine erhöhte Apoptoseresistenz nach Wachstumsfaktorentzug nachweisbar (Kersey et al. 1998). Dies könnte die Ursache für das extramedulläre Verteilungsmuster der Leukämiezellen sein, da diese auch unter ungünstigen Mikromilieubedingungen zu überleben vermögen. Die Apoptoseresistenz könnte die schlechte Prognose dieser Leukämien erklären. Der molekulare

Mechanismus der Apoptosehemmung ist jedoch noch unklar.

2.2.4.2 E2A-HLF

Das E2A-Gen, das einen basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-Transkriptionsfaktor auf Chromosom 19 kodiert, ist an 2 in B-Linien-Leukämien beobachteten chromosomalen Translokationen beteiligt:

- t(1;19)(q23;p13) und
- t(17;19)(p22;q13).

Bei der t(1;19)(q23;p13)-Translokation wird die C-terminale Region des E2A-Gens, inklusive der bHLH-DNA bindenden und Dimerisierungsdomäne, durch die DNA bindende Domäne des PBX1-Homöoboxgens auf Chromosom 1 ersetzt. Bei der t(17;19)(p22;q13)-Translokation wiederum wird die gleiche Region des E2A-Gens mit der DNA bindenden und Dimerisierungsdomäne des hepatischen Leukämiefaktor (HLF)-Gens auf Chromosom 17 fusioniert, das zur Familie der basischen Leucinezipper (bZIP)-Transkriptionsfaktoren gehört. Hierdurch entstehen neue Fusionsgenprodukte, E2A-PBX1 bzw. E2A-HLF. Die Expression dieser chimären Transkriptionsfaktoren mit veränderten strukturellen und funktionellen Eigenschaften spielt wahrscheinlich in der malignen Transformation dieser Tumorzellen eine wesentliche Rolle. E2A-HLF-transgene Mäuse mit Expression des Fusionsgenprodukts im lymphatischen Zellkompartiment zeigen eine Reifungsstörung der B-Zell-Reihe und eine erhöhte Apoptoserate im Thymus. In einem hohen Prozentsatz entwickeln die transgenen Tiere eine T-ALL. Im Menschen hingegen wird E2A-PBX1 in Prä-B-Zell-Leukämien und E2A-HLF bei Pro-B-Leukämien gefunden.

Wird ein dominant-negativer Inhibitor des E2A-HLF-Fusionsproteins in Leukämiezellen mit t(17;19)-Translokation überexprimiert, sterben diese Leukämiezellen rasch über Apoptose (Inaba et al. 1996). Zudem kann die Überexpression von E2A-HLF sowohl p53-vermittelte als auch über Wachstumsfaktorentzug ausgelöste Apoptose in murinen Pro-B-Lymphozyten hemmen (Altura et al. 1998). E2A-HLF wirkt also weniger über Deregulation des Zellzyklus als über Hemmung von Zelltodsignalwegen. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass die Leucinezipper-DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne von HLF hohe Homologie zur entsprechenden Domäne im Ces-2-Zelltod-Gen von *Cenorhabditis elegans* aufweist (Kersey et al. 1998).

Im Wurm *Cenorhabditis elegans* wurde eine Apoptose stimulierende Funktion von Ces-2 gezeigt (Abb. 2.2.26). Ces-2 hemmt hierbei die Aktivität von Ces-1, das wiederum Apoptose zu hemmen vermag. Ces-2 ist also ein proapoptotisches Gen, das seine Wirkung indirekt, entfaltet, und zwar über Inhibition des antiapoptotischen Ces-1.

Im Gegensatz zu Ces-2 hemmt jedoch E2A-HLF Apoptose. Die Hypothese zum Wirkmechanismus ist daher, dass E2A-HLF ein bisher nicht identifiziertes humanes Ces-2-Homolog kompetitiv verdrängt und hierdurch Ces-1 seine antiapoptotische Wirkung entfalten kann. Als mögliches humanes Ces-1-Homolog wurde kürzlich der Zinkfingertranskriptionsfaktor SLUG identifiziert, der zur SNAIL-Familie gehört (Inukai et al. 1999). Das Drosophilagen SNAIL ist evolutionär konserviert und spielt in *Drosophila* bei der Mesodermentwicklung sowie der Entwicklung von ZNS und Flügeln eine zentrale Rolle. Für die SNAIL- und SLUG-Gene bei Säugern wurde zusätzlich eine Beteiligung bei der Kanzerogenese und Apoptoseregulation beschrieben: SLUG wirkt hierbei als transkriptioneller Repressor und kann durch IL-3-Entzug vermittelte Apoptose muriner Pro-B-Lymphozyten hemmen und ist somit funktionell der Wirkung von Bcl-2 oder Bcl-xL vergleichbar.

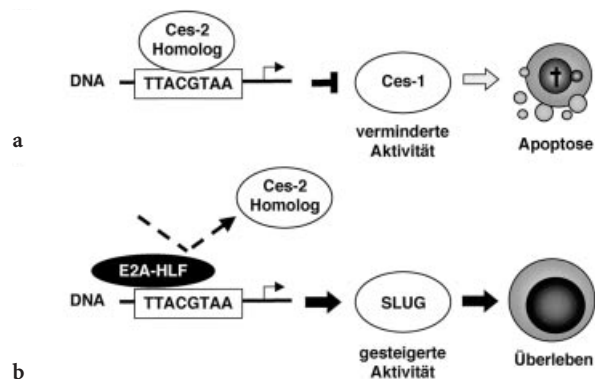


Abb. 2.2.26 a, b. Apoptoseregulation durch E2A-HLF. E2F-HLF wirkt Apoptose hemmend und trägt hierdurch zur Leukämogenese bei. HLF ist ein basischer Leucinezippertranskriptionsfaktor, der zum *Cenorhabditis-elegans*-Apoptosegen Ces-2 homolog ist. a Ces-2 wirkt Apoptose fördernd, indem es den Apoptosehemmer Ces-1 inaktiviert. b Der SNAIL-Transkriptionsfaktor SLUG (ein Zinkfingertranskriptionsfaktor) ist das humane Ces-1-Homolog und vermittelt die Apoptosehemmung von E2A-HLF. Da E2A-HLF Apoptose hemmt, Ces-2 jedoch Apoptose fördert, wirkt E2A-HLF vermutlich, indem es ein Ces-2-Homolog aus der DNA-Bindung verdrängt und hierdurch SLUG aktiviert, das dann den Zelltod hemmen kann

2.2.4.3 AML1 und CBF

Während der Myelopoese, also der Bildung der granulozytären, monozytären und thrombozytären Zellreihen, sind mehrere Familien von Transkriptionsfaktoren aktiv. Hierzu zählen AML1 (CBF α)/CBF β , C/EBP, Ets, c-MYB, HOC und MZF-1 (Lenny et al. 1997). Die meisten dieser Transkriptionsfaktoren sind nicht exklusiv in myeloischen Zellreihen exprimiert, sondern vielmehr ist ihre koordinierte, kooperierende Transkription für die Expression von Genen der myeloischen Zellreihen verantwortlich.

AML1 auf Chromosom 21q22, auch als Core-binding-Faktor 2 (CBF2) oder Polyomavirusenhanerbindungsprotein 2B1 (PEBP-2B1) bezeichnet, ist eines der häufigsten an chromosomalen Translokationen von akuten Leukämien beteiligten Gene und kann durch verschiedene Translokationen dereguliert werden. Das normale AML1-Protein bildet die α -Untereinheit des heterodimeren Transkriptionsfaktors Core-binding-Faktors (CBF). Die β -Untereinheit wird durch das CBF β -Gen auf dem Chromosom 16q22 kodiert. AML-1 ist homolog zum *Drosophilagen runt*, und die verwandten Transkriptionsfaktoren der humanen RUNX-Familie [AML/CBF α /PEBP2 α] sind Schlüsselgene der Myelo- und Osteogenese.

AML1 bindet an und aktiviert die Transkription von Enhancer-core-Motiven der DNA (TGT/cGGT-Sequenzen), die in einer Vielzahl von myeloischen Genpromotoren und lymphatischen Enhancern vorhanden sind, wie z.B. in den Promotoren für den GM-CSF-Rezeptor, M-CSF-Rezeptor, Myeloperoxidase, Neutrophilenelastase, Interleukin-3 und den T-Zell-Rezeptor.

AML1-ETO und TEL-AML1 wandeln die Funktion von AML1 vom transkriptionellen Aktivator zum transkriptionellen Repressor (Guidez u. Zelent 2001). Da in Leukämiezellen meist nur ein Allel von AML1 betroffen ist, könnten diese Fusionsgenprodukte als dominante Inhibitoren von AML1 β wirken. AML1-ETO hemmt auch die transkriptionelle Aktivierung durch AML2 (CBF-3 oder PEBP-2C) und des murinen Homologs von AML3 (mAML3, CBF1 oder PEBP-2A). AML1-ETO ist somit in der Lage, die durch alle Core-binding-Faktoren (CBF) vermittelte Transkription zu reprimieren.

Die t(8;21)(q22;q22)-Translokation ist mit dem M2-Subtyp der FAB-Klassifikation der AML assoziiert und fusioniert die ersten 177 Aminosäuren von AML1 inklusive der DNA bindenden Domäne von AML1 mit ETO (MTG8), einem Gen mit noch unbekannter Funktion mit Homologie zum *Drosophi-*

lagen nerv. Dies ist die zweithäufigste chromosomale Störung bei akuten myeloischen Leukämien (AML). Eine weitere Translokation, t(3;21), ist bei *De-novo*-AML selten und wird häufiger bei sekundärer AML und während der Blastenkrise der chronischen myeloischen Leukämie gefunden. Sie fusioniert die ersten 5–6 Exons von AML1 mit EVI1, EAP bzw. MDS1 auf Chromosom 3q26. Eine 3. Translokation, t(12;21), fusioniert die ersten 333 Aminosäuren von TEL auf Chromosom 12p13, einem Ets-homologen Gen, mit der nahezu kompletten kodierenden Sequenz von AML1 β , dem größten Transkript von AML1. TEL-AML1 β wird bei etwa 30% der pädiatrischen B-Linien-ALL gefunden und ist somit die häufigste Translokation der pädiatrischen ALL. Im Gegensatz zu AML1-ETO enthält TEL-AML1 β den kompletten C-terminalen Anteil von AML1 β , inklusive des Kernlokalisationssignals und der Transaktivierungsdomäne. Häufig ist bei der TEL-AML1-positiven ALL das 2. TEL-Allel inaktiviert, z.B. durch Deletion und, analog zur t(8;21)-Translokation der AML, ist die TEL-AML1-Translokation mit einer besseren Prognose assoziiert. Eine 4. chromosomale Veränderung, inv(16), wird bei der AML des M4Eo-Subtyps der FAB-Klassifikation gefunden. Sie betrifft das AML1-Gen indirekt, indem sie CBF β , den heterologen Dimerisierungspartner von AML1 β , mit dem Myosinschwermkettengen der glatten Muskulatur (MYH11/SMMHC) fusioniert (Guidez u. Zelent 2001).

Wie CBF β -SMMHC zur Leukämogenese beiträgt, ist noch unklar. Allerdings hemmt dieses Fusionsgenprodukt die Induktion von p53 nach strahlen- bzw. chemotherapieinduzierter DNA-Schädigung, während die Apoptoseinduktion durch Wachstumsfaktorentzug nicht beeinflusst wird (Britos-Bray et al. 1998). Die Expression von Bcl-2, Bcl-xL und Bax wird durch CBF β -SMMHC nicht verändert. Die attenuierte p53-Induktion könnte somit an der Leukämogenese und der Therapieresistenz dieses Leukämietyps beteiligt sein.

CCAAT-Enhancer-binding-Protein (C/EBP) ist ein gewebespezifischer Transkriptionsfaktor für proliferierende myelomonozytäre Zellen, aber auch für Leberzellen und differenzierende Adipozyten. Während der Myelopoese ist die Expression von C/EBP zeitlich vorübergehend in myelomonozytären Vorläufern nachweisbar, verschwindet aber während der granulozytären Differenzierung. C/EBP vermittelt eine Aktivierung zellspezifischer Promotoren, wie z.B. von Zytokinrezeptoren, insbesondere der Rezeptoren für GM-CSF, G-CSF und M-CSF, und vermag hierdurch Überlebenssignale zu vermitteln. C/EBP kooperiert hierbei mit ande-

Transkriptionsfaktors gehören zur *rel*-Gen-Familie. B-Zellen sind neben dendritischen Zellen einige der wenigen bekannten normalen Zellen, die NF κ B konstitutiv als biologisch aktiven Transkriptionsfaktor exprimieren. In nahezu allen anderen Zelltypen wird NF κ B nur bei Bedarf aktiviert (Abb. 2.2.27). Die Aktivität von NF κ B ist induzierbar und spielt bei der Aktivierung von Abwehrreaktionen und Entzündungsreaktionen eine zentrale Rolle. Weiterhin reguliert NF κ B proliferationsaktivierende Gene wie *c-myc* und Cyclin D1 (Karin u. Delhase 2000), vermittelt aber auch eine Apoptose hemmende Funktion, die erst in den letzten Jahren in das Zentrum des wissenschaftlichen Interesses rückte: Hohe Aktivität von NF κ B schützt Zellen vor Apoptoseinduktion durch verschiedenste Stimuli wie DNA-Schädigung, Wachstumsfaktorentzug oder auch Signale über Death-Rezeptoren (Perkins 2000). Die Aktivierung von NF κ B wird durch verschiedene Signaltransduktionskaskaden vermittelt, die I κ B(Inhibitor von NF κ B)-Kinasen aktivieren, und zwar IKK α , IKK β und IKK γ , die einen aktiven Komplex bilden (Karin 1999). Dieser IKK-Komplex phosphoryliert den zentralen Schalter, der NF κ B reguliert: I κ B. Die Mitglieder der I κ B-Familie (I κ B α und I κ B β) regulieren streng die Aktivität von NF κ B, da die Dereglulation der NF κ B-Signalwege fatale Folgen haben kann. Zellen, die eigentlich über Apoptose sterben müssten, würden überleben, oder es käme zur deregulierten Produktion inflammatorischer Zytokine. Die Phosphorylierung von I κ B führt zur Ubiquitinylierung des Proteins und zum raschen Abbau über das Proteasom. Dies führt zur Freisetzung von NF κ B aus der inaktiven, an I κ B gebundenen Form und zur Translokation des aktiven heterodimeren Transkriptionsfaktors aus dem Zytoplasma in den Zellkern.

Die IKK-Kinasen werden ebenfalls über Phosphorylierung reguliert, und zwar durch Mitglieder der MAPKKK-Familie (mitogenaktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase) wie NIK (NF κ B induzierende Kinase) und MEKK1. Analog zu anderen Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1 (FOS/JUN), E2F (E2F/Dp1) und MYC (MYC/Max), setzt sich NF κ B aus 2 Untereinheiten zusammen, deren Kombinationen zu unterschiedlichen Affinitäten von Bindungssequenzen in Promotoren der NF κ B Zielgene führt. Dies könnte erklären, warum ein Transkriptionsfaktor eine derartige Vielfalt verschiedener biologischer Wirkungen entfalten kann. Diese Untereinheiten bilden die *rel*-Gen-Familie.

Mittlerweile konnte in vielen Tumorarten eine Aktivierung des NF κ B-Signalwegs nachgewiesen

werden, der an der Therapieresistenz gegen Zytostatika oder Bestrahlung beteiligt zu sein scheint (Rayet u. Gelinas 1999). In einigen Tumoren wie dem Morbus Hodgkin spielt die deregulierte Aktivierung von NF κ B mit hoher Wahrscheinlichkeit sogar eine auslösende, pathogenetische Rolle (Krappmann et al. 1999). Die Ursachen der NF κ B-Deregulation sind in den meisten Fällen ungeklärt. In einigen Tumoren finden sich aber inaktivierende Mutationen des I κ B-Inhibitors oder aktivierende Mutationen vorgeschalteter Aktivatoren, wie der I κ B-Kinase-Komponenten (Rayet u. Gelinas 1999).

Die Möglichkeit, diesen Signalweg therapeutisch zu beeinflussen, ist in das Zentrum des Interesses gerückt: Glukokortikoide und Azetylsalizylsäure können Entzündungsreaktionen hemmen, indem sie diesen Signalweg inhibieren (Yamamoto u. Gaynor 2001). Die Einführung einer I κ B-Mutante, die nicht mehr phosphoryliert werden kann und hierdurch dominant-negativ den Signalweg und die NF κ B-Aktivierung blockiert (oft als NF κ B-Suppressor bezeichnet) hemmt Überlebenssignale in Tumorzellen und erhöht drastisch die Empfindlichkeit für zytotoxische, apoptoseaktivierende Behandlungen. In malignen B-Zellen genügt in vielen Modellen allein die Hemmung von NF κ B, um Apoptose auszulösen.

Die Mechanismen der Apoptosehemmung durch NF κ B sind ebenso vielfältig wie die Zielgene dieses pleiotropen Transkriptionsfaktors. Hierzu gehören Zytokine und Wachstumsfaktoren, die über auto- oder parakrine Schleifen den Zelltod in Tumorzellen hemmen können (IL-2, IL-6, IL-8, G- und GM-CSF). Andere Gene, die direkt Apoptosesignalwege hemmen können, sind die *bcl-2*-Homologe *bcl-x*, A1 (Bfl-1) und Mitglieder der IAP-Genfamilie (v.a. cIAP-1 und -2, jedoch nicht XIAP). Kürzlich wurde auch berichtet, dass Akt/PKB über Aktivierung von IKK (und den resultierenden Abbau von I κ B) NF κ B aktivieren kann (Madrid et al. 2000). Dies wäre ein weiterer möglicher Mechanismus, über den der PI3- und Akt/PKB-Kinase-Signalweg Zelltod, z.B. durch Chemotherapie oder Bestrahlung, in Tumorzellen hemmen kann.

NF κ B kann jedoch auch proapoptotisch wirken, z.B. verstärkt es in Tumorlinienmodellen Apoptose nach Serumentzug. Weiterhin kann NF κ B den CD95/Fas-Liganden (Kuhnel et al. 2000) sowie die Zellzyklusregulatoren *p53* und *c-myc* (die beide proapoptotisch wirken können) induzieren (Lee et al. 1995; Ryan et al. 2000).

NF κ B ist auch aufgrund seines Bezugs zum Bcl-10-Protein und dessen Rolle bei MALT-Lymphomen (MALT, mucosa associated lymphoid tissue) von In-

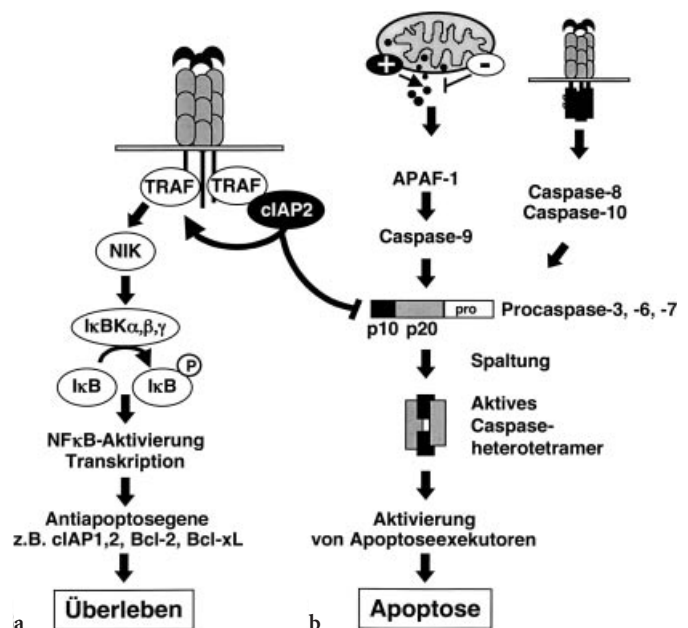
teresse. Bcl-10 ist ein Protein mit CARD-Domäne, das also mit anderen CARD-Proteinen, wie einigen Caspasen, interagieren kann. MALT-Lymphome mit t(1;14)(p22;q32)-Translokation tragen einen Bruchpunkt oberhalb des *bcl-10*-Gens, der das komplette *bcl-10*-Gen unter die Kontrolle des Ig-Schwerkettenenhancers bringt. Infolge dieser genetischen Veränderung überexprimieren diese MALT-Lymphome *bcl-10*. Einige Tumoren zeigten weiterhin verschiedene Mutationen, die zur Trunkierung des Proteins in oder kurz nach der CARD-Domäne führen. Über die CARD-Domäne kann Bcl-10 mit TRAF-Faktoren interagieren und dadurch mit der TNF-Rezeptor-Signaltransduktion interagieren. Die trunkierten Bcl-10-Proteine vermögen dies auch, und für diese Mutanten wurde eine transformierende Wirkung in Rattenfibroblasten gezeigt. Weiterhin kann Bcl-10 über die CARD-Domäne mit der Procaspase-9 interagieren (Abb. 2.2.21). Für andere CARD-Proteine wurde eine dominant-negative, hemmende Wirkung auf das mitochondriale Apoptosom beschrieben, sodass Bcl-10 und die Bcl-10-Mutanten wahrscheinlich auch mit diesem Apoptosignalweg interferieren.

2.2.4.6 Caspasen, Inhibitorproteine und API2/MALT1

Die IAP-Familie (IAP: inhibitor of apoptosis proteins) (Ekert et al. 1999; Clem 2001) entfaltet ihre Wirkung auf mehreren Ebenen: cIAP1, cIAP2,

XIAP, NAIP und Survivin können die Aktivität verschiedener Effektorcaspasen hemmen. Dieser Effekt wird über die BIR-Domänen (baculovirus internal repeats) vermittelt. cIAP1 und cIAP2 verfügen weiterhin über eine Ringfingerdomäne, über die sie mit dem TRAF-Signalkomplex von TNF-Rezeptoren und deren Homologen interagieren können (Abb. 2.2.28). Hierdurch wird die NF κ B-Aktivierung durch diese IAP vermittelt. Das cIAP2-Gen kann durch t(11;18)-Translokation in MALT-Lymphomen mit dem MALT1-Gen-Locus fusioniert und dereguliert exprimiert werden (Dierlamm et al. 1999). Es könnte somit an der Pathogenese der Erkrankung beteiligt sein. Neben der t(1;14)-Translokation ist dies die 2. gehäuft nachweisbare chromosomale Translokation in MALT-Lymphomen. Während die t(1;14)-Translokation das komplette *bcl-10*-Gen unter die Kontrolle des Immunglobulinschwerkettenenhancers bringt und hierdurch überexprimiert (Willis et al. 1999), führt die t(11;18)-Translokation zur Bildung eines Fusionsgenprodukts, API2-MALT1. Kürzlich wurde gezeigt, dass Bcl-10 und MALT1 einen Komplex bilden, der NF κ B-Aktivierung auslöst (Lucas et al. 2001). Gezeigt wurde, dass Bcl-10 die Oligomerisierung und Aktivierung der caspase-ähnlichen Domäne in MALT1 aktiviert. Dies führt zur Aktivierung des IKK-Komplexes, der dann wiederum die NF κ B-Aktivierung vermittelt. Bcl-10 und MALT1 wirken also im gleichen Signalweg, und beide Translokationen führen zu einer deregulierten NF κ B-Aktivierung. Für die API2-

Abb. 2.2.28 a, b. IAP-Proteine und Apoptose. IAP-Proteine (XIAP, cIAP1, cIAP2, Survivin) hemmen Apoptose über verschiedene Mechanismen. Durch IAP können sowohl rezeptor- als auch mitochondrienvermittelte Apoptosewege gehemmt werden. a Aktivierung des NF κ B-Signalwegs über Interaktion mit dem TRAF-Signaltransduktionskomplex und Hemmung der Aktivierung spezifischer Effektor- und Initiatorcaspasen. cIAP2 kann bei MALT-Lymphomen als Fusionsprotein mit MALT1 überexprimiert werden und die Apoptosebereitschaft der B-Lymphomzellen hemmen. b Die Hemmung von Caspaseaktivierung wird über die BIR-Domänen vermittelt. BIR baculoviral internal repeat



MALT1-Translokation konnte mittlerweile auch eine Bedeutung für das Therapieansprechen von Patienten mit MALT-Lymphom gezeigt werden. Die Mehrzahl der Patienten in frühen Stadien zeigt eine Regredienz des Lymphoms, teils bis zur kompletten Remission, nach Eradikation von *Helicobacter pylori* durch Antibiotikabehandlung, also nach Wegfall des antigenen Stimulus für die Lymphomzellen. 20–30% der MALT-Lymphome zeigen jedoch keine derartige Regredienz und sind refraktär für die *Helicobacter-pylori*-Eradikationsbehandlung (Liu et al. 2001). In der Mehrzahl dieser eradikationsresistenten MALT-Lymphome wurde die t(11;18, q21;q21)-Translokation nachgewiesen. Wahrscheinlich ist also die Deregulation des antiapoptotisch wirkenden NF κ B-Signalwegs ursächlich an der Therapieresistenz beteiligt.

Das IAP-Homolog Survivin (Clem 2001) wiederum wird während verschiedener Phasen des Zellzyklus (S, G₂, M) verstärkt exprimiert und interagiert mit dem Kinetochor. Ob dies mit einer antiapoptotischen Funktion von Survivin korreliert oder ob es sich hier um einen regulativen Einfluss auf die Zellproliferation handelt, ist noch weitgehend unklar. Zwar wurde in einigen Veröffentlichungen eine Hemmung von Apoptose und Caspaseaktivierung gezeigt, neuere Daten weisen jedoch eher auf eine Zellzyklus regulierende Funktion von Survivin hin, da Survivin mit dem Zentromerprotein CEN/P interagiert und im Zellzyklus mit Cyclin B1 koexprimiert wird (Li et al. 1999). Eine erhöhte Survivinexpression korreliert mit einer schlechteren Prognose von Tumorerkrankungen, u. a. der AML. Für andere hämatologische Neoplasien konnte ein solcher Einfluss noch nicht dokumentiert werden. Da die Survivinexpression auch über Promotormethylierung reguliert wird, könnte dies die höhere Expression bei dedifferenzierteren, aggressiveren, schneller proliferierenden Malignomen erklären. Nach wie vor ist aber unklar, ob es sich bei Survivin um einen unabhängigen negativen prognostischen Faktor handelt.

2.2.5 Erkrankung mit gesteigerter Apoptose

2.2.5.1 DNA-Reparaturdefektsyndrome

DNA-Reparaturdefektsyndrome sind Paradebeispiele für Erkrankungen mit erhöhter Apoptoserate, die aber dennoch genetisch zu malignen Tumoren disponieren (Zhou u. Elledge 2000). Infolge

Genetische Instabilität



Abb. 2.2.29. Genetische Instabilität, erhöhte Apoptoserate und Tumorgenese. Schematische Darstellung, wie genetische Instabilität zu erhöhter Proliferation, Apoptose und sekundären genetischen Schäden führt, die maligne Entartung begünstigen

der genetischen Instabilität gehen nach DNA-Schädigung bzw. Zellnachbildung zur Gewebeerneuerung viele Tochterzellen über die Aktivierung von Apoptosesignalen zugrunde. Um dennoch Gewebehomöostase zu erzielen, wird die Nachbildung der untergegangenen Zellen stimuliert. Durch vermehrte Zellteilung im betroffenen Gewebe versucht der Organismus, den verstärkten Zelluntergang zu kompensieren. Mutierte Zellen können überleben, wenn sie keine letalen Schäden erlitten haben. Solche Zellen vermögen weitere sekundäre genetische Schäden zu akkumulieren und tragen ein erhöhtes Risiko, durch Inaktivierung von Zellzykluscheckpunkten und Zelltodsignalwegen maligne zu entarten (Abb. 2.2.29). Weiterhin kann dieser Mechanismus, analog zum myelodysplastischen Syndrom (s. Abschnitt 2.2.5.2 „Myelodysplastisches Syndrom“), in der ungenügenden Erneuerung von Geweben resultieren, im Extremfall auch in vorzeitiger Alterung, u. U. des gesamten Organismus, mit resultierender Progerie wie beim Werner- oder dem Bloom-Syndrom, bei denen die Aktivität der ReQ-Helikasen WRN bzw. BLM gestört ist (Dyer u. Sinclair 1998; Frei u. Gasser 2000). Weitere Beispiele für gestörte DNA-Reparatur, erhöhte Apoptoserate und genetische Veranlagung zur Tumorentwicklung sind: Fanconi-Anämie, Xeroderma pigmentosum, Ataxia teleangiectatica, Nijmegen-breakage-Syndrom, aber auch Mismatch-Reparatursyndrome (Hoeijmakers 2001).

2.2.5.2 Myelodysplastisches Syndrom

Im Gegensatz zur Störung von Zelltodsignalwegen, wie sie bei der Entstehung von Leukämien beobachtet wird, ist das myelodysplastische Syndrom (MDS) durch einen initialen Überschuss von Apoptose in Vorläuferzellen im Knochenmark geprägt (Abb. 2.2.30) (Parker u. Mufti 2001). MDS ist keine einheitliche Erkrankung, ist aber durch Zytopenie der roten, der myelogranulozytären und der thrombozytären Zellelemente im peripheren Blut gekennzeichnet. Gleichzeitig wird im Knochenmark eine erhöhte Zellzahl von Vorläuferzellen beobachtet, die aber durch eine erhöhte Apoptoserate nicht ausreifen und auch nicht in die Peripherie gelangen. Ein weiteres Merkmal dieser Erkrankung ist die maligne Transformation in akute myeloische Leukämien, sodass es sich beim MDS folglich um eine Präkanzerose handelt. Eine erhöhte Apoptoserate wird v. a. bei den frühen MDS-Stadien beobachtet (Abb. 2.2.30):

- refraktäre Anämie (RA),
- RA mit Ringsideroblasten (RARS; erhöhte Eisenablagerung infolge des gesteigerten Untergangs roter Vorläuferzellen),
- RA mit erhöhter Blastenzahl (RAEB; RA mit weniger als 10% Blasten).

Eine Reihe von Berichten beschrieb eine erhöhte Expression von proapoptotischen Faktoren wie CD95/Fas-Ligand und -Rezeptor (Kitagawa et al. 1998), Wildtyp-p53 (Kurotaki et al. 2000) und *c-myc* (Rajapaksa et al. 1996) in Knochenmarkszellen von Patienten mit MDS. Dies geht mit einer erhöhten Caspaseaktivität und Zelltod einher. Die hohe spontane Apoptoserate nimmt jedoch bei „fortgeschrittenem“ MDS-Stadium ab [RAEB in Transformation (RAEB-t)]. Dem entspricht eine Abnahme der proapoptotischen Faktoren und eine zunehmende Expression von Bcl-2 (Abb. 2.2.30). Eine erhöhte Apoptoresistenz spielt also wahrscheinlich bei der malignen Progression zur akuten myeloischen Leukämie eine entscheidende Rolle. Ein weiterer Schritt bei der MDS-Progression zur AML ist die Verkürzung der Telomere, die wahrscheinlich an der Entstehung der genetischen Instabilität beteiligt ist. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die Telomerverkürzung mit fortgeschrittenem MDS, zytogenetischen Veränderungen, erhöhter Zahl von Blasten und leukämischer Transformation verbunden ist. Weiterhin wird im Rahmen der Progression zur AML die Inaktivierung des CDKI $p15^{INK4b}$ beobachtet, zumeist durch verstärkte Methylierung des Pro-

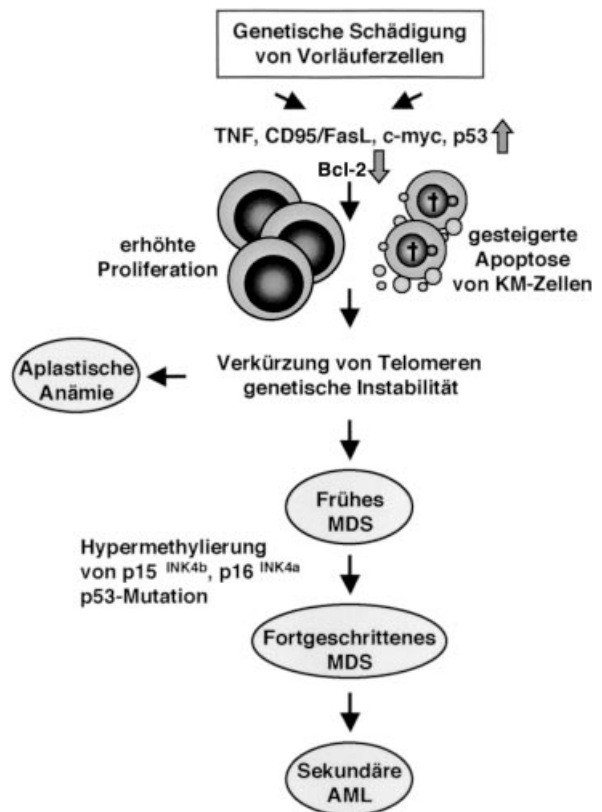


Abb. 2.2.30. Apoptose und myelodysplastisches Syndrom (MDS). Das myelodysplastische Syndrom ist eine Präkanzerose, die durch Störung von Zelltodsignalwegen in einem hyperplastischen Knochenmark gekennzeichnet ist. Das MDS ist durch Reifungsstörung von Knochenmarkszellen mit stark erhöhter Apoptoserate bei gleichzeitig gesteigerter Proliferation der Vorläuferzellen gekennzeichnet. Dies erklärt die periphere Zytopenie (Anämie, Leuko- und Thrombozytopenie) bei gleichzeitig hyperproliferativem Knochenmark. Während der malignen Progression zur manifesten akuten myeloischen Leukämie werden multiple Apoptosekontrollmechanismen und Zellzykluscheckpunkte inaktiviert. Es kommt zur Herunterregulation von CD95/Fas, *c-myc*, Hochregulation von Wildtyp-p53 und Verlust von negativen Zellzyklusregulatoren, wie z. B. dem CDKI $p15^{INK4b}$, sowie zu Telomerverkürzung und zunehmender genetischer Instabilität

motors und nicht durch Deletion der entsprechenden chromosomalen Region (Teofili et al. 2001). Die Inaktivierung von p53 durch Mutation ist dagegen, wie bei der primären AML auch, ein seltenes Ereignis. Die Inaktivierung von vor- und nachgeschalteten Effektoren wie $p14^{ARF}$, $p16^{INK4a}$ bzw. Bax trägt ebenso zur Krankheitspathogenese und zur schlechten Prognose bei.

Diese sekundären, aus einem MDS hervorgegangenen AML-Formen zeichnen sich zudem durch komplexe chromosomale Aberrationen aus, die sie von der primären AML unterscheiden. Da dieser

AML-Form primär ein MDS vorausgeht, wurde der Begriff der sekundären AML geprägt. Patienten mit sekundärer AML zeigen, wahrscheinlich infolge der komplexen genetischen Veränderungen und der hieraus resultierenden Apoptoseresistenz, ein extrem schlechtes Therapieansprechen und eine entsprechend schlechte klinische Prognose.

2.2.5.3 Virale und bakterielle Infektionen, Toxine und Entzündung

Neben MDS und DNA-Reparaturdefektsyndromen ist eine Vielzahl weiterer Erkrankungen durch erhöhte Apoptosebereitschaft gekennzeichnet. Hierzu zählen auch Erkrankungen infolge bakterieller und viraler Infektionen.

Ein Paradebeispiel hierfür ist das humane Immundefizienzvirus (HIV), das T-Zellen sowohl über das Tat- als auch das gp120-Protein für physiologische Apoptosestimuli sensibilisiert (Westendorp et al. 1995). Vergleichbare Effekte wurden auch für das HTLV-1-Virus-Tax-Protein beschrieben, das ursächlich an der malignen Transformation von T-Zellen und der Entstehung von adulten T-Zell-Leukämien in Endemiegebieten des HTLV-1-Virus, wie z.B. Jamaika und Japan, beteiligt ist. Neben seiner deregulierenden Funktion auf z.B. den NF κ B-Signalweg, sensibilisiert Tax, wie auch HIV-Tat, T-Lymphozyten für den aktivierungsinduzierten Zelltod (activation-induced cell death, AICD) (Chlichlia et al. 1995). Ob dies für die Krankheitspathogenese oder das Therapieansprechen relevant ist, ist allerdings noch unklar. Neben HIV und HTLV-1 beeinflusst eine Vielzahl weiterer Viren spezifische Zelltodsignalwege, um durch Hemmung von Apoptosesignalen die Virusreplikation zu erleichtern (s. Abschnitt 2.2.3.6 „Störung von Zelltod- und Überlebenssignalen in Tumoren“, Unterabschnitt „Virale Zellzyklusaktivatoren und Apoptosehemmer in Tumoren“).

Bakterielle Infektionen dagegen aktivieren Apoptosesignale häufig über bakterielle Toxine, die zum Gewebeuntergang und einer besseren Ausbreitung der Erreger im Gewebe führen. Durch diese Mechanismen und Entzündungsreaktionen, v.a. bei chronischen Infektionen und dem resultierenden Zelluntergang, kommt es, analog zur Situation bei den DNA-Reparaturdefektsyndromen, zur gesteigerten, anhaltenden Zellnachbildung und einem erhöhten Entartungsrisiko. Chronische Infektionen der Magenschleimhaut mit *Helicobacter pylori* und die resultierende Entzündungsreaktion mit anhaltender antigener Stimulation begünstigen

über diesen Weg die Entwicklung von MALT (mucosa associated lymphoid tissue)-B-Zell-Lymphomen (Isaacson 1999). In frühen Stadien kann diese lymphoproliferative Erkrankung durch Eradikation der Infektion und Elimination des antigenen Stimulus mittels Antibiotika geheilt werden. Ist es durch Fortschreiten der Erkrankung zur Akkumulation sekundärer genetischer Schäden, wie z.B. der API2-MLT-Translokation und zur Krankheitsprogression gekommen, genügt der Entzug des Proliferationsstimulus nicht mehr, um die Erkrankung zu kontrollieren.

2.2.6 Therapieinduzierte Apoptose, Therapieresistenz von Tumorzellen und neue Therapieansätze

Nahezu alle nicht chirurgischen Tumorthapien basieren auf dem Prinzip, Zellzyklusarrest, Seneszenz und Apoptose in Tumorzellen auszulösen. Hieraus wird verständlich, dass die Inaktivierung zentraler Regulatoren dieser Signalwege mit Therapieresistenz verbunden ist. Jeder der erwähnten Signalwege kann zur Resistenzentstehung beitragen, und die Defekte können auf jeder Ebene der Signalwege auftreten (Daniel et al. 2002).

Von besonderer Bedeutung für Therapieresistenz sind nach heutigem Erkenntnisstand die folgenden Punkte:

1. Störung von Zelltodsignalwegen
Diese können durch den Funktionsverlust Zelltod fördernder Gene oder die Überaktivität Zelltod hemmender Signale entstehen.
2. Überaktivität von DNA-Reparaturmechanismen
3. verstärkte Entgiftung zytotoxischer Substanzen, z.B. durch Überexpression von entgiftenden Pumpenproteinen und metabolischer Entgiftungsstoffwechselwege wie z.B. Glutathionkonjugation.

Die Wertigkeit der einzelnen Signaldefekte ist derzeit Gegenstand intensiver Diskussionen.

Wie eine Vielzahl zellbiologischer Untersuchungen *in vitro* und im Tiermodell zeigte, ist die Deregulation von Todesrezeptoren und deren Liganden allerdings kein wesentlicher Faktor beim zytostatikainduzierten Zelltod und der Entstehung von Therapieresistenz. So sterben Zellen, in denen rezeptorvermittelte Apoptosesignale mit Hilfe dominant-negativer Signalproteine blockiert wurden (z.B. dominant-negativem FADD), nach Gabe ver-

schiedenster Zytostatika oder Bestrahlung in vergleichbarem Ausmaß wie Wildtypzellen (Wieder et al. 2001).

Von zentraler Bedeutung für die Entstehung von Therapieresistenz ist aber die Inaktivierung des p53-Signalwegs und der vor- und nachgeschalteten Regulatoren, also insbesondere von DNA-Reparatur, Zellzykluscheckpunktregulatoren und der nachgeschalteten Apoptosesignalkaskaden (Schmitt et al. 1999; Sturm et al. 1999, 2001; Gronbaek et al. 2000; Prokop et al. 2000; Sherr u. Weber 2000; Bosanquet et al. 2002; Daniel et al. 2002; Radetzki et al. 2002).

Ziel gegenwärtiger neuer Therapieansätze ist daher, diese Resistenzmechanismen gezielt zu durchbrechen bzw. zu umgehen. Die genaue Kenntnis der molekularen Grundlagen liefert hierzu neue, Erfolg versprechende Ansätze. In einigen dieser Situationen haben solche Erkenntnisse zur Entwicklung bereits klinisch erfolgreicher, spezifischer Strategien geführt, um den resistenten Phänotyp aufzuheben oder zu umgehen.

Einer der am intensivsten untersuchten Ansätze ist die Hemmung des ATP-abhängigen ABC-Transporters P-Glykoprotein (Mdr-1), einer der oben genannten entgiftenden Pumpen, die Zytostatika aus normalen und malignen Zellen entfernen und hierdurch entgiften. Da Tumorzellen häufig solche Pumpenproteine überexprimieren, kann in einzelnen Modellsystemen *in vitro* und im Tiermodell Zytostatikaresistenz durch pharmakologische Hemmung der Mdr-1 oder anderer ABC-Transporter-Pumpen erfolgreich durchbrochen werden (Tan et al. 2000). Die mit Hemmern dieser Pumpe durchgeführten klinischen Studien sind jedoch ernüchternd: Da Mdr-1 auch auf normalen hämatopoetischen Zellen exprimiert ist, wird auch eine Verstärkung der Toxizität für normale Gewebe, u. a. der Hämatopoese, beobachtet.

Ein besonders gutes Beispiel für den Erfolg einer solchen gezielten molekularen Behandlungsstrategie ist aber die Hemmung der Abl-Kinase durch den Tyrosinkinaseinhibitor STI-571 (Imatinib) im Fall der chronischen myeloischen Leukämie (CML) und der *bcr-abl*-positiven akuten lymphatischen Leukämie (ALL) (Mauro u. Druker 2001). Hierdurch werden Proliferations- und Überlebenssignale, z. B. über den RAS-Signalweg und die Akt-Kinase (s. oben), spezifisch abgeschaltet (Fang et al. 2000). Die malignen Zellen werden im Wachstum gebremst, sterben spontan oder werden für weitere zytotoxische Therapien empfindlicher. Ähnliche Effekte konnten mittlerweile auch für Hemmer des RAS-Signalwegs wie z. B. Farnesyl-

transferaseinhibitoren gezeigt werden (Beaupre u. Kurzrock 1999). Allerdings sind auch beim Einsatz dieser Substanzen Resistenzentwicklungen beobachtet worden.

Andere Ansätze zielen darauf, Signaldefekte in Tumoren, z. B. bei der Zellzyklusregulation, spezifisch zu attackieren und hierdurch normale Zellen vor zytotoxischen Nebenwirkungen zu schützen. Ein Beispiel hierfür ist der Einsatz von Hemmern der cyclinabhängigen Kinasen, z. B. durch den Kinaseinhibitor Flavopiridol. Diese Substanz löst Zellzyklusarrest aus und kann, wie auch STI-571, tumorspezifisch Apoptose auslösen (Senderowicz 2000).

Andere Strategien zielen auf die Entwicklung niedermolekularer pharmakologischer Substanzen, die mit Zelltodsignalwegen interagieren, z. B. mutiertes und hierdurch missgefaltetes p53-Protein in eine funktionelle Form zurückfalten (Foster et al. 1999) oder die Hemmung von p53 durch MDM2 durch Blockade der Bindungstaschen aufheben.

Wieder andere Strategien ziehen auf die Inaktivierung von *bcl-2*, z. B. durch Antisenseoligonukleotide, die aktuell bereits in klinischen Studien evaluiert werden, z. B. bei B-Zell-Lymphomen und dem malignen Melanom (Klasa et al. 2001).

Weitere Therapieansätze wiederum zielen auf die direkte Aktivierung des mitochondrialen Apoptosoms, z. B. durch Substanzen, die an den peripheren Benzodiazepinrezeptor binden und mitochondriale Permeabilitätssteigerung auslösen (Maaser et al. 2001), oder Peptide mit Sequenzhomologie zur BH3-Domäne bzw. niedermolekulare Substanzen, um hierdurch Bax und seine Homologen aus der Bindung an Bcl-2/Bcl-xL zu befreien (Polster et al. 2001).

Vergleichbare Ziele werden auch durch gentherapeutische Ansätze verfolgt, in denen Apoptose fördernde, wie die proapoptotischen Bcl-2-Homologen Bax, Bak und Bik/Nbk (Radetzki et al. 2002), Procaspase-3 (Friedrich et al. 2001) und Zellzyklus hemmende Gene, wie p16, p53 (Daniel et al. 2002), oder p14^{ARF} (Hemmati et al. 2002) mit Hilfe viraler Gentherapievektoren in Tumorzellen eingeschleust werden, um diese im Wachstum zu hemmen bzw. in die Apoptose zu treiben.

Einige dieser Therapiestrategien zeigen bereits Wirksamkeit in klinischen Phase-I/II-Studien, und es darf mit Spannung erwartet werden, wann sich dies in verbesserten Therapiemodalitäten für Tumormpatienten im klinischen Alltag niederschlagen wird.

Für die Entwicklung neuer, selektiver Therapiestrategien von Tumoren ist das genaue Verständnis

der regulatorischen Zusammenhänge zwischen Zellzyklus, Apoptose und DNA-Reparatur Grundvoraussetzung. Durch die Entschlüsselung des humanen Genoms werden sich eine Vielzahl neuer Zusammenhänge ergeben, die auf rascheren Fortschritt nicht nur im Verständnis der funktionellen Zusammenhänge, sondern auch neuer, innovativer Therapien hoffen lassen.

2.2.7 Ausblick

Der Wissensfortschritt der letzten Jahre hat erste tief greifende Einblicke in die komplexen Regelwerke geliefert, die Zellvermehrung, Zellüberleben und genetische Stabilität regulieren. Diese Erkenntnisse haben v.a. eines gelehrt: Die Zusammenhänge sind ungeheuer komplex und werden durch eine Vielzahl, in ihrer Funktion bislang nur ansatzweise erkannter Faktoren reguliert. Durch die Sequenzierung des humanen Genoms wird die Komplexität durch die Identifikation weiterer Regulatoren in der nächsten Zukunft erst einmal weiter erhöht.

Dennoch besteht Grund zum Optimismus: Erste wichtige Regelwerke sind in ihren Grundzügen erkannt. Durch die Sequenzierung weiterer kompletter Genome von z.B. *Cenorhabditis elegans*, Hefen und anderen Organismen und deren funktionelle Analyse in diesen Modellorganismen werden bereits bekannte und auch neue Zusammenhänge und Mechanismen auf den Menschen leichter zu übertragen sein. Gerade die Erkenntnisse aus der Hefegenetik haben wesentlich zum besseren Verständnis der Zellzyklusregulation und DNA-Reparatur humaner Zellen und deren Störung in Tumoren beigetragen.

Dies ist die Basis für einen völlig neuen Forschungszweig: der vergleichenden und der funktionellen Genomik, welche die nun geschätzten etwa 30 000–40 000 Gene des humanen Genoms in das funktionelle Regelwerk der genannten und auch neuer Signalwege bringen wird. Hierdurch wird in den nächsten Jahren ein dramatischer Erkenntnisgewinn einsetzen. Dieser Fortschritt wird uns mit geeigneteren Behandlungsmethoden und Therapiestrategien ausstatten, um gezielt die Signaldefekte in malignen Tumoren bezüglich der Zellzyklus- und Apoptoseregulation zur Therapie dieser Erkrankungen zu nutzen.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe, insbesondere Frau Dr. med. Isrid Sturm, Herrn Dr. rer. nat. Bernhard Gillissen, Herrn Dr. med. Philipp Hemmati und Herrn Priv.-Doz. Dr. rer.-nat. Thomas Wieder für die zahlreichen Verbesserungsvorschläge und die stimulierende Zusammenarbeit.

2.2.8 Literatur

- Abraham RT (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev* 15:2177–2196
- Adams JM, Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281:1322–1326
- Adams PD, Kaelin WG Jr (1996) The cellular effects of E2F overexpression. *Curr Top Microbiol Immunol* 208:79–93
- Adams JM, Huang DC, Puthalakath H et al. (1999) Control of apoptosis in hematopoietic cells by the Bcl-2 family of proteins. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 64:351–358
- Adjei AA (2001) Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 93:1062–1074
- Alessi DR, Cohen P (1998) Mechanism of activation and function of protein kinase B. *Curr Opin Genet Dev* 8:55–62
- Alessi DR, James SR, Downes CP et al. (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr Biol* 7:261–269
- Almasan A, Linke SP, Paulson TG, Huang LC, Wahl GM (1995) Genetic instability as a consequence of inappropriate entry into and progression through S-phase. *Cancer Metastasis Rev* 14:59–73
- Altieri DC, Marchisio PC, Marchisio C (1999) Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab Invest* 79:1327–1333
- Altura RA, Inukai T, Ashmun RA, Zambetti GP, Roussel MF, Look AT (1998) The chimeric E2A-HLF transcription factor abrogates p53-induced apoptosis in myeloid leukemia cells. *Blood* 92:1397–1405
- Amati B, Dalton S, Brooks MW, Littlewood TD, Evan GI, Land H (1992) Transcriptional activation by the human c-Myc oncoprotein in yeast requires interaction with Max. *Nature* 359:423–426
- Amati B, Brooks MW, Levy N, Littlewood TD, Evan GI, Land H (1993a) Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell* 72:233–245
- Amati B, Littlewood TD, Evan GI, Land H (1993b) The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. *EMBO J* 12:5083–5087
- Bai C, Richman R, Elledge SJ (1994) Human cyclin F. *EMBO J* 13:6087–6098
- Banner DW, D'Arcy A, Janes W et al. (1993) Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73:431–445
- Beaupre DM, Kurzrock R (1999) RAS and leukemia: from basic mechanisms to gene-directed therapy. *J Clin Oncol* 17:1071–1079

- Benedict MA, Hu Y, Inohara N, Nunez G (2000) Expression and functional analysis of Apaf-1 isoforms. Extra Wd-40 repeat is required for cytochrome c binding and regulated activation of procaspase-9. *J Biol Chem* 275:8461–8468
- Bergeron L, Yuan J (1998) Sealing one's fate: control of cell death in neurons. *Curr Opin Neurobiol* 8:55–63
- Boddy MN, Furnari B, Mondesert O, Russell P (1998) Replication checkpoint enforced by kinases Cds1 and Chk1. *Science* 280:909–912
- Bordeleau LN, Berinstein L (2000) Molecular diagnostics in follicular non-Hodgkin's lymphoma: a review. *Semin Oncol* 27:42–52
- Bosanquet AG, Sturm I, Wieder T et al. (2002) Bax expression correlates with cellular drug sensitivity to doxorubicin, cyclophosphamide and chlorambucil but not fludarabine, cladribine or corticosteroids in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 16:1035–1044
- Bouillet P, Metcalf D, Huang DC et al. (1999) Proapoptotic Bcl-2 relative Bim required for certain apoptotic responses, leukocyte homeostasis, and to preclude autoimmunity. *Science* 286:1735–1738
- Britos-Bray M, Ramirez M, Cao W et al. (1998) CBF β -SMMHC, expressed in M4eo acute myeloid leukemia, reduces p53 induction and slows apoptosis in hematopoietic cells exposed to DNA-damaging agents. *Blood* 92:4344–4352
- Brondello JM, Boddy MN, Furnari B, Russell P (1999) Basis for the checkpoint signal specificity that regulates Chk1 and Cds1 protein kinases. *Mol Cell Biol* 19:4262–4269
- Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C et al. (1998) Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* 282:1497–1501
- Burns PA, Kemp CJ, Gannon JV, Lane DP, Bremner R, Balmain A (1991) Loss of heterozygosity and mutational alterations of the p53 gene in skin tumours of interspecific hybrid mice. *Oncogene* 6:2363–2369
- Burtelow MA, Roos-Mattjus PM, Rauen M, Babendure JR, Karnitz LM (2001) Reconstitution and molecular analysis of the hRad9-hHus1-hRad1 (9–1-1) DNA damage responsive checkpoint complex. *J Biol Chem* 276:25903–25909
- Cartwright P, Muller H, Wagener C, Holm K, Helin K (1998) E2F-6: a novel member of the E2F family is an inhibitor of E2F-dependent transcription. *Oncogene* 17:611–623
- Caspari T, Carr AM (1999) DNA structure checkpoint pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochimie* 81:173–181
- Catovsky D (1997) The search for genetic clues in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Cell Ther [Suppl]* 1:39:S5–11
- Cerutti L, Simanis V (2000) Controlling the end of the cell cycle. *Curr Opin Genet Dev* 10:65–69
- Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1999) 14-3-3 Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 401:616–620
- Chan TA, Hwang PM, Hermeking H, Kinzler KW, Vogelstein B (2000) Cooperative effects of genes controlling the G(2)/M checkpoint. *Genes Dev* 14:1584–1588
- Chen L, Trujillo K, Ramos W, Sung P, Tomkinson AE (2001) Promotion of Dnl4-catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes. *Mol Cell* 8:1105–1115
- Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ et al. (1997) Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278:1966–1968
- Child ES, Mann DJ (2001) Novel properties of the cyclin encoded by human herpesvirus 8 that facilitate exit from quiescence. *Oncogene* 20:3311–3322
- Chlichlia K, Moldenhauer G, Daniel PT et al. (1995) Immediate effects of reversible HTLV-1 tax function: T-cell activation and apoptosis. *Oncogene* 10:269–277
- Classon M, Dyson N (2001) p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp Cell Res* 264:135–147
- Clem RJ (2001) Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. *Cell Death Differ* 8:137–143
- Coleman TR, Dunphy WG (1994) Cdc2 regulatory factors. *Curr Opin Cell Biol* 6:877–882
- Coller HA, Grandori C, Tamayo P et al. (2000) Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3260–3265
- Colussi C, Fiumicino S, Giuliani A et al. (2001) 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinoma and lymphoma in msh2(–/–) mice. *J Natl Cancer Inst* 93:1534–1540
- Corradini P, Ladetto M, Inghirami G, Boccadoro M, Pileri A (1994) N- and K-ras oncogenes in plasma cell dyscrasias. *Leuk Lymphoma* 15:17–20
- Cory S, Vaux DL, Strasser A, Harris AW, Adams JM (1999) Insights from Bcl-2 and Myc: malignancy involves abrogation of apoptosis as well as sustained proliferation. *Cancer Res* 59:1685s–1692s
- Coutre P le, Tassi E, Varella-Garcia M et al. (2000) Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood* 95:1758–1766
- Crompton M (2000) Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 12:414–419
- Crul M, Klerk GJ de, Beijnen JH, Schellens JH (2001) Ras biochemistry and farnesyl transferase inhibitors: a literature survey. *Anticancer Drugs* 12:163–184
- Daniel PT (2000) Dissecting the pathways to death. *Leukemia* 14:2035–2044
- Daniel PT, Sturm I, Ritschel S et al. (1999) Detection of genomic DNA fragmentation during apoptosis (DNA ladder) and the simultaneous isolation of RNA from low cell numbers. *Anal Biochem* 266:110–115
- Daniel PT, Sturm I, Wieder T, Schulze-Osthoff K (2001) The kiss of death: promises and failures of death receptors and ligands in cancer therapy. *Leukemia* 15:1022–1032
- Daniel PT, Sturm I, Gillissen B (2002) Tumour genotype and response to cytotoxic gene therapy. In: Subramanian G (ed) *Manufacturing of gene therapeutics*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, I:59–98
- Dbaiho GS, Hannun YA (1998) Cytokine response modifier A (CrmA): a strategically deployed viral weapon. *Clin Immunol Immunopathol* 86:134–140
- Desagher S, Osen-Sand A, Nichols A et al. (1999) Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J Cell Biol* 144:891–901
- Deveraux QL, Reed JC (1999) IAP family proteins – suppressors of apoptosis. *Genes Dev* 13:239–252
- Dierlamm J, Baens M, Wlodarska I et al. (1999) The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood* 93:3601–3609

- Djerbi M, Screpanti V, Catrina AI, Bogen B, Biberfeld P, Grandien A (1999) The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *J Exp Med* 190:1025–1032
- Donjerkovic DD, Scott W (2000) Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. *Cell Res* 10:1–16
- Donnellan R, Chetty R (1998) Cyclin D1 and human neoplasia. *Mol Pathol* 51:1–7
- Druker BJ, Lydon NB (2000) Lessons learned from the development of an abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *J Clin Invest* 105:3–7
- Du C, Fang M, Li Y, LiX Wang L (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102:33–42
- Dyer C, Sinclair A (1998) The premature ageing syndromes: insights into the ageing process. *Age Ageing* 27:73–80
- Eiben LJ, Duckett CS (1998) The IAP family of apoptotic regulators. *Results Probl Cell Differ* 24:91–104
- Eischen CM, Weber JD, Roussel MF, Sherr CJ, Cleveland JL (1999) Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev* 13:2658–2669
- Eischen CM, Roussel MF, Korsmeyer SJ, Cleveland JL (2001) Bax loss impairs myc-induced apoptosis and circumvents the selection of p53 mutations during myc-mediated lymphomagenesis. *Mol Cell Biol* 21:7653–7662
- Eisenman RN (2001) Deconstructing myc. *Genes Dev* 15:2023–2030
- Ekert PG, Silke J, Vaux DL (1999) Caspase inhibitors. *Cell Death Differ* 6:1081–1086
- Ekholm SV, Reed SI (2000) Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 12:676–684
- Elledge SJ (1998) Mitotic arrest: Mad2 prevents sleep from waking up the APC. *Science* 279:999–1000
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391:43–50
- Epstein CJ, Motulsky AG (1996) Werner syndrome: entering the helicase era. *Bioessays* 18:1025–1027
- Erlanson M, Landberg G (2001) Prognostic implications of p27 and cyclin E protein contents in malignant lymphomas. *Leuk Lymphoma* 40:461–470
- Evan GI, Vousden KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411:342–348
- Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS et al. (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69:119–128
- Fang G, Kim CN, Perkins CL et al. (2000) CGP57148B (STI-571) induces differentiation and apoptosis and sensitizes Bcr-Abl-positive human leukemia cells to apoptosis due to antileukemic drugs. *Blood* 96:2246–2253
- Farrow SN, White JH, Martinou I et al. (1995) Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature* 374:731–733
- Foster BA, Coffey HA, Morin MJ, Rastinejad F (1999) Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science* 286:2507–2510
- Frei C, Gasser SM (2000) RecQ-like helicases: the DNA replication checkpoint connection. *J Cell Sci* 113:2641–2646
- Friedrich K, Wieder T, Haefen C von et al. (2001) Overexpression of caspase-3 restores sensitivity for drug-induced apoptosis in breast cancer cell lines with acquired drug resistance. *Oncogene* 20:2749–2760
- Fu H, Subramanian RR, Masters SC (2000) 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:617–647
- Funk JO (1999) Cancer cell cycle control. *Anticancer Res* 19:4772–4780
- Gallimore PH, Turnell AS (2001) Adenovirus E1A: remodeling the host cell, a life or death experience. *Oncogene* 20:7824–7835
- Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S et al. (1997) Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and *bcl-2*-gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 90:244–251
- Gellert M, Hesse JE, Hiom K et al. (1999) V(D)J recombination: links to transposition and double-strand break repair. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 64:161–167
- Gillett CE, Barnes DM (1998) Demystified ... cell cycle. *Mol Pathol* 51:310–316
- Goedecke W, Eijpe M, Offenberg HH, Aalderen M van, Heyting C (1999) Mre11 and Ku70 interact in somatic cells, but are differentially expressed in early meiosis. *Nat Genet* 23:194–198
- Grana X, Garriga J, Mayol X (1998) Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. *Oncogene* 17:3365–3383
- Griffiths SD, Clarke AR, Healy LE et al. (1997) Absence of p53 permits propagation of mutant cells following genotoxic damage. *Oncogene* 14:523–531
- Gronbaek K, Nully Brown P de, Moller MB et al. (2000) Concurrent disruption of p16INK4a and the ARF-p53 pathway predicts poor prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 14:1727–1735
- Groth A, Weber JD, Willumsen BM, Sherr CJ, Roussel MF (2000) Oncogenic Ras induces p19ARF and growth arrest in mouse embryo fibroblasts lacking p21Cip1 and p27Kip1 without activating cyclin D-dependent kinases. *J Biol Chem* 275:27.473–27.480
- Guidez F, Zelent A (2001) Role of nuclear receptor corepressors in leukemogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 254:165–185
- Guo A, Salomoni P, Luo J et al. (2000) The function of PML in p53-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 2:730–736
- Gutierrez MI, Cherney B, Hussain A et al. (1999) Bax is frequently compromised in Burkitt's lymphomas with irreversible resistance to Fas-induced apoptosis. *Cancer Res* 59:696–703
- Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC (1993) *bcl-2*-gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 82:1820–1828
- Hannun YA, Luberto C (2000) Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol* 10:73–80
- Harris CA, Johnson EM Jr (2001) Bh3-only bcl-2 family members are coordinately regulated by the jnk pathway and require bax to induce apoptosis in neurons. *J Biol Chem* 276:37 754–37 760
- Harrison CJ (2001) The detection and significance of chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Rev* 15:49–59
- Hay TJ, Meek DW (2000) Multiple sites of in vivo phosphorylation in the MDM 2 oncoprotein cluster within two important functional domains. *FEBS Lett* 478:183–186
- Hayashi Y (2000) The molecular genetics of recurring chromosome abnormalities in acute myeloid leukemia. *Semin Hematol* 37:368–380
- Hecht JL, Aster JC (2000) Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol* 18:3707–3721

- Hemmati PG, Gillissen B, Haefen C von et al. (2002) Adenovirus-mediated overexpression of p14(ARF) induces p53 and Bax-independent apoptosis. *Oncogene* 21:3149–3461
- Hengstschlager M, Braun K, Soucek T, Miloloza A, Hengstschlager-Ottner E (1999) Cyclin-dependent kinases at the G1-S transition of the mammalian cell cycle. *Mutat Res* 436:1–9
- Hickson ID, Davies SL, Li JL et al. (2001) Role of the Bloom's syndrome helicase in maintenance of genome stability. *Biochem Soc Trans* 29:201–204
- Hirano T (2000) Chromosome cohesion, condensation, and separation. *Annu Rev Biochem* 69:115–144
- Hochhaus A, Kreil S, Corbin A et al. (2001) Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy. *Science* 293:2163
- Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366–374
- Honda R, Yasuda H (1999) Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J* 18:22–27
- Hsu SY, Kaipia A, McGee E, Lomeli M, Hsueh AJ (1997) Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:12401–12406
- Hu Y, Ding L, Spencer DM, Nunez G (1998) WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J Biol Chem* 273:33489–33494
- Hunt T (1991) Cyclins and their partners: from a simple idea to complicated reality. *Semin Cell Biol* 2:213–222
- Ichikawa A, Hotta T, Saito H (1993) Mutations of the p53 gene in B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 11:21–25
- Inaba T, Inukai T, Yoshihara T et al. (1996) Reversal of apoptosis by the leukaemia-associated E2A-HLF chimaeric transcription factor. *Nature* 382:541–544
- Inohara N, Ding L, Chen S, Nunez G (1997) Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J* 16:1686–1694
- Inukai T, Inoue A, Kurosawa H et al. (1999) SLUG, a c-myc-related zinc finger transcription factor gene with antiapoptotic activity, is a downstream target of the E2A-HLF oncoprotein. *Mol Cell* 4:343–352
- Irwin MS, Kaelin WG (2001) p53 family update: p73 and p63 develop their own identities. *Cell Growth Differ* 12:337–349
- Isaacson PG (1999) Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Semin Hematol* 36:139–147
- Ivanov EL, Haber JE (1997) DNA repair: RAD alert. *Curr Biol* 7:R492–R495
- Jackson SP (1997) DNA-dependent protein kinase. *Int J Biochem Cell Biol* 29:935–938
- Jackson CE, Puck JM (1999) Autoimmune lymphoproliferative syndrome, a disorder of apoptosis. *Curr Opin Pediatr* 11:521–527
- Jeggo PA (1998) DNA breakage and repair. *Adv Genet* 38:185–218
- Jeggo PA, Jackson SP, Taccioli GE (1996) Identification of the catalytic subunit of DNA dependent protein kinase as the product of the mouse scid gene. *Curr Top Microbiol Immunol* 217:79–89
- Jeggo PA, Carr AM, Lehmann AR (1998) Splitting the ATM: distinct repair and checkpoint defects in ataxia-telangiectasia. *Trends Genet* 14:312–316
- Jiang Y, Woronicz JD, Liu W, Goeddel DV (1999) Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 283:543–546
- Johnson DG, Schneider-Broussard R (1998) Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Front Biosci* 3:d447–448
- Johnson DG, Walker CL (1999) Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:295–312
- Jost CA, Marin MC, Kaelin WG Jr (1997) p73 is a simian p53-related protein that can induce apoptosis. *Nature* 389:191–194
- Jürgensmeier JM, Xie ZH, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC (1998) Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4997–5002
- Kadowaki Y, Fujiwara T, Fukazawa T et al. (1999) Induction of differentiation-dependent apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma by adenovirus-mediated p21sd1 gene transfer. *Clin Cancer Res* 5:4233–4241
- Kaelin WG Jr (1999) Functions of the retinoblastoma protein. *Bioessays* 21:950–958
- Kaghad M, Bonnet H, Yang A et al. (1997) Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90:809–819
- Kannan K, Amariglio N, Rechavi G et al. (2001a) DNA microarrays identification of primary and secondary target genes regulated by p53. *Oncogene* 20:2225–2234
- Kannan K, Kaminski N, Rechavi G, Jakob-Hirsch J, Amariglio N, Givol D (2001b) DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. *Oncogene* 20:3449–3455
- Karin M (1999) How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene* 18:6867–6874
- Karin M, Delhase M (2000) The I κ B kinase (IKK) and NF κ B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin Immunol* 12:85–98
- Kasof GM, Gomes BC (2001) Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J Biol Chem* 276:3238–3246
- Kasten MM, Giordano A (1998) pRb and the cdk in apoptosis and the cell cycle. *Cell Death Differ* 5:132–140
- Kastan MB, Lim DS (2000) The many substrates and functions of ATM. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:179–186
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51:6304–6311
- Katayose Y, Kim M, Rakkar AN, Li Z, Cowan KH, Seth P (1997) Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res* 57:5441–5445
- Kaufmann WK (1995) Cell cycle checkpoints and DNA repair preserve the stability of the human genome. *Cancer Metastasis Rev* 14:31–41
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239–257
- Kersey JH, Wang D, Oberto M (1998) Resistance of t(4;11) (MLL-AF4 fusion gene) leukemias to stress-induced cell death: possible mechanism for extensive extramedullary accumulation of cells and poor prognosis. *Leukemia* 12:1561–1564
- Keyomarsi KT, Herliczek W (1997) The role of cyclin E in cell proliferation, development and cancer. *Prog Cell Cycle Res* 3:171–191

- Kim ST, Lim DS, Canman CE, Kastan MB (1999) Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members. *J Biol Chem* 274:37538–37543
- Kim DR, Park SJ, Oettinger MA (2000) V(D)J recombination: site-specific cleavage and repair. *Mol Cells* 10:367–374
- Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I et al. (1995) Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14:5579–5588
- Kischkel FC, Lawrence DA, Tinel A et al. (2001) Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *J Biol Chem* 276:2–2
- Kitada S, Andersen J, Akar S et al. (1998) Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with in vitro and in vivo chemoresponses. *Blood* 91:3379–3389
- Kitagawa M, Yamaguchi S, Takahashi M, Tanizawa T, Hirokawa K, Kamiyama R (1998) Localization of Fas and Fas ligand in bone marrow cells demonstrating myelodysplasia. *Leukemia* 12:486–492
- Klasa RJ, List AF, Cheson BD (2001) Rational approaches to design of therapeutics targeting molecular markers. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*:443–462
- Kolodner RD, Marsischky GT (1999) Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* 9:89–96
- Krammer PH (2000) CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407:789–795
- Krammer PH, Behrmann I, Daniel P, Dhein J, Debatin KM (1994) Regulation of apoptosis in the immune system. *Curr Opin Immunol* 6:279–289
- Krappmann D, Emmerich F, Kordes U, Scharschmidt E, Dorken B, Scheidereit C (1999) Molecular mechanisms of constitutive NF κ B/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Oncogene* 18:943–953
- Kroemer GJ, Reed C (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6:513–519
- Kuhnel F, Zender L, Paul Y et al. (2000) NF κ B mediates apoptosis through transcriptional activation of Fas (CD95) in adenoviral hepatitis. *J Biol Chem* 275:6421–6427
- Kuntzel H, Schulz A, Ehbrecht IM (1996) Cell cycle control and initiation of DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem* 377:481–487
- Kurotaki H, Tsushima Y, Nagai K, Yagihashi S (2000) Apoptosis, bcl-2 expression and p53 accumulation in myelodysplastic syndrome, myelodysplastic-syndrome-derived acute myelogenous leukemia and de novo acute myelogenous leukemia. *Acta Haematol* 102:115–123
- Larner JM, Lee H, Hamlin JL (1997) S phase damage sensing checkpoints in mammalian cells. *Cancer Surv* 29:25–45
- Lee H, Arsura M, Wu M, Duyao M, Buckler AJ, Sonenshein GE (1995) Role of Rel-related factors in control of *c-myc* gene transcription in receptor-mediated apoptosis of the murine B cell WEHI 231 line. *J Exp Med* 181:1169–1177
- Lenny N, Westendorf JJ, Hiebert SW (1997) Transcriptional regulation during myelopoiesis. *Mol Biol Rep* 24:157–168
- Li AJ, Blow J (2001) The origin of CDK regulation. *Nat Cell Biol* 3:E182–184
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I et al. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91:479–489
- Li F, Ackermann EJ, Bennett CF et al. (1999) Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat Cell Biol* 1:461–466
- Lieber MR, Grawunder U, Wu X, Yaneva M (1997) Tying loose ends: roles of Ku and DNA-dependent protein kinase in the repair of double-strand breaks. *Curr Opin Genet Dev* 7:99–104
- Lim DS, Kim ST, Xu B et al. (2000) ATM phosphorylates p95/nbs1 in an S-phase checkpoint pathway. *Nature* 404:613–617
- Lin AW, Lowe SW (2001) Oncogenic ras activates the ARF-p53 pathway to suppress epithelial cell transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5025–5030
- Liu Q, Guntuku S, Cui XS et al. (2000) Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 14:1448–1459
- Liu H, Ruskon-Forrmestruaux A, Lavergne-Slove A et al. (2001) Resistance of t(11;18) positive gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma to *Helicobacter pylori* eradication therapy. *Lancet* 357:39–40
- Loeb LA, Kunkel TA (1982) Fidelity of DNA synthesis. *Annu Rev Biochem* 51:429–457
- Lowe SW (1995) Cancer therapy and p53. *Curr Opin Oncol* 7:547–553
- Lucas PC, Yonezumi M, Inohara N et al. (2001) Bcl10 and MALT1, independent targets of chromosomal translocation in malt lymphoma, cooperate in a novel NF κ B signaling pathway. *J Biol Chem* 276:19012–19019
- Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998) Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481–490
- Lydall D, Weinert T (1996) From DNA damage to cell cycle arrest and suicide: a budding yeast perspective. *Curr Opin Genet Dev* 6:4–11
- Maaser K, Hopfner M, Jansen A et al. (2001) Specific ligands of the peripheral benzodiazepine receptor induce apoptosis and cell cycle arrest in human colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 85:1771–1780
- Madrid LV, Wang CY, Guttridge DC, Schottelius AJ, Baldwin AS Jr, Mayo MW (2000) Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF κ B. *Mol Cell Biol* 20:1626–1638
- Malumbres M, Pellicer A (1998) RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci* 3:d887–912
- Martinou JC, Green DR (2001) Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:63–67
- Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ (1998) Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. *Science* 282:1893–1897
- Matsuoka S, Rotman G, Ogawa A, Shiloh Y, Tamai K, Elledge SJ (2000) Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10389–10394
- Mauro MJ, Druker BJ (2001) STI571: a gene product-targeted therapy for leukemia. *Curr Oncol Rep* 3:223–227
- McCormick F (2000) Interactions between adenovirus proteins and the p53 pathway: the development of ONYX-015. *Semin Cancer Biol* 10:453–459
- McDonnell TJ, Korsmeyer SJ (1991) Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature* 349:254–256
- McDonnell TJ, Deane N, Platt FM et al. (1989) Bcl-2-immunoglobulin transgenic mice demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell* 57:79–88

- McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ (2001) Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol* 82:15–33
- Meier P, Finch A, Evan G (2000) Apoptosis in development. *Nature* 407:796–801
- Millar JB, Russell P (1992) The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell* 68:407–410
- Moberg KH, Bell DW, Wahrer DC, Haber DA, Hariharan IK (2001) Archipelago regulates Cyclin E levels in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Nature* 413:311–316
- Molinari M (2000) Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Prolif* 33:261–274
- Morgan SE, Kastan MB (1997) p53 and ATM: cell cycle, cell death, and cancer. *Adv Cancer Res* 71:1–25
- Moser BA, Russell P (2000) Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Opin Microbiol* 3:631–636
- Muller H, Helin K (2000) The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochim Biophys Acta* 1470:M1–12
- Muller H, Bracken AP, Vernell R et al. (2001) E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* 15:267–285
- Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC et al. (1996) FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85:817–827
- Nagamura-Inoue T, Tamura T, Ozato K (2001) Transcription factors that regulate growth and differentiation of myeloid cells. *Int Rev Immunol* 20:83–105
- Nagata S (1998) Human autoimmune lymphoproliferative syndrome, a defect in the apoptosis-inducing Fas receptor: a lesson from the mouse model. *J Hum Genet* 43:2–8
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N et al. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403:98–103
- Nakano K, Wousden KH (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell* 7:683–694
- Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV (1999) MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 18:3004–3016
- Nicholson DW (1999) Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6:1028–1042
- Nigg EA (2001) Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:21–32
- Nilsson I, Hoffmann I (2000) Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog Cell Cycle Res* 4:107–114
- O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA et al. (1998) Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *EMBO J* 17:384–395
- Oda E, Ohki R, Murasawa H et al. (2000) Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288:1053–1058
- Ohi R, Gould KL (1999) Regulating the onset of mitosis. *Curr Opin Cell Biol* 11:267–273
- Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74:609–619
- Osada M, Ohba M, Kawahara C et al. (1998) Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53. *Nat Med* 4:839–843
- Pandolfi PP (2001) Oncogenes and tumor suppressors in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Hum Mol Genet* 10:769–775
- Parker JE, Mufti GJ (2001) The role of apoptosis in the pathogenesis of the myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol* 73:416–428
- Peltomaki P (2001) DNA mismatch repair and cancer. *Mutat Res* 488:77–85
- Perez D, White E (1998) E1B 19 K inhibits Fas-mediated apoptosis through FADD-dependent sequestration of FLICE. *J Cell Biol* 141:1255–1266
- Perkins ND (2000) The Rel/NF- κ B family: friend and foe. *Trends Biochem Sci* 25:434–440
- Peters JM (1999) Subunits and substrates of the anaphase-promoting complex. *Exp Cell Res* 248:339–349
- Petrini JH (2000) The Mre11 complex and ATM: collaborating to navigate S phase. *Curr Opin Cell Biol* 12:293–296
- Pinyol M, Cobo F, Bea S et al. (1998) p16(INK4a) gene inactivation by deletions, mutations, and hypermethylation is associated with transformed and aggressive variants of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 91:2977–2984
- Pipas JM, Levine AJ (2001) Role of T antigen interactions with p53 in tumorigenesis. *Semin Cancer Biol* 11:23–30
- Polster BM, Kinnally KW, Fiskum G (2001) BH3 death domain peptide induces cell type-selective mitochondrial outer membrane permeability. *J Biol Chem* 276:37887–37894
- Prokop A, Wieder T, Sturm I et al. (2000) Relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with decrease of Bax/Bcl-2-ratio and loss of spontaneous caspase-3 processing in vivo. *Leukemia* 14:1606–1613
- Putcha GV, Moulder KL, Golden JP et al. (2001) Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member, is critical for neuronal apoptosis. *Neuron* 29:615–628
- Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A (1999) The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 3:287–296
- Puthalakath H, Villunger A, O'Reilly LA et al. (2001) Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 293:1829–1832
- Radetzki S, Köhne CH, Haefen C von et al. (2002) The apoptosis promoting Bcl-2 homologues Bak and Nbk/Bik overcome drug resistance in Mdr-1-negative and Mdr-1 overexpressing breast cancer cell lines. *Oncogene* 21:227–238
- Raisova M, Bektas M, Wieder T et al. (2000) Resistance to CD95/Fas-induced and ceramide-mediated apoptosis of human melanoma cells is caused by a defective mitochondrial cytochrome c release. *FEBS Lett* 473:27–32
- Raisova M, Hossini AM, Eberle J et al. (2001) The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. *J Invest Dermatol* 117:333–340
- Rajapaksa R, Ginzton N, Rott LS, Greenberg PL (1996) Altered oncoprotein expression and apoptosis in myelodysplastic syndrome marrow cells. *Blood* 88:4275–4287
- Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y et al. (1997) Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 275:967–969
- Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S et al. (2001) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 276:33869–33874
- Rauen M, Burtelow MA, Dufault VM, Karnitz LM (2000) The human checkpoint protein hRad17 interacts with the PCNA-like proteins hRad1, hHus1, and hRad9. *J Biol Chem* 275:29767–29771

- Rayet B, Gelinas C (1999) Aberrant rel/NF κ B genes and activity in human cancer. *Oncogene* 18:6938–6947
- Rhind N, Russell P (1998) Mitotic DNA damage and replication checkpoints in yeast. *Curr Opin Cell Biol* 10:749–758
- Rhind N, Russell P (2000) Checkpoints: it takes more than time to heal some wounds. *Curr Biol* 10:R908–911
- Rhind N, Russell P (2001) Roles of the mitotic inhibitors Wee1 and Mik1 in the G(2) DNA damage and replication checkpoints. *Mol Cell Biol* 21:1499–1508
- Richter BW, Mir SS, Eiben LJ et al. (2001) Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Mol Cell Biol* 21:4292–4301
- Rodenhuis S (1992) ras and human tumors. *Semin Cancer Biol* 3:241–247
- Roovers KR, Assoian K (2000) Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays* 22:818–826
- Roussel MF (1999) The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene* 18:5311–5317
- Rozenfeld-Granot G, Toren A, Amariglio N, Brok-Simoni F, Rechavi G (2001) Mutation analysis of the FAS and TNFR apoptotic cascade genes in hematological malignancies. *Exp Hematol* 29:228–233
- Rubnitz JE, Pui CH, Downing JR (1999) The role of TEL fusion genes in pediatric leukemias. *Leukemia* 13:6–13
- Russell P (1998) Checkpoints on the road to mitosis. *Trends Biochem Sci* 23:399–402
- Ryan KM, Ernst MK, Rice NR, Vousden KH (2000) Role of NF κ B in p53-mediated programmed cell death. *Nature* 404:892–897
- Sakai A, Thieblemont C, Wellmann A, Jaffe ES, Raffeld M (1998) PTEN gene alterations in lymphoid neoplasms. *Blood* 92:3410–3415
- Samali A, Cai J, Zhivotovsky B, Jones DP, Orrenius S (1999) Presence of a pre-apoptotic complex of pro-caspase-3, Hsp60 and Hsp10 in the mitochondrial fraction of jurkat cells. *EMBO J* 18:2040–2048
- Sanchez Y, Wong C, Thoma RS et al. (1997) Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* 277:1497–1501
- Sandig V, Brand K, Herwig S, Lukas J, Bartek J, Strauss M (1997) Adenovirally transferred p16INK4/CDKN2 and p53 genes cooperate to induce apoptotic tumor cell death. *Nat Med* 3:313–319
- Savill J, Fadok V (2000) Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407:784–788
- Sawyers CL (1997) Signal transduction pathways involved in BCR-ABL transformation. *Baillieres Clin Haematol* 10:223–231
- Scheid MP, Duronio V (1998) Dissociation of cytokine-induced phosphorylation of Bad and activation of PKB/akt: involvement of MEK upstream of Bad phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7439–7444
- Schmitt CA, McCurrach ME, Stanchina E de, Wallace-Brodeur RR, Lowe SW (1999) INK4a/ARF mutations accelerate lymphomagenesis and promote chemoresistance by disabling p53. *Genes Dev* 13:2670–2677
- Schwab M, Tyers M (2001) Cell cycle. Archipelago of destruction. *Nature* 413:268–269
- Senderowicz AM (2000) Small molecule modulators of cyclin-dependent kinases for cancer therapy. *Oncogene* 19:6600–6606
- Serrano M (2000) The INK4a/ARF locus in murine tumorigenesis. *Carcinogenesis* 21:865–869
- Shaul Y (2000) c-Abl: activation and nuclear targets. *Cell Death Differ* 7:10–16
- Sherr CJ, Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G₁-phase progression. *Genes Dev* 13:1501–1512
- Sherr CJ, Weber JD (2000) The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev* 10:94–99
- Shimizu S, Ide T, Yanagida T, Tsujimoto Y (2000a) Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J Biol Chem* 275:12.321–12.325
- Shimizu S, Shinohara Y, Tsujimoto Y (2000b) Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. *Oncogene* 19:4309–4318
- Siebert R, Willers CP, Opalka B (1996) Role of the cyclin-dependent kinase 4 and 6 inhibitor gene family p15, p16, p18 and p19 in leukemia and lymphoma. *Leuk Lymphoma* 23:505–520
- Sigalas I, Calvert AH, Anderson JJ, Neal DE, Lunec J (1996) Alternatively spliced mdm2 transcripts with loss of p53 binding domain sequences: transforming ability and frequent detection in human cancer. *Nat Med* 2:912–917
- Skibbens RV, Hieter P (1998) Kinetochores and the checkpoint mechanism that monitors for defects in the chromosome segregation machinery. *Annu Rev Genet* 32:307–337
- Skowyra D, Craig KL, Tyers M, Elledge SJ, Harper JW (1997) F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 91:209–219
- Smider V, Chu G (1997) The end-joining reaction in V(D)J recombination. *Semin Immunol* 9:189–197
- Smits VA, Medema RH (2001) Checking out the G(2)/M transition. *Biochim Biophys Acta* 1519:1–12
- Soengas MS, Alarcon RM, Yoshida H et al. (1999) Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science* 284:156–159
- Soengas MS, Capodiceci P, Polsky D et al. (2001) Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 409:207–211
- Soussi T, Jonveaux P (1991) p53 gene alterations in human hematological malignancies: a review. *Nouv Rev Fr Hematol* 33:477–480
- Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (1998) Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1:949–957
- Srinivasula SM, Hegde R, Saleh A et al. (2001) A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410:112–116
- Stambolic V, Mak TW, Woodgett JR (1999) Modulation of cellular apoptotic potential: contributions to oncogenesis. *Oncogene* 18:6094–103
- Stern B, Nurse P (1996) A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet* 12:345–350
- Strohmaier H, Spruck CH, Kaiser P, Won KA, Sangfelt O, Reed SI (2001) Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. *Nature* 413:316–322
- Sturm I, Kohne CH, Wolff G et al. (1999) Analysis of the p53/BAX pathway in colorectal cancer: low BAX is a negative prognostic factor in patients with resected liver metastases. *J Clin Oncol* 17:1364–1374

- Sturm I, Papadopoulos S, Hillebrand T et al. (2000) Impaired BAX protein expression in breast cancer: mutational analysis of the BAX and the p53 gene. *Int J Cancer* 87:517–521
- Sturm I, Petrowsky H, Volz R et al. (2001) Analysis of p53/BAX/p16ink4a/CDKN2 in esophageal squamous cell carcinoma: high BAX and p16ink4a/CDKN2 identifies patients with good prognosis. *J Clin Oncol* 19:2272–2281
- Subramanian T, Tarodi B, Chinnadurai G (1995) Functional similarity between adenovirus E1B 19-kDa protein and proteins encoded by Bcl-2 proto-oncogene and Epstein-Barr virus BHRF1 gene. *Curr Top Microbiol Immunol* 199:153–161
- Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S (1993) Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75:1169–1178
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N et al. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441–446
- Suzuki R, Kuroda H, Komatsu H et al. (1999) Selective usage of D-type cyclins in lymphoid malignancies. *Leukemia* 13:1335–1342
- Takizawa CG, Morgan DO (2000) Control of mitosis by changes in the subcellular location of cyclin-B1-Cdk1 and Cdc25C. *Curr Opin Cell Biol* 12:658–665
- Tamrakar S, Rubin E, Ludlow JW (2000) Role of pRB dephosphorylation in cell cycle regulation. *Front Biosci* 5:D121–137
- Tan B, Piwnica-Worms D, Ratner L (2000) Multidrug resistance transporters and modulation. *Curr Opin Oncol* 12:450–458
- Taylor SS, McKeon F (1997) Kinetochores localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell* 89:727–735
- Taylor WR, Stark GR (2001) Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 20:1803–1815
- Teofili L, Martini M, Di Mario A et al. (2001) Expression of p15(ink4b) gene during megakaryocytic differentiation of normal and myelodysplastic hematopoietic progenitors. *Blood* 98:495–497
- Tibbetts RS, Cortez D, Brumbaugh KM et al. (2000) Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev* 14:2989–3002
- Tschan MP, Grob TJ, Peters UR et al. (2000) Enhanced p73 expression during differentiation and complex p73 isoforms in myeloid leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* 277:62–65
- Tschopp J, Martinon F, Hofmann K (1999) Apoptosis: silencing the death receptors. *Curr Biol* 9:R381–R384
- Tsujimoto Y, Shimizu S (2000) VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. *Cell Death Differ* 7:1174–1181
- Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM (1984) Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226:1097–1099
- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM (1985) Involvement of the *bcl-2*-gene in human follicular lymphoma. *Science* 228:1440–1443
- Tzivion G, Avruch J (2001) 14-3-3 Proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem* 276:14141–14144
- Vandenberghe E, De Wolf-Peeters C, van den Oord J et al. (1991) Translocation (11;14): a cytogenetic anomaly associated with B-cell lymphomas of non-follicle centre cell lineage. *J Pathol* 163:13–18
- Vaux DL, Cory S, Adams JM (1988) Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 335:440–442
- Venkitaraman AR (2001) Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. *J Cell Sci* 114:3591–3598
- Vidal A, Koff A (2000) Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 247:1–15
- Vieira HL, Haouzi D, El Hamel C et al. (2000) Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell Death Differ* 7:1146–1154
- Wagener C, Bargou RC, Daniel PT et al. (1996) Induction of the death-promoting gene bax-alpha sensitizes cultured breast-cancer cells to drug-induced apoptosis. *Int J Cancer* 67:138–141
- Waldman T, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1996) Uncoupling of S phase and mitosis induced by anticancer agents in cells lacking p21. *Nature* 381:713–716
- Wang JY (2000) Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene* 19:5643–5650
- Wang K, Yin XM, Chao DT, Millman CL, Korsmeyer SJ (1996) BID: a novel BH3 domain-only death agonist. *Genes Dev* 10:2859–2869
- Wang ZG, Ruggero D, Ronchetti S et al. (1998) PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat Genet* 20:266–272
- Wang H, Liu D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ (2001) Pds1 phosphorylation in response to DNA damage is essential for its DNA damage checkpoint function. *Genes Dev* 15:1361–1372
- Weber JD, Jeffers JR, Rehg JE et al. (2000) p53-independent functions of the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* 14:2358–2365
- Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C et al. (1995) Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 375:497–500
- Whiteside D, McLeod R, Graham G et al. (2002) A homozygous germ-line mutation in the human msh2 gene predisposes to hematological malignancy and multiple café-au-lait spots. *Cancer Res* 62:359–362
- Whitman SP, Archer KJ, Feng L et al. (2001) Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res* 61:7233–7239
- Wieder T, Essmann F, Prokop A et al. (2001) Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. *Blood* 97:1378–1387
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ et al. (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3:673–682
- Willis TG, Jadayel DM, Du MQ et al. (1999) Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell* 96:35–45
- Wind N de, Dekker M, Claij N et al. (1999) HNPCC-like cancer predisposition in mice through simultaneous loss of Msh3 and Msh6 mismatch-repair protein functions. *Nat Genet* 23:359–362

- Winston JT, Koepf DM, Zhu C, Elledge SJ, Harper JW (1999) A family of mammalian F-box proteins. *Curr Biol* 9:1180–1182
- Wu J, Gu L, Wang H, Geacintov NE, Li GM (1999) Mismatch repair processing of carcinogen-DNA adducts triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* 19:8292–8301
- Wyllie AH (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284:555–556
- Wyllie AH, Bellamy CO, Bubbs VJ et al. (1999) Apoptosis and carcinogenesis. *Br J Cancer* 80:34–37
- Yamada KM, Araki M (2001) Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci* 114:2375–2382
- Yamaguchi H, Inokuchi K, Sakuma Y, Dan K (2001) Mutation of the p51/p63 gene is associated with blastic crisis in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 15:1729–1734
- Yamamoto YR, Gaynor B (2001) Therapeutic potential of inhibition of the NF κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 107:135–142
- Yamasaki L (1999) Balancing proliferation and apoptosis in vivo: the Goldilocks theory of E2F/DP action. *Biochim Biophys Acta* 1423:M9–15
- Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ (1995) Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80:285–291
- Yang J, Liu X, Bhalla K et al. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275:1129–1132
- Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchik Oren A (1991) Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352:345–347
- Yu J, Zhang L, Hwang PM, Kinzler KW, Vogelstein B (2001) PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* 7:673–682
- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ (1996) Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not Bcl-X(L). *Cell* 87:619–628
- Zhang H, Richards B, Wilson T et al. (1999) Apoptosis induced by overexpression of hMSH2 or hMLH1. *Cancer Res* 59:3021–3027
- Zhang TD, Chen GQ, Wang ZG, Wang ZY, Chen SJ, Chen Z (2001) Arsenic trioxide, a therapeutic agent for APL. *Oncogene* 20:7146–7153
- Zhong S, Salomoni P, Ronchetti S, Guo A, Ruggero D, Pandolfi PP (2000) Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J Exp Med* 191:631–640
- Zhou BB, Elledge SJ (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408:433–439
- Zhou M, Gu L, Abshire TC et al. (2000) Incidence and prognostic significance of MDM 2 oncoprotein overexpression in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 14:61–67
- Zhu J, Koken MH, Quignon F et al. (1997) Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications for the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3978–3983

3.3 Akute myeloische Leukämien

CHRISTA FONATSCH, ILSE SCHWARZINGER, GERLINDE MITTERBAUER, ULRICH JÄGER,
ROTRAUD WIESER, CHRISTINE MANNHALTER und KLAUS LECHNER

Inhaltsverzeichnis

3.3.1 Einleitung	312	3.3.4.2 Translokationen mit Beteiligung des Retinsäurerezeptors(RARA)-Gens: t(15;17)(q22;q21)	335
3.3.1.1 Definition und Pathogenese	312	3.3.4.3 Translokationen mit Beteiligung des <i>MLL</i> -Gens	337
3.3.1.2 Klassifikation und Prognose	313	3.3.4.4 Resümee	339
3.3.1.3 Therapieüberwachung und minimale Resterkrankung	313	3.3.4.5 Zukunft der molekularen Diagnostik	339
3.3.2 Morphologie und Immunologie der AML . .	315	3.3.5 Therapiestrategien bei akuten myeloischen Leukämien	340
3.3.2.1 Klassifikation	315	3.3.5.1 Einleitung	340
3.3.2.2 Morphologie/Zytochemie	317	3.3.5.2 Remissions-Induktionstherapie	340
3.3.2.3 Immunologie	321	3.3.5.3 Postremissionstherapie (Konsolidierungstherapie)	341
3.3.3 Klassische und molekulare Zytogenetik der akuten myeloischen Leukämien	324	3.3.5.4 Molekulare Remission (MR)	342
3.3.3.1 Einleitung	324	3.3.5.5 Monitoring der MRL bei Patienten in MR .	343
3.3.3.2 Relevanz zytogenetischer Befunde bei der AML	324	3.3.5.6 Rezidivtherapie	343
3.3.3.3 Resümee	333	3.3.5.7 Zukunftsperspektiven	344
3.3.4 Molekulargenetische Befunde bei der AML .	334	3.3.6 Literatur	344
3.4.4.1 Translokationen und Inversionen mit Beteiligung des Core-binding-Faktors (CBF): t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13q22), t(16;16)(p13;q22)	334		

3.3.1 Einleitung

3.3.1.1 Definition und Pathogenese

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine Gruppe von malignen Erkrankungen, die durch das unkontrollierte Wachstum unreifer hämatologischer Vorläuferzellen (Blasten) bei gleichzeitiger Störung ihrer Differenzierungsfähigkeit gekennzeichnet sind. Die akuten myeloischen Leukämien entstehen in hämatopoetischen Stamm- oder Vorläuferzellen durch genetische Veränderungen, die im Lauf des Lebens erworben werden. Einige wenige Erkrankungen konnten auf äußere mutagene Einflüsse wie Benzol, ionisierende Strahlung oder Chemotherapeutika zurückgeführt werden (Rinsky et al. 1987; Jablon u. Kato 1970). Bei der Mehrheit der Patienten lässt sich jedoch keine spezifische kausale Exposition nachweisen. Eine Ausnahme

stellt die Entwicklung einer AML nach Behandlung mit Epipodophyllotoxinen dar. Der Zusammenhang zwischen Therapie und Erkrankung wurde bei Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL), die mit dem Chemotherapeutikum Etoposid behandelt wurden und nach kurzer Zeit an einer sekundären AML erkrankten, eindeutig dokumentiert (Pui et al. 1989). Bei diesen sekundären Leukämien finden sich sehr häufig genetische Veränderungen der chromosomalen Bande 11q23, die das *MLL*-Gen involvieren (Thirman et al. 1993).

Genetische Veränderungen, die eine maligne Transformation induzieren, können unterschiedliche Prozesse wie Zellproliferation, Zelltod (Apoptose) und Zelldifferenzierung betreffen. Die Überexpression von antiapoptotischen Proteinen wie BCL-2 scheint bei der AML keine wesentliche Bedeutung zu haben (Okuda et al. 1998, Klampfer et al. 1996). Bei dieser Erkrankung führen v. a. Defekte in der Differenzierung und Reifung von mye-

loischen Zellen zur malignen Transformation. Durch den defekten Differenzierungs- und Reifungsprozess finden sich bei der AML undifferenzierte oder wenig differenzierte Leukämiezellen, im Gegensatz zu den differenzierten myeloischen Zellen bei der chronisch-myeloischen Leukämie (CML). Der exakte Mechanismus der Blockierung der Differenzierung durch leukämogene Proteine ist noch nicht bekannt. In experimentellen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass Fusionsproteine, wie AML1-ETO, die durch Wachstumsfaktoren induzierte Granulozytendifferenzierung in Zellkulturen blockieren können (Westendorf et al. 1998).

Bei ungefähr 60% aller Erwachsenen mit primärer oder de novo AML werden mittels zytogenetischer Analysen verschiedene klonale numerische und strukturelle Chromosomenaberrationen gefunden (Mrózek et al. 2001). Der leukämische Karyotyp korreliert häufig mit den klinischen Ergebnissen, sodass der zytogenetische Befund ein wichtiger unabhängiger prognostischer Indikator für das Erreichen einer kompletten Remission, die Dauer der ersten kompletten Remission und die Überlebensdauer ist (Bloomfield et al. 1984). Die molekulare Analyse der chromosomalen Bruchpunkte von Translokationen, Inversionen und Deletionen zeigte, dass die involvierten Gene häufig für wichtige Regulatoren der Transkription kodieren (Look 1997). Diese Tatsache unterstützt die Ansicht, dass die AML v.a. durch eine Dysregulation der Transkription entsteht. Die durch die genomischen Rearrangements entstandenen chimären Fusionsgene weisen nur selten eine Verschiebung des Leserasters auf und werden als chimäre Fusionsproteine exprimiert, die strukturelle und funktionelle Domänen von beiden Wildtypproteinen beinhalten. Diese Fusionsproteine tragen durch ihre veränderte Funktion unmittelbar zur Entstehung der AML bei.

3.3.1.2 Klassifikation und Prognose

Die Klassifikation der AML erfolgt derzeit nach dem FAB (French-American-British)-System, das hauptsächlich auf der morphologischen Charakterisierung von Leukämiezellen basiert. Da sich die FAB-Subklassen für die Beurteilung der Prognose und die Abschätzung des Therapieerfolgs als nicht besonders nützlich erwiesen haben, zieht man nun auch zytogenetische und molekularbiologische Veränderungen für die Klassifikation der AML heran. Es ist interessant, dass nur eine einzige FAB-Subklasse, die akute Promyelozytenleukämie (FAB

M3), auf molekularer Ebene einer einzelnen Entität entspricht, die durch einen genetischen Defekt [die t(15;17) oder *PML-RARA*-Translokation] charakterisiert ist. Das Verständnis der molekularen Pathogenese, wie auch die Klassifikation der AML nach molekulargenetischen Kriterien, wurde in den vergangenen Jahren durch Fortschritte bei der Entwicklung zytogenetischer und molekulargenetischer Techniken stark verbessert. Bei etwa 40% der Patienten mit AML werden mittels zytogenetischer Analysen jedoch nur sporadisch und nicht klonal auftretende chromosomale Veränderungen oder überhaupt keine chromosomalen Anomalien gefunden. Bei den Patienten mit normalem Karyotyp könnten in Zukunft neue Techniken möglicherweise dazu beitragen, evtl. vorliegende kryptische Veränderungen zu identifizieren, die mit den bisher verfügbaren Methoden nicht erfasst werden können. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass die Mehrheit der molekulargenetisch definierten Translokationen und Inversionen in eine limitierte Anzahl an intrazellulären Signalwegen einmündet. Diese Beobachtung deutet an, dass individuellen AML-Fällen zwar unterschiedliche genetische Veränderungen zugrunde liegen können, dass jedoch nur eine begrenzte Anzahl von funktionellen Reaktionsabläufen initiiert wird. Eine neue Klassifikation der AML aufgrund der betroffenen funktionellen Reaktionspfade könnte dazu beitragen, homogene Subklassen zu schaffen, die ein vergleichbares Ansprechen auf Therapie zeigen und eine bessere Beurteilung der Prognose erlauben.

3.3.1.3 Therapieüberwachung und minimale Resterkrankung

Zum Zeitpunkt der Diagnose einer akuten Leukämie besteht die Tumormasse aus ungefähr 10^{12} Leukämiezellen (Campana u. Coustan-Smith 1996; Greaves 1997). Durch eine Chemotherapie kann eine komplette Remission erreicht werden, die als eine Reduktion der Leukämiezellen auf weniger als 5% im Knochenmark definiert wird. Das bedeutet, dass Patienten mit morphologischen Remissionen noch bis zu 10^{10} Leukämiezellen in sich tragen könnten (Abb. 3.3.1). Mit den bis vor kurzem verfügbaren Methoden war es nicht möglich, abzuklären, ob Leukämiezellen nach Konsolidierungstherapien komplett verschwinden oder ob sie auf einem bestimmten Niveau stabil bleiben, bzw. ob und wie die Leukämiezellen im Verlauf der Erkrankung unter dem Einfluss von verschiedenen

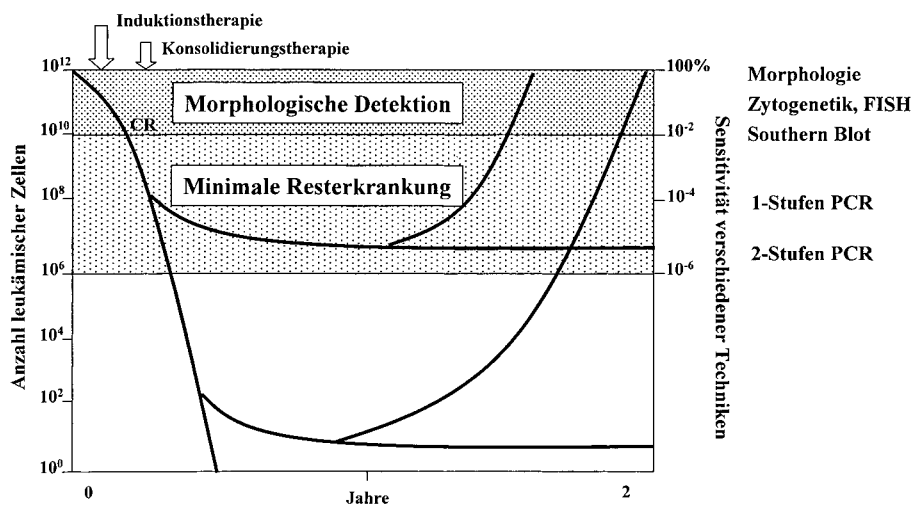


Abb. 3.3.1. Detektion von minimaler Resterkrankung bei leukämischen Erkrankungen. Die geschätzte leukämische Masse zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, des Erreichens

der kompletten morphologischen Remission und der molekularen Remission im Vergleich zur Sensitivität von unterschiedlichen analytischen Methoden

Therapien und immunologischen Faktoren fluktuieren. Durch Methoden, die eine sensitive Detektion und Quantifizierung von leukämischen Zellen erlauben, kann eine Überwachung des Krankheitsverlaufs durchgeführt werden. Erste klinische Studien zeigen, dass die serielle Quantifizierung von residuellen Leukämiezellen die Unterscheidung zwischen Patienten, die in kontinuierlicher kompletter Remission bleiben werden, und Patienten, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit rezidivieren werden, ermöglichen wird.

Zur Erfassung von residuellen Leukämiezellen werden mehrere verschiedene Methoden meist in Kombination angewendet. Diese Methoden beinhalten die traditionelle zytogenetische Analyse und die Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung (FISH) zur Detektion von klonalen Karyotypveränderungen, die Multiparameterdurchflusszytometrie zum Nachweis von aberranten Antigenphänotypen und Methoden zur Detektion von molekulargenetischen Anomalien. Unter den molekularen Methoden ist die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) die derzeit wichtigste Technik, die durch die Amplifikation von DNA-Zielsequenzen (Standard-PCR) die Erfassung von Mutationen, Strukturänderungen und Polymorphismen ermöglicht. Durch eine der PCR vorangehende reverse Transkription (RT-PCR) können auch leukämische Fusionstranskripte und andere leukämieassoziierte mRNA-Sequenzen detektiert und quantifiziert werden. Der größte Vorteil der PCR für die Überwachung des Krankheitsverlaufs ist die hohe Sensitivität (Detektion von leukämischen Zellen, deren

Anteil nur $1/10^4$ – $1/10^6$ der Gesamtpopulation ausmacht). Ein Nachteil der PCR ist die Möglichkeit der Kontamination von negativen Proben mit Material von positiven Proben, die jedoch durch eine strikte Einhaltung von empfohlenen Vorsichtsmaßnahmen (z.B. Raumbtrennung) vermieden werden kann (Kwok u. Higuchi 1989; Lo et al. 1988).

Die exakte Mengenbestimmung der im Ausgangsmaterial vorhandenen DNA- oder mRNA-Moleküle mit einer quantitativen PCR oder RT-PCR ist technisch sehr aufwändig. Eine effiziente reverse Transkription von nicht degradiert, intakter mRNA und eine reproduzierbare, exponentielle Amplifikation der entsprechenden (oft nur selten vorkommenden) Zielsequenzen sind eine wichtige Voraussetzung für derartige Analysen. Neuerdings werden automatisierte PCR-Systeme, die eine schnelle Bearbeitung von sehr vielen Proben erlauben, für den Nachweis von minimaler Resterkrankung eingesetzt. Durch die verbesserte Qualitätskontrolle (durch interne und externe Standards) und Reproduzierbarkeit werden eine bessere Standardisierung zwischen verschiedenen Laboratorien und damit ein direkter Vergleich der Methoden und Resultate ermöglicht.

Tabelle 3.3.1. Charakteristika der therapieassoziierten AML nach Alkylantien- und Topoisomerase-II-Inhibitor-Exposition

	Präleukämische Phase	Latenzzeit	FAB-Typ	Chromosomale Veränderungen
Alkylierende Substanzen, z. B. Melfhalan Chlorambucil Cyclophosphamid Carmustin Procarbacin	MDS	4–6 Jahre	Keine Präferenz	–5/del(5q) –7/del(7q)
Topoisomerase-II-Inhibitoren, z. B. Etoposid Actinomycin D Doxorubicin Mitoxantron	Keine	0,5–3 Jahre	Häufig M4,M5	t(11q23) t(21q22)

AML akute myeloische Leukämie; MDS myelodysplastisches Syndrom; FAB French-American-British classification.

3.3.2 Morphologie und Immunologie der AML

3.3.2.1 Klassifikation

Zur Einteilung der akuten myeloischen Leukämien werden verschiedene Kriterien herangezogen, wie im Folgenden ausgeführt:

Ätiologie

De novo AML. Die de novo AML entwickelt sich aus hämatologischer Gesundheit ohne Hinweis auf eine vorangegangene Exposition gegenüber einer potenziell leukämogenen Noxe.

Sekundäre AML. Die sekundäre AML entwickelt sich sekundär, entweder

- nach vorangegangener Chemo- oder Strahlentherapie (therapieassoziiert) oder
- nach Einwirkung dokumentiert leukämogener Umweltnoxen (z. B. Benzol, organische Lösungsmittel, arsenhaltige Pestizide) oder
- im Anschluss an eine vorbestehende hämatologische Erkrankung (myelodysplastisches Syndrom, Polycythaemia vera, essenzielle Thrombozythämie).

Die relativ große Streubreite der Häufigkeitsangaben in der Literatur über das Vorkommen einer *sekundären* Leukämie (10–30% aller AML) (Leone et al. 1999) signalisiert eine Heterogenität in der Klassifikation. Tatsächlich ist es im Einzelfall oft schwierig, zu entscheiden, inwieweit z. B. die Einwirkung einer potenziell leukämogenen Noxe mit der Entwicklung einer Leukämie in Verbindung zu bringen ist. Eindeutig klar sind bis jetzt nur 2 the-

rapieassoziierte Formen der AML charakterisiert (Tabelle 3.3.1):

1. Die sekundäre AML nach vorangegangener Therapie mit alkylierenden Substanzen tritt mit einer Latenzzeit von 4–6 Jahren, oft nach einem myelodysplastischen Vorstadium, auf und ist durch eine schwere Reifungsstörung der Resthämatopoese sowie durch chromosomale Veränderungen charakterisiert, die v. a. die Chromosomen 5 und 7 betreffen (Levine u. Bloomfield 1992; Smith et al. 1996; s. auch Abschnitt 3.3.3 „Klassische und molekulare Zytogenetik der AML“);
2. Die sekundäre AML nach vorangegangener Chemotherapie mit Topoisomerase-II-Inhibitoren entwickelt sich nach einer Latenzzeit von 0,5–3 Jahren, meist ohne präleukämisches Vorstadium, ist häufig monozytär differenziert und zeigt u. a. genetische Veränderungen, die das *MLL*-Gen in der Chromosomenbande 11q23 betreffen (Pedersen-Bjergaard et al. 1998b; Smith et al. 1996; s. auch Abschnitt 3.3.4 „Molekulargenetische Befunde bei der AML“).

Für andere Chemotherapeutika ist der kausale Zusammenhang mit der Entstehung einer AML nicht so eindeutig feststellbar. Dies begründet sich z. T. dadurch, dass die meisten Antitumorchemotherapieprotokolle Kombinationen verschiedener Chemotherapeutika und/oder eine begleitende Strahlentherapie beinhalten (Pedersen-Bjergaard u. Andersen 1998a). Die leukämogene Potenz ionisierender Strahlung ist seit den Atombombenexplosionen in Hiroshima und Nagasaki bekannt (Kato et al. 1989). Bei der therapeutischen Anwendung ionisierender Strahlung hat sich gezeigt, dass niedrige Strahlendosen, auf große Knochenmarkvolu-

mina appliziert, schwach, hohe Strahlendosen, auf kleine Knochenmarkvolumina appliziert, nicht leukämogen wirken dürften (Levine u. Bloomfield 1992). Eine „Strahlendosis-pro-Knochenmarkvolumen“-Beziehung ist allerdings in der Definition der sekundären AML nach Radiotherapie nicht berücksichtigt, sodass es der individuellen Einschätzung obliegt, ob z.B. eine nach einer lokalen Radiotherapie auftretende AML als sekundär klassifiziert wird oder nicht. Inwieweit akute Leukämien als Zweitmalignome tatsächlich Folgen der Therapie des Erstmalignoms sind oder auf eine individuelle genetische Disposition zurückzuführen sind, muss ebenfalls offen bleiben (Leone et al. 1999). Ein immunsuppressiver Effekt des Erstmalignoms als Prädisposition für die Entstehung eines Zweitmalignoms wird ebenfalls diskutiert (Kampmeier et al. 1994).

Bei etwa 5–10% aller AML lässt sich die Entwicklung aus einem präleukämischen myelodysplastischen Syndrom (MDS) nachweisen (Leone et al. 1999). MDS sind eine Gruppe von malignen hämatologischen Erkrankungen, die klinisch charakterisiert sind durch ihr Auftreten im höheren Lebensalter und durch ihre je nach Subtyp variabel ausgeprägte Tendenz, in eine AML überzugehen (Layton u. Mufti 1986; s. auch Kapitel 3.2 „Myelodysplastische Syndrome“). Hämatologisch sind MDS charakterisiert durch eine periphere Zytopenie bei hyperzellulärem Knochenmark mit ausgeprägten morphologischen Zeichen der Reifungsstörung (Dysplasie) und durch bestimmte chromosomale Veränderungen, die v.a. die Chromosomen 5,7 und 8 betreffen (Heim u. Mitelman 1995). Ähnliche morphologische und zytogenetische Veränderungen findet man auch bei meist älteren Patienten mit anamnestischer *de novo* AML, und es wird postuliert, dass diese *de novo* AML möglicherweise aus einem vorher nicht erkannten MDS hervorgegangen und somit ebenfalls sekundär entstanden sind (Taylor et al. 1995). Es wurde daher vorgeschlagen, derartige AML auch als „MDS-related“ (MDR-AML) zu klassifizieren (Harris et al. 1999).

Blastzellcharakteristika

FAB-Klassifikation (Tabelle 3.3.2). Die FAB(French, American, British)-Klassifikation besteht bereits seit mehr als 20 Jahren, sie wurde seither mehrmals erweitert und bildet noch immer die Grundlage der Leukämiediagnostik (Bennett et al. 1976, 1985a,b, 1991). Nach der FAB-Klassifikation liegt eine AML dann vor, wenn 30% aller kernhaltigen oder nicht erythropoetischen Zellen im Knochen-

Tabelle 3.3.2. Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie nach FAB und WHO

	FAB	WHO
Definition	(% Blasten im KM) ≥30	≥20
Subklassifikation	M0	Minimal differenzierte AML
	M1	AML ohne Ausreifung
	M2	AML mit Ausreifung
	M3	*
	M4	Akute myelomonozytäre Leukämie
	M4Eo	**
	M5a,b	Akute monozytäre Leukämie
	M6	Akute erythrozytäre Leukämie
	M7	Akute megakaryozytäre Leukämie
		<i>AML mit rekurrenten zytogenetischen Anomalien:</i>
		AML mit t(8;21)
		*Akute Promyelozytenleukämie mit t(15;17)
		**AML mit abnormen Eosinophilen und inv(16)
		AML mit 11q23(MLL)-Anomalien
		<i>AML nach MDS</i>
		<i>AML mit Dysplasie der Resthämatopoese</i>
		<i>Therapieassoziierte AML</i>
		Alkylantienassoziiert
		Topoisomerase-II-Inhibitor-assoziiert
		<i>Akute Basophilenleukämie</i>
		<i>Akute Osteomyelofibrose</i>

FAB French American British; WHO World Health Organization; KM Knochenmark; AML akute myeloische Leukämie; MDS myelodysplastisches Syndrom.

mark Blasten sind. Die FAB-Klassifikation beruht in erster Linie auf morphologischen und zytochemischen Blastzellcharakteristika und klassifiziert die einzelnen AML-Subtypen nach ihrer Liniendifferenzierung. Man unterscheidet demnach 8 AML-Subtypen: M0–M3 (myeloisch, 4 unterschiedliche Reifestadien), M4–M5 (monozytär), M6 (erythrozytär) und M7 (megakaryozytär).

MIC-Klassifikation. Die MIC(morphology, immunology and cytogenetics)-Klassifikation der AML wurde erstmals 1988 publiziert und bezieht neben Morphologie und Zytochemie auch immunologische und zytogenetische Aspekte mit ein (Second MIC Cooperative Study Group 1988).

WHO-Klassifikation (Tabelle 3.3.2). Vor kurzem wurde ein WHO(World Health Organization)-Vorschlag zur Neuklassifikation hämatologischer Neo-

plasien publiziert (Harris et al. 1999). Nach diesem Vorschlag soll die Grenze zwischen MDS und AML auf 20% Blasten im Knochenmark herabgesetzt werden. Damit wird verschiedenen Studien Rechnung getragen, die gezeigt haben, dass Patienten mit einem Blastenzellgehalt von 20–30% im Knochenmark eine ähnliche Prognose haben wie Patienten mit einem Blastenzellgehalt von mehr als 30%. Die WHO-Klassifikation behält im Wesentlichen die FAB-Subtypen bei, zusätzlich werden allerdings noch folgende, in den letzten Jahren als eigene Entitäten charakterisierte AML miteinbezogen: AML mit spezifischen Chromosomenveränderungen: t(8;21), t(15;17), inv(16), 11q23-Anomalien; AML nach MDS; AML mit Dysplasie der Resthämatopoese (morphologisch wie MDS-assoziierte AML) und therapieassoziierte AML (nach Alkylantien oder nach Topoisomerase-II-Hemmern).

3.3.2.2 Morphologie/Zytochemie

Für die *morphologische* Begutachtung des Knochenmarks stehen prinzipiell 2 Methoden zur Verfügung:

1. Zytologie

Die Zytologie hat den Vorteil, dass sich morphologische Zelldetails am besten darstellen lassen. Dadurch sind die unterschiedlichen Zellreifungsstadien gut voneinander zu unterscheiden und auch geringe Mengen an unreifen Zellen zu identifizieren. Die Zytologie erlaubt allerdings keine Beurteilung der Knochenmarkarchitektur

und ist für die Beurteilung hypozellulärer Knochenmarkaspirate nicht ausreichend.

2. Histologie

Die Histologie vermittelt einen direkten Einblick in die Knochenmarkstruktur und ist daher für die Erfassung herdförmiger Veränderungen innerhalb der Hämatopoese bzw. die Beurteilung des Knochenmarkstromas geeignet. Für die Erkennung morphologischer Zelldetails bzw. die Auffindung geringer Mengen unreifer Zellen ist die Histologie weniger gut geeignet.

Zytochemische Färbungen sind Spezialfärbungen, die es erlauben, Zellen, die morphologisch nicht eindeutig klassifizierbar sind, aufgrund ihres spezifischen Anfärbeverhaltens näher zu charakterisieren. In der AML-Diagnostik spielen folgende zytochemische Färbungen eine Rolle:

- Myeloperoxidase (MPO), Sudanschwarz: Darstellung der Granula in myeloisch differenzierten Zellen
- α -Naphthylazetatesterase (ANAE): Darstellung monozytenspezifischer Esterase
- Periodic-acid-Schiff (PAS): Darstellung intrazellulären Glykogens in Erythroblasten

Bedeutung von Morphologie bzw. Zytochemie bei der AML

Diagnose

Feststellung, dass eine akute Leukämie vorliegt.

Die Diagnose einer akuten Leukämie wird morphologisch aufgrund des Blastenzellgehalts im Knochenmark gestellt (Abb. 3.3.2). Neben dem Blastenzellgehalt wird die noch vorhandene Resthämatopoese

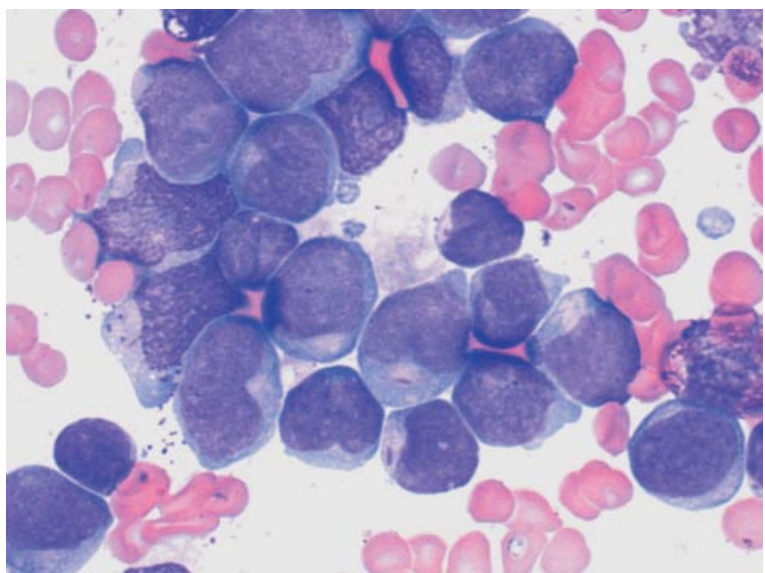


Abb. 3.3.2. Akute myeloische Leukämie: Knochenmark zeigt <30% Blasten, 2 Blasten zeigen je ein Auer-Stäbchen

pese quantifiziert und hinsichtlich etwaiger Dysplasiezeichen beurteilt (Bain 1988). Für die Diagnose einer akuten Leukämie ist die Knochenmarkzytologie zumeist ausreichend, vorausgesetzt, das Aspirat enthält genug Zellen.

Differenzierung zwischen AML und akuter lymphatischer Leukämie (ALL). Etwa 85% aller akuten myeloischen Leukämien können aufgrund morphologischer und zytochemischer Blastzellcharakteristika diagnostiziert werden (Bain 1988). Tabelle 3.3.3 zeigt die wichtigsten morphologischen und zytochemischen Unterscheidungsmerkmale zwischen AML und ALL. Einzig der Nachweis von Auer-Stäbchen (bei etwa 50% aller AML auffindbar) ist für die myeloische Differenzierung eines Blasten beweisend (Abb. 3.3.2), alle übrigen Unterscheidungsmerkmale sind fakultativ. Zytochemisch beweisend für die myeloische Differenzierung einer Blastzellpopulation ist der Nachweis der spezifischen Granula mittels MPO- oder Sudanschwarzfärbung (Bain 1988) (Abb. 3.3.3). Je reifer eine Myeloblastenpopulation ist, umso stärker ist ihr zytochemisches Anfärbeverhalten, während unreife Myeloblasten oft nur eine minimale Reaktivität zeigen.

Subklassifikation nach FAB. Die FAB-Subtypen sind, von wenigen Ausnahmen abgesehen, morphologisch und zytochemisch definiert (Bain 1988). Auch für die FAB-Subklassifikation ist die Knochenmarkzytologie zumeist ausreichend, sofern die Zellularität des Aspirats eine suffiziente Beurteilung erlaubt.

Tabelle 3.3.3. Morphologische und zytochemische Unterscheidungsmerkmale zwischen AML und ALL

Blasten	AML	ALL
Größe	Variabel	Meist klein
Auer-Stäbchen	Beweisend	Keine
Zytoplasma-granula	Häufig	Selten
Zytoplasmasaum	Variabel breit	Eher schmal
Kernchromatin	Feinnetzlig	Feinkörnig-schollig
Nukleolen	Häufig 1 oder mehrere	Selten mehrere
MPO, Sudan-schwarz	Positiv	Negativ
ANAE	Positiv	Negativ
Resthämato-pese	Häufig dysplastisch	Ohne Dysplasie

AML akute myeloische Leukämie; ALL akute lymphatische Leukämie; MPO Myeloperoxydase; ANAE *a*-Naphthylazetatesterase.

- 1. M0 (minimal differenzierte AML)
Die Blasten sind morphologisch nicht von Lymphoblasten zu unterscheiden, zytochemisch sind < 3% der Blasten MPO- oder sudanschwarzpositiv. Dieser Subtyp ist daher morphologisch und zytochemisch nicht als myeloische Leukämie zu klassifizieren, die Diagnose kann nur elektronenmikroskopisch (Darstellung der MPO-Granula) oder immunologisch (Nachweis der Expression von myeloischen Zellantigenen bei gleichzeitiger Abwesenheit lymphatischer Differenzierungsantigene) gestellt werden.

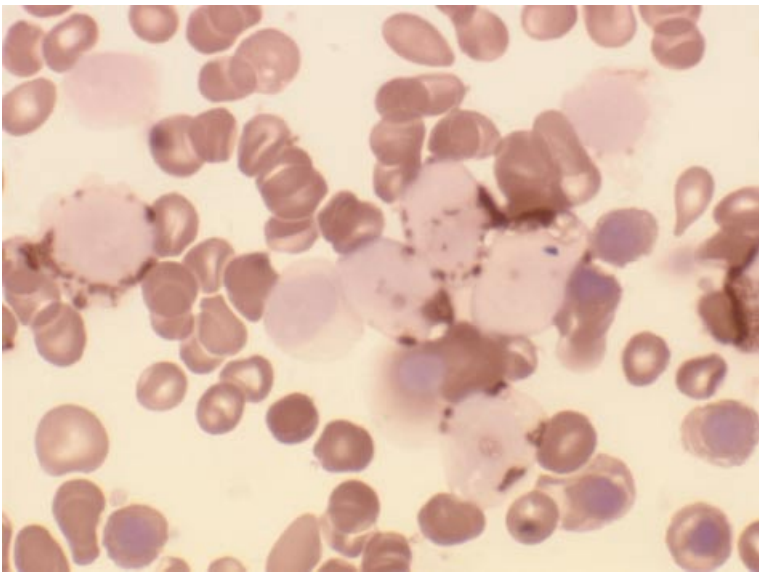


Abb. 3.3.3. Akute myeloische Leukämie. Die Blastellgranula stellen sich in der zytochemischen Myeloperoxydase(MPO)-Färbung positiv dar

2. M1 (Myeloblastenleukämie ohne Ausreifung)
>90% aller nicht erythropoetischen Zellen (NEZ) sind Blasten, nur <10% aller NEZ reifen über das Blastzellstadium hinaus aus; die Blasten können evtl. leicht granuliert sein und Auer-Stäbchen zeigen; ≥3% der Blasten sind MPO- oder sudanswarzpositiv; die monozytäre Komponente beträgt ≤10% der NEZ.
3. M2 (Myeloblastenleukämie mit granulozytärer Ausreifung)
≥30% und <90% der NEZ sind Blasten; diese sind häufig granuliert und zeigen oft Auer-Stäbchen; ≥10% der NEZ reifen über das Blastzellstadium hinaus aus (Promyelozyten bis Granulozyten); die monozytäre Komponente beträgt <20% der NEZ; selten besteht eine begleitende Eosinophilie (M2Eo) oder Basophilie (M2Baso); zytochemisch sind (meist deutlich) mehr als 3% aller Blasten MPO- oder sudanswarzpositiv.
4. M3 (Promyelozytenleukämie)
 - Hypergranuläre (klassische) Form
Die leukämischen Zellen imponieren als extrem abnorme Promyelozyten; sie zeigen einen relativ breiten Zytoplasmasaum, der meist dicht gepackt ist mit groben, rot-violetten Granula; häufig finden sich Auer-Stäbchen, oft mehrere in einer Zelle, typisch ist das Vorkommen so genannter „faggot cells“, die multiple Auer-Stäbchen („wie gebündeltes Reisig“) enthalten; die Zellkerne sind oft auffällig nierenförmig, zweigelaopt oder gefaltet, wegen der starken Granuladichte allerdings auch oft nicht einsehbar; zytochemisch sind die Zellen durchwegs stark MPO- oder sudanswarzpositiv.
 - Mikrogranuläre (variante) Form
Diese seltene Variante hat mit der klassischen Form in erster Linie die charakteristische Kernform gemeinsam; eine starke Zytoplasmagranulierung ist meist nur in wenigen Zellen erkennbar; typisch ist auch bei der mikrogranulären Form das vereinzelte Vorkommen von „faggot cells“, deren Nachweis die Diagnose erleichtert; auch die Zellen der mikrogranulären Variante sind MPO- und sudanswarzpositiv.
5. M4 (myelomonozytäre Leukämie)
Dieser AML-Subtyp zeigt sowohl eine granulozytäre als auch eine monozytäre Differenzierung; die granulozytäre Komponente (Nachweis morphologisch und zytochemisch) muss ≥20% aller NEZ im Knochenmark ausmachen; der Nachweis der monozytären Komponente ist definiert durch:
 - a) morphologisch ≥20% monozytäre Komponente im Knochenmark und monozytäre Komponente im peripheren Blut $\geq 5 \times 10^9/l$ oder
 - b) ≥20% monozytäre Komponente im Knochenmark, konfirmiert durch positive ANAE-Reaktivität oder eine erhöhte Lysozymkonzentration in Serum oder Urin (Lysozym ist ein Produkt maligner Monozyten) oder
 - c) Knochenmarkmorphologie wie M2, aber monozytäre Komponente im Blut $\geq 5 \times 10^9/l$, konfirmiert durch positive ANAE-Reaktivität oder erhöhten Serum- oder Urinlysozymspiegel

M4 mit Eosinophilie (M4Eo): Diese Sonderform ist charakterisiert durch eine begleitende Vermehrung von atypischen Eosinophilen im Knochenmark, die neben eosinophilen Granula auch große basophile Granula zeigen.
6. M5 (Monoblastenleukämie)
≥80% aller NEZ sind monozytär differenziert (Monozyten, Promonozyten, Monoblasten). Die M5 wird weiter unterteilt in *M5a* (akute monoblastische Leukämie) und *M5b* (akute monozytäre Leukämie). Bei der *M5a* sind mindestens 80% aller monozytären Zellen im Knochenmark Monoblasten. Diese sind große Zellen mit breitem, häufig vakuolisiertem, manchmal auch granuliertem Zytoplasmasaum. Die Kernform ist entweder rund/oval oder angedeutet konvolutiert, das Kernchromatin meist sehr feinretikulär. Bei der *M5b* sind weniger als 80% aller monozytären Zellen Blasten.
M4/M5 mit Erythrophagozytose: Diese Sonderform ist morphologisch charakterisiert durch große, monoblastäre Zellen mit multiplen Vakuolen, die Erythrophagozytose zeigen. Zytochemisch sind diese Zellen sowohl myeloisch als auch monozytär differenziert.
7. M6 (Erythroleukämie)
≥50% aller kernhaltigen Knochenmarkszellen sind morphologisch erkennbar erythrozytär differenziert und ≥30% der nicht erythrozytären Knochenmarkszellen sind Blasten. Die erythropoetischen Zellen sind meist deutlich atypisch (mehrkernig, Kernformanomalien, Zytoplasmavakuolen, basophile Tüpfelung, evtl. megaloblastär). Die Blasten der nicht erythrozytären Komponente sind meist typische Myeloblasten und zeigen z.T. Auer-Stäbchen (myeloblastäre Variante). Neben dieser eindeutig definierten Form der M6 gibt es selten akute Leukämien, die morphologisch undifferenziert erscheinen und deren erythrozytäre Differenzierung nur immunologisch bewiesen werden kann (erythroblast-

re Variante). Die Blasten dieser Leukämien zeigen morphologisch meist tief blaue Zytoplasmasäume, z. T. mit „ohrenartigen“ Ausstülpungen, und in der PAS-Färbung ein charakteristisches, großtropfiges Anfärbeverhalten.

8. M7 (Megakaryoblastenleukämie)

Die M7 ist der seltenste FAB-Subtyp, $\geq 30\%$ aller NEZ sind Blasten. Diese sind morphologisch oft polymorph, als Hinweise für megakaryozytäre Differenzierung können sich abnorme, plättchenähnliche Zytoplasmaausstülpungen bzw. -abschnürungen finden. Die M7 geht typischerweise mit einer Knochenmarkfibrose einher, das Knochenmarkspirat ist daher oft zellarm. Die Diagnose wird immunologisch (Nachweis megakaryozytärer Differenzierungsantigene), bei extremer Zellarmut im Aspirat histologisch (Nachweis der Begleitfibrose) gestellt.

Therapie. Der morphologische AML-Subtyp spielt außer für die M3 keine Rolle bei der Wahl der Induktionstherapie. Die AML-M3 stellt insofern eine Ausnahme dar, als die Leukämiezellen durch all-trans-Retinsäure (ATRA) zur Ausreifung gebracht werden können und ATRA daher ein wesentlicher Faktor der Induktionstherapie ist (Chen et al. 1995; Kanamaru et al. 1995).

Verlaufskontrolle

Remissionsstatus. Der Remissionsstatus nach Induktionstherapie bei AML ist für die meisten Leukämien nach wie vor morphologisch definiert. Eine komplette hämatologische Remission (CHR) liegt im Knochenmark dann vor, wenn bei normaler Zellularität der Blastenzellgehalt $< 5\%$ beträgt (Cheson et al. 1990) und Regeneration eintritt.

Minimale Resterkrankung. CHR bedeutet nicht unbedingt komplette Tumorfreiheit, Patienten in CHR können trotz unauffälliger Knochenmarkmorphologie noch eine Tumormasse bis zu 10^{10} Leukämiezellen haben (Campana u. Pui 1995). Um residuale Leukämiezellen als solche erkennen zu können, ist es notwendig, in den wenigen morphologisch erkennbaren Blasten leukämiespezifische Charakteristika wiederzufinden. Die Blastzellmorphologie ist hierfür nicht geeignet. Das einzige morphologische Unterscheidungsmerkmal zwischen „benignen“ und „malignen“ Blasten sind Auer-Stäbchen, die beweisend für Malignität sind (Cheson et al. 1990). Diese Unterscheidungsmöglichkeit ist allerdings kaum von praktischem Interesse, da nur etwa 50% aller AML Auer-Stäbchen zeigen, die Auer-Stäbchen selbst im Vollbild der

Leukämie meist nur in wenigen Blasten nachweisbar sind und daher die Wahrscheinlichkeit, bei einer Blastenzellfrequenz von $< 5\%$ Auer-Stäbchen zu finden, sehr gering ist.

Prognose. Die Blastzellmorphologie ist für die Prognose der AML nur insofern relevant, als bestimmte FAB-Subtypen mit speziellen, prognostisch bedeutsamen Chromosomenveränderungen assoziiert sind. Die FAB-Subtypen M2, M3 und M4Eo sind mit den prognostisch günstigen Anomalien t(8;21), t(15;17) und inv(16) assoziiert. AML mit auffallender Dysplasie der Resthämato-poesie sind häufig mit den prognostisch ungünstigen numerischen und/oder strukturellen Anomalien der Chromosomen 3, 5 und 7 vergesellschaftet (s. Abschnitt 3.3.3 „Klassische und molekulare Zytogenetik der AML“).

Zukunft. Die Morphologie wird vermutlich auch in Zukunft die Basis für die Leukämiediagnostik bleiben. Die Zytochemie ist zwar nach wie vor Bestandteil der FAB-Subklassifikation, hat allerdings im Zeitalter der immunologischen Zellcharakterisierung an diagnostischer Bedeutung verloren.

Angiogenese. Eine neue Bedeutung in der AML-Diagnostik könnte in Zukunft dem Knochenmarkstroma zukommen. Der Einfluss der Angiogenese auf das Wachstum solider Tumoren ist bereits etabliert (Folkman et al. 1989). Mittlerweile gibt es auch erste Daten, die zeigen, dass Patienten mit AML eine signifikant höhere Mikrogefäßdichte im Knochenmark haben als gesunde Personen (Husong et al. 2000; Padro et al. 2000). Sollte sich die Angiogenese auch bei der AML als pathogenetischer Faktor erweisen, wäre die entsprechende Konsequenz die Einbindung antiangiogenetischer Substanzen in die Leukämietherapie.

Genetische Einzelzellanalyse. In jüngster Zeit wurden Methoden entwickelt, mit Hilfe derer einzelne Zellen aus zytologischen Präparaten „herausgepickt“ werden können, um sie in der Folge molekularbiologisch weiter zu untersuchen (Beltinger u. Debatin 1998; Zhang et al. 1997). Für AML mit spezifischen molekularen Veränderungen wäre ein selektives „Blastenausschneiden“ mit konsekutiver molekularer Analyse als Detektionsmethode für minimale Resterkrankung geeignet.

3.3.2.3 Immunologie

Das Prinzip der immunologischen Leukozytentypisierung beruht darauf, dass membranständige oder intrazelluläre Antigene mittels spezifischer monoklonaler Antikörper (mAk) dargestellt werden. Zur Vereinfachung der Nomenklatur wurden mAk, die dasselbe Antigen (jedoch nicht unbedingt dasselbe Epitop) erkennen, so genannten Differenzierungsclustern (CD: cluster of differentiation) zugeordnet und fortlaufend nummeriert. Mittlerweile hat sich die CD-Nomenklatur insofern geändert, als mit „CD“ nunmehr das Zellantigen bezeichnet wird, während der entsprechende, das Antigen ererkennende mAk „anti-CD“ benannt wird. Bis jetzt wurden auf insgesamt 7 „International Workshops on Human Leucocyte Differentiation Antigens (HLDA)“ insgesamt 247 unterschiedliche CD-Antigene definiert.

An Techniken für die immunologische Leukozytentypisierung stehen 2 Methoden zur Verfügung:

1. Immunenzymtechnik

• Anwendung

Die Immunenzymtechnik kann am Schnitt- bzw. Ausstrichpräparat angewendet werden.

• Prinzip

Der primäre mAk bindet entsprechend seiner Spezifität an Zellen, die das spezifische Antigen exprimieren; die Bindung des Erstantikörpers wird letztlich durch Zugabe eines Antikörpers sichtbar gemacht, der mit einem Enzym (z. B. alkalische Phosphatase, Peroxidase) gekoppelt ist, das eine entsprechende zytochemische Färbung katalysiert.

• Beurteilung

Die Auswertung erfolgt im Lichtmikroskop.

2. Immunfluoreszenztechnik

• Anwendung

Diese Technik kommt an Zellsuspensionen zum Einsatz.

• Prinzip

Bei der *indirekten Immunfluoreszenz* reagiert das Zellantigen in einem ersten Reaktionsschritt mit einem spezifischen, unmarkierten mAk; durch Zugabe eines fluoreszenzmarkierten, gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörpers wird die initiale Antigen-mAk-Bindung sichtbar gemacht. Bei der *direkten Immunfluoreszenz* ist der spezifische Primärantikörper direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt; die direkte Methode erlaubt durch Kombination unterschiedlich fluorochromierter Antikörper die gleichzeitige Darstellung von bis zu 4 verschiedenen Anti-

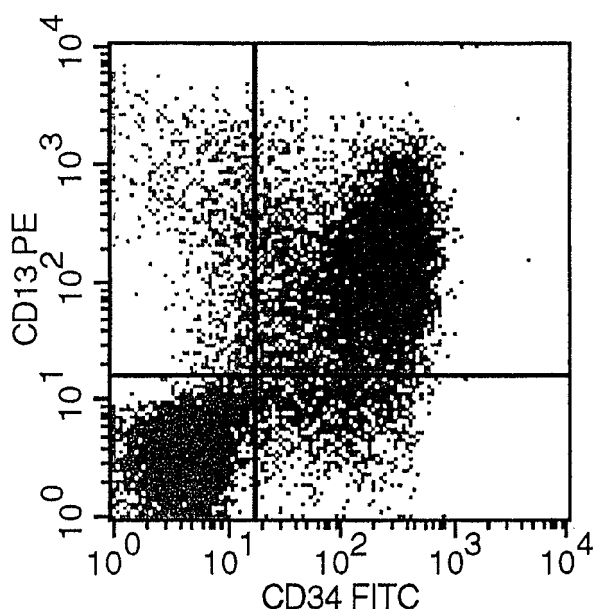


Abb. 3.3.4. FACS-Analyse einer AML (Doppelfärbung): Der Großteil der gefärbten Zellen exprimiert sowohl das Vorläuferzellantigen CD34 (Fluoreszenzintensität auf der x-Achse) als auch das myeloische Zellantigen CD 13 (Fluoreszenzintensität auf der y-Achse)

genen auf ein und derselben Zelle (Mehrfarbenfluoreszenz).

• Beurteilung

Die Auswertung erfolgt entweder im Immunfluoreszenzmikroskop oder mittels Durchflusszytometer (fluorescence activated cell sorter, FACS). Bei der mikroskopischen Beurteilung wird der Prozentsatz der fluoreszierenden Zellen (1- bis 2-Farben-Fluoreszenz) ermittelt und gleichzeitig die Zellmorphologie mittels Phasenkontrastobjektiv beurteilt. Bei der durchflusszytometrischen Methode werden die Zellen durch ihr Verhalten im Laserlicht charakterisiert. Das Streulichtverhalten der Zellen gibt Aufschluss über deren Größe und Granularität, das Fluoreszenzverhalten (bis zu 4-Farben-Fluoreszenz) über deren Antigenexpression (Abb. 3.3.4). Die Methode erlaubt eine exakte Quantifizierung positiver Zellen sowie eine Quantifizierung der Fluoreszenzintensität.

Bedeutung der immunologischen Methoden bei der Diagnostik der AM

Diagnose

Differenzierung zwischen AML und ALL. Die Immunphänotypisierung ist ein wesentlicher Bestandteil der initialen Leukämiediagnostik, da sie

in mehr als 99% der Fälle eine Liniendifferenzierung der Blasten erlaubt (Paietta 1995; Taylor et al. 1996). Dies geschieht durch den Nachweis linien-spezifischer membranständiger (m) bzw. intrazytoplastischer (cy) Antigene. Den cy-Antigenen kommt bei der Diagnostik akuter Leukämien besondere Bedeutung zu, da sehr unreife Zellen das entsprechende Antigen möglicherweise nur im Zytoplasma und noch nicht auf der Zelloberfläche exprimieren. Die wichtigsten diagnostischen cy-Antigene sind Myeloperoxidase (MPO) in myeloischen Blasten, cy-CD22 und cy-CD79a in lymphatischen Blasten der B-Zell-Reihe und cy-CD3 in Blasten der T-Zell-Reihe. Wichtige m-Antigene zur Differenzierung akuter Leukämien sind CD13, CD33, CD65s, CD15, CD14 für die myeloische Reihe, CD19, CD10, CD20, CD24 für die B-Zell-Reihe und CD3, CD2, CD5, CD7 für die T-Zell-Reihe (Bene et al. 1995; Catovsky et al. 1991). Neben diesen linienassoziierten Antigenen exprimieren Leukämiezellen auch vorläuferzellassozierte Antigene, die den Reifegrad einer Blastzellpopulation charakterisieren, z.B. CD10, CD34, CD117, HLA-DR, terminale Deoxyribonukleotidyltransferase (TdT). Die Antigene CD10 und CD117 haben insofern auch eine Linien-determinierende Bedeutung, als CD10 nahezu ausschließlich von lymphatischen (vornehmlich B-) Blasten exprimiert wird, während CD117 fast nur bei myeloischen Leukämien nachweisbar ist (Bene et al. 1998).

Leukämische Blasten können eine aberrante Antigenexpression zeigen, d.h. gleichzeitig myeloische und lymphatische Antigene exprimieren. Selten lassen sich auch 2 separate, unterschiedlich differenzierte Blastzellpopulationen nachweisen. Die „European Group for the Immunological Cha-

racterization of Leukemias“ (EGIL) hat einen Score erarbeitet, der eine Klassifikation der heterogenen Gruppe dieser nicht „rein“ differenzierten Leukämien ermöglicht (Bene et al. 1995). Nach diesem Score wird die Expression eines Antigens nach dem Grad seiner Linienspezifität durch ein Punktesystem (0,5–2 Punkte) gewichtet (Tabelle 3.3.4). Je nach erreichter Punktezahl unterscheidet man:

- Biphänotypische akute Leukämien (BAL): jeweils >2 Punkte für myeloische und lymphatische Differenzierung
- AML mit Koexpression lymphatischer Antigene (Ly⁺AML): >2 Punkte für myeloische und ≤2 Punkte für lymphatische Differenzierung
- ALL mit Koexpression myeloischer Antigene (My⁺ALL): >2 Punkte für lymphatische und ≤2 Punkte für myeloische Differenzierung

Die Literaturangaben bezüglich der Häufigkeiten dieser Leukämieformen variieren in Abhängigkeit von den verwendeten immunologischen Methoden, den eingesetzten mAk und dem untersuchten Patientenkollektiv (Kinder oder Erwachsene). Etwa 10–25% aller AML zeigen eine Koexpression T-lymphatischer Antigene, während die Koexpression B-lymphatischer Antigene eher selten (<10%) ist (Drexler et al. 1993). Die Häufigkeit der BAL beträgt bis zu 8% aller neu diagnostizierten akuten Leukämien (Legrand et al. 1998).

Bei <1% aller akuten Leukämien lässt sich keine Liniendifferenzierung nachweisen. Diese Leukämien exprimieren ausschließlich Vorläuferzellantigene und werden als *akute undifferenzierte Leukämien* (AUL) bezeichnet.

Subklassifikation nach FAB. Die immunologische Blastzelltypisierung ist für die Diagnose der FAB-Subtypen M0 und M7 notwendig, die mit morphologischen und zytochemischen Methoden nicht zu erkennen sind.

- M0
Nachweis mindestens eines myeloischen Antigens bei Negativität für linienspezifische lymphatische Antigene
- M7
Nachweis der Expression plättchenassoziierter Antigene (CD41, CD61)

Für die Klassifikation der übrigen FAB-Subtypen spielt die Blastzellimmunologie keine Rolle. Verschiedene FAB-Subtypen sind zwar mit der Expression bestimmter Antigene assoziiert (z.B. M2: CD19+; hypergranuläre M3: HLA-DR–, CD34–; M3 variant: CD2+; M4, M5b: CD14+, CD15+, CD65s+; M4Eo: CD2+), eine direkte Korrelation zwischen

Tabelle 3.3.4. Punktesystem für die immunologische Liniendifferenzierung der akuten Leukämie (EGIL 1998)

Punkte	Myeloisch	B-lymphatisch	T-lymphatisch
2	Anti-MPO	CD79a cy-IgM cy-CD22	CD3 Anti-TCRα/β Anti-TCRγ/δ
1	CD13 CD33 CD65s CD117	CD19 CD10 CD20	CD2 CD5 CD8 CD10
0,5	CD14 CD15 CD64	TdT CD24	TdT CD7 CD1a

EGIL European Group for the Immunological Characterization of Leukemias; MPO Myeloperoxidase; cy intrazytoplasmatisch; TCR T-Zell-Rezeptor.

Blastzellphänotyp und FAB-Typ gibt es allerdings nicht (Exner et al. 2000; Hurwitz et al. 1992; Khaliqi et al. 1998; Paietta et al. 1993).

Therapie. Der immunologische Nachweis der Liniendifferenzierung (myeloisch/lymphatisch) ist für die Auswahl der Induktionstherapie essenziell. Innerhalb der AML hat der Blastzellphänotyp keinerlei Einfluss auf die Therapieentscheidung.

Verlaufskontrolle. Während das Expressionsverhalten der verschiedenen Antigene innerhalb der normalen Hämatopoese genau reguliert ist, zeigen Leukämiezellen häufig aberrante Antigenkombinationen. Diese immunologischen Anomalien der Leukämiezellen bieten sich für den Nachweis *minimaler Resterkrankung* bei Patienten in morphologischer CHR an. Aberrante Antigenkombinationen bei AML sind z. B. die Koexpression lymphatischer Antigene oder eine asynchrone Antigenexpression (gleichzeitige Expression von unreifen und reifen Markern, die innerhalb der normalen Hämatopoese nur in unterschiedlichen Entwicklungsstadien nachweisbar sind) (Campana u. Coustan-Smith 1999; Wörmann et al. 1993). Voraussetzung für die eindeutige Identifizierung immunologisch abnormer residualer Leukämiezellen ist die exakte Charakterisierung der leukämischen Blasten zum Diagnosezeitpunkt mittels durchflusszytometrischer Mehrfarbenfluoreszenzanalyse. Die Nachweisgrenze dieser Methode für die Wiederauffindung residualer Leukämiezellen liegt bei 1 in 10^4 Zellen (Campana u. Pui 1995). Einige Studien konnten zeigen, dass der immunologische Nachweis phänotypisch abnormer Zellen bei Patienten mit AML in CHR mit einer höheren Rezidivrate vergesellschaftet war (San Miguel et al. 1997; Venditti et al. 2000). Der Nachweis minimaler Resterkrankung mittels Durchflusszytometrie hat allerdings auch einige Limitationen. Falsch-positive Ergebnisse können sich ergeben, wenn geringe Mengen gesunder hämatopoetischer Zellen atypische, leukämieassoziierte Antigenkombinationen exprimieren bzw. wenn es zu unspezifischer Antikörperbindung an nicht leukämischen Zellen kommt (Campana u. Pui 1995). Falsch-negative Ergebnisse ergeben sich dann, wenn abnorme Antigenkombinationen nicht von allen Zellen der leukämischen Population exprimiert werden oder wenn die Leukämiezellen im Lauf der Erkrankung ihre Antigenexpression verändern (lineage switch) (Campana u. Pui 1995). Therapeutische Konsequenzen werden derzeit aus dem immunologischen Nachweis residualer Leukämiezellen nicht empfohlen. Ein Ansatz, die Spezifi-

tät der Methode zu verbessern, ist der Nachweis spezifischer genetischer Veränderungen (z. B. durch Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung, FISH) in nach ihrem abnormen Markerprofil mittels Zellsorter angereicherten Zellen (Engel et al. 1997).

Prognose. Obwohl bisher zahlreiche Studien über die prognostische Bedeutung der immunologischen Blastzelltypisierung bei AML publiziert wurden, blieben die Schlussfolgerungen über den prognostischen Stellenwert verschiedener immunologischer Phänotypen oder einzelner Antigene kontrovers (Paietta et al. 1996). Dies liegt z. T. daran, dass bestimmte, in Univarianzanalysen als prognostisch bedeutsam eingestufte Marker mit anderen prognostischen Charakteristika wie z. B. Chromosomenanomalien [z. B. CD2 und t(15;17)/inv(16); CD19 und t(8;21)] oder der Expression von Chemotherapieresistenzgenen (z. B. CD34/CD7 und P-Glykoprotein) assoziiert sind (Lamy et al. 1994; Miwa et al. 1993; Willman 1999) und in Multivarianzanalysen daher keine eigenständige prognostische Relevanz finden. Ein weiterer Grund liegt vermutlich in der Heterogenität der angewandten immunologischen Methoden, der Vielfalt der verwendeten mAk und der arbiträren Grenzziehung zwischen positiver und negativer Blastzellreaktivität (Paietta et al. 1996). Im Unterschied zu den genetischen Untersuchungen kommt der Blastzellimmunologie bei der AML daher bis jetzt keine prognostische Bedeutung von therapeutischer Relevanz zu.

Zukunft

Angiogenese. Die Immunologie könnte ein wichtiger Faktor bei der Beurteilung der Angiogenese werden. Durch immunenzymatische Darstellung endothelialer Zellstrukturen (z. B. Von-Willebrand-Faktor, Thrombomodulin) können Mikrogefäße am Schnittpräparat dargestellt werden (Hussong et al. 2000; Padro et al. 2000).

In-situ-Kombination von Immunphänotypisierung und FISH. Mit Hilfe neuer, automatisierter Mikroskopiermethoden ist es möglich, in zytologischen Präparaten geringe Mengen von Tumorzellen durch immunologische Darstellung tumorspezifischer Zellantigene aufzufinden (Ambros et al. 2001). Der Vorteil dieser Methode gegenüber der Multiparameter-Durchfluss-Zytometrie ist der, dass die aufgefundenen suspekten Zellen direkt in situ mittels FISH hinsichtlich leukämiespezifischer zytogenetischer Aberrationen weiter untersucht werden können. Die sensitive kombinierte Anwendung

von in situ-Immunologie und FISH könnte für das Monitoring von AML mit zytogenetischen Anomalien Bedeutung gewinnen.

Therapeutischer Einsatz monoklonaler Antikörper. Das CD33-Antigen ist ein myelomonozytäres Antigen, das innerhalb der normalen Hämatopoese von Vorläuferzellen, nicht jedoch von pluripotenten Stammzellen exprimiert wird. Da das CD33-Antigen auch von der überwiegenden Mehrheit aller AML exprimiert wird, bietet sich dieses Antigen als Target für eine gezielte antileukämische Therapie an. Prinzip dieser Behandlung ist die Applikation eines Konjugats aus einem Anti-CD33-Antikörper und einem Zellgift (Calicheamicin, CMA-676), das selektiv die Leukämiezellen auffinden und abtöten soll (Bernstein 2000). Erste klinische Studien bei Patienten mit refraktärer und rezidivierter AML haben gezeigt, dass das Anti-CD33-Calicheamicin-Konjugat gut verträglich ist und bei einigen Patienten eine Elimination der leukämischen Blasten, nicht aber der normalen Hämatopoese bewirkte (Sievers et al. 1999).

3.3.3 Klassische und molekulare Zytogenetik der akuten myeloischen Leukämien

3.3.3.1 Einleitung

Die zytogenetische Analyse mittels klassischer, konventioneller Chromosomenbänderung und Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung ist ein etabliertes Verfahren in der Leukämiediagnostik und auch zur Vorhersage des Krankheitsverlaufs und des Ansprechens auf die Therapie geeignet. Es werden

primäre von sekundären Chromosomenanomalien unterschieden: Die primären Anomalien treten zuerst auf, sind für die Krankheitsentstehung und den histologischen Subtyp (mit)verantwortlich; es handelt sich meist um balancierte Translokationen oder Inversionen, die zu einer Aktivierung von Onkogenen führen (Tabelle 3.3.5). Die später im Krankheitsverlauf entstehenden sekundären Chromosomenanomalien sind mit der Aggravierung des Krankheitsverlaufs, aber auch mit der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Therapien assoziiert. Häufig werden als sekundäre Chromosomenanomalien Verluste und Zugewinne von Chromosomenstücken und damit der Verlust von Tumorsuppressorgen beobachtet (Tabelle 3.3.5).

Eine Reihe von Studien hat die Rolle primärer Chromosomenanomalien für die Diagnose und Prognose der akuten myeloischen Leukämie deutlich gemacht. Zu den prognostisch eher günstigen zytogenetischen Kategorien zählen die Translokationen t(8;21) und t(15;17), sowie die perizentrische Inversion 16. Ungünstige zytogenetische Parameter sind z.B. das Fehlen des gesamten Chromosoms 5 und/oder 7 oder der langen Arme dieser Chromosomen sowie 3q- und 11q23-Anomalien und komplex aberrante Karyotypen (Heim u. Mitelman 1995; Grimwade et al. 1998; Rowley 2000; Slovak et al. 2000).

Neue Anomalien werden – auch dank des kombinierten Einsatzes klassischer Chromosomenbänderungs- und molekularzytogenetischer Methoden – aufgedeckt. Der molekulare Hintergrund einiger spezifischer Anomalien ist noch unklar. Wenig ist über die Bedeutung der sekundären Chromosomenanomalien und ihre Auslösungsmechanismen, involvierte Gene und ihre klinische Wertigkeit bekannt.

Verschiedene Einsatzbereiche der Zytogenetik und die Relevanz der Befunde bei der akuten myeloischen Leukämie werden im Folgenden an Beispielen besprochen und diskutiert.

Tabelle 3.3.5. Chromosomenanomalien bei Leukämien

Primäre Anomalien	Sekundäre Anomalien
Treten zuerst auf	Treten nach primären Chromosomenanomalien auf
Für Krankheitsentstehung und histologischen Subtyp (mit)verantwortlich	Mit Aggravierung des Krankheitsverlaufs, auch mit Resistentwerden gegenüber Therapien assoziiert
Meist balancierte Translokationen, Inversionen [z. B. t(8;21), inv(3)]	Häufig Verlust/Zugewinn von Chromosomenstücken [z. B. +8,del(9q), -7,del(17p)]
Aktivierung von Onkogenen (z. B. <i>ETO/AML1</i> ; <i>PML/RARA</i>)	Verlust von Tumorsuppressorgen (z. B. <i>TP53</i>)

3.3.3.2 Relevanz zytogenetischer Befunde bei der AML

Nachweis spezifischer Chromosomenanomalien zur Stützung der Verdachtsdiagnose AML

Beim Verdacht auf das Vorliegen einer akuten myeloischen Leukämie (AML) stützt der Nachweis spezifischer klonaler Chromosomenanomalien die Verdachtsdiagnose und kann Hinweise auf den Subtyp geben:

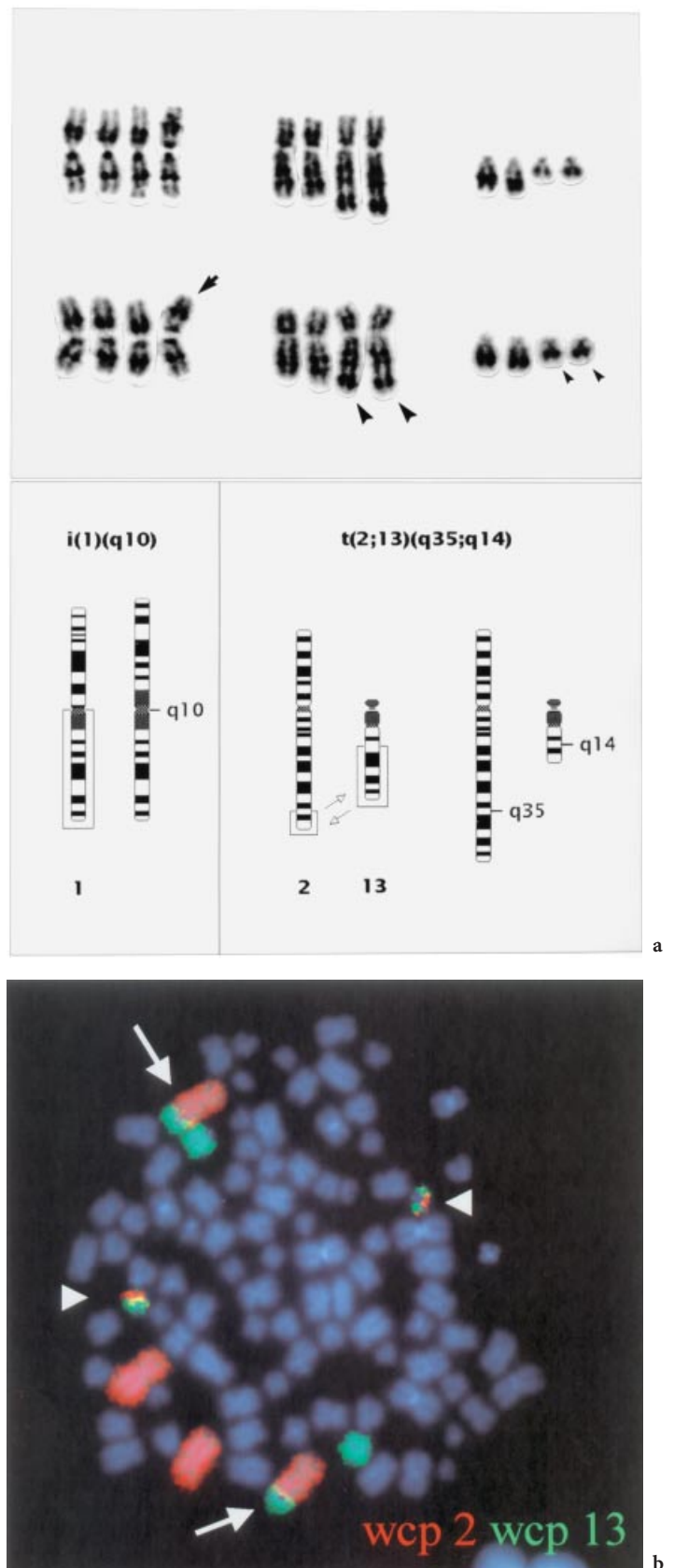


Abb. 3.3.5 a, b. ARMS, **a** partielle Karyotypen und schematische Darstellung der Chromosomen eines nahezu tetraploiden alveolären Rhabdomyosarkoms (ARMS) mit einem Isochromosom der langen Arme von Chromosom 1 – i(1)(q10) (*Pfeil*) – und einer Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen 2 und 13 – t(2;13)(q35;q14) (*Pfeilköpfe*), **b** FISH mit Paintingsonden für die Chromosomen 2 (*rot*) und 13 (*grün*) an einer nahezu tetraploiden ARMS-Zelle, *Pfeile* Derivatvchromosomen 2 – der(2), *Dreiecke* Derivatvchromosomen 13 – der(13)

Findet sich im Knochenmark des Patienten eine für die AML spezifische Translokation, wie z.B. $t(8;21)(q22;q22)$ oder $t(6;9)(p23;q34)$, die parazentrische Inversion $inv(3)(q21q26)$, eine Monosomie 5 oder 7 bzw. eine Trisomie 8, wird dadurch die mittels morphologischer und immunologischer Analysen gestellte Diagnose bestätigt. Werden für die AML uncharakteristische, jedoch für andere maligne Erkrankungen sehr spezifische Chromosomenanomalien nachgewiesen, vermag der zytogenetische Befund oftmals hilfreiche diagnostische Hinweise zu geben. Zum Beispiel führte die Aufdeckung einer für das alveoläre Rhabdomyosarkom (ARMS) charakteristischen Translokation $t(2;13)(q35;q14)$ (Abb. 3.3.5) im Knochenmark einer Patientin, bei der der Verdacht auf eine AML bestand, zu einer – seitens der Pathologen bestätigten – Diagnose eines ARMS, das das Knochenmark infiltriert hatte (Stindl et al. 1998).

Diagnose bestimmter Subtypen der AML mittels Zytogenetik

Die akute Promyelozytenleukämie (FAB-Subtyp M3) zeichnet sich in etwa 95% der Fälle durch eine Translokation $t(15;17)(q22;q21)$ aus; die Translokation $t(8;21)$ tritt vorwiegend bei der akuten Myeloblastenleukämie mit Ausreifung (FAB-Subtyp M2) auf (Tabelle 3.3.6). Somit können einerseits mittels der Chromosomenanalyse einzelne AML-Subtypen diagnostiziert werden, andererseits neue Korrelationen zwischen histologischem Subtyp und spezifischer Chromosomenanomalie geschaffen werden.

Prognostische Bedeutung spezifischer Chromosomenanomalien bei der AML

Bestimmte Karyotypabweichungen haben sich als unabhängige Prognosefaktoren bei der AML erwiesen:

Die Translokationen $t(8;21)$ und $t(15;17)$ und die Inversion eines Chromosoms 16 – $inv(16)(p13q22)$ – sind mit einer relativ guten Prognose vergesellschaftet, während partielle oder totale Monosomien 5 oder 7, die meisten Rearrangements, die die Bande 11q23 betreffen, und komplexe Chromosomenanomalien mit einer besonders schlechten Prognose einhergehen (Tabelle 3.3.6). In jüngster Zeit wurden Vervielfachungen (Amplifikationen) von Genen, wie *MLL*, *cMYC* und *AML1*, in Form von „double minutes“, Ringen oder homogen oder heterogen anfärbbaren translozierten Segmenten, ebenfalls als Indikatoren für einen aggressiven Krankheitsverlauf entdeckt (Fonatsch et al. 2001; Rimsza et al. 2000; Streubel et al. 2000). Bestimmte Strukturaberrationen, in die der lange Arm von Chromosom 3 involviert ist, sind mit einer außerordentlich schlechten Prognose assoziiert. Anhand dieser Rearrangements sollen hier Möglichkeiten der molekularzytogenetischen Diagnostik veranschaulicht werden:

Sowohl die $inv(3)(q21q26)$ (Abb. 3.3.6) als auch die $t(3;3)(q21;q26)$ und die $t(1;3)(p36;q21)$ betreffen die gleiche, etwa 100 kb große Bruchpunktregion in der Chromosomenbande 3q21. Weder die Bildung eines Fusionstranskripts noch die Überexpression eines Onkogens wurden bisher konsistent als Folge dieser Aberrationen gefunden. Somit ist ein auf

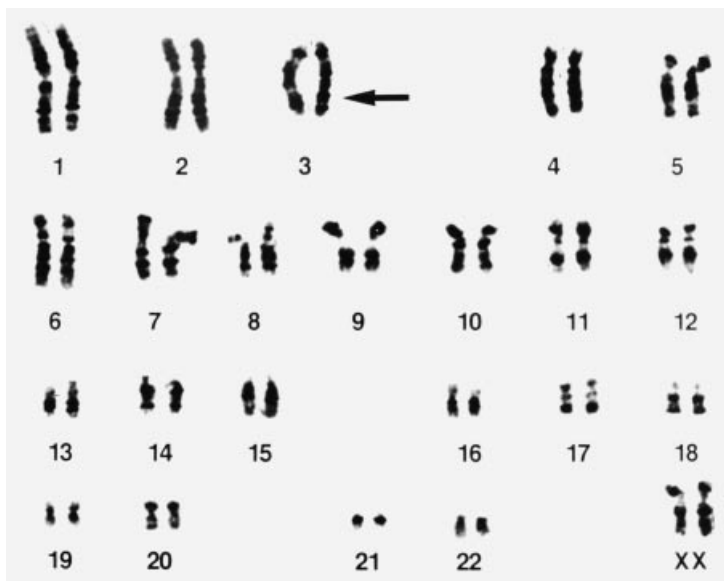


Abb. 3.3.6. Giemsa-Banden-Karyogramm einer Knochenmarkszelle einer Patientin mit akuter myeloischer Leukämie und parazentrischer Inversion in einem Chromosom 3 – $inv(3)(q21q26)$

Tabelle 3.3.6. Primäre Chromosomenanomalien bei der AML

Typ der Chromosomenanomalie	Involvierte Gene	FAB-Subtyp, klinische Charakteristika	Prognose
t(1;3)(p36;q21)	MEL1; ?	M1, M4, MDS-Vorphase	Ungünstig
der(1)t(1;7)(q10;p10)	?	M4, MDS-Vorphase	Ungünstig
t(1;11)(q21;q23)	?; MLL	M4, M5	Ungünstig
inv(3)(q21q26), t(3;3)(q21;q26)	?; EVI1	Alle FAB-Subtypen außer M3, MDS-Vorphase	Ungünstig
t(3;5)(q25.1;q34)	MLF1; NPM	Alle FAB-Subtypen, MDS-Vorphase	Ungünstig
t(3;21)(q26;q22)	EVI1/EAP/MDS1; AML1	Alle FAB-Subtypen außer M3, Mutagenexposition (z. B. Topoisomerase-II-Blocker)	Ungünstig
+4(±dmin)	? (cMYC)	M2, M4	Ungünstig
-5/del(5q)	?	Alle FAB-Subtypen, Mutagenexposition	Ungünstig
t(6;9)(p23;q34)	DEK; CAN	M2, M4, MDS-Vorphase	Ungünstig
t(6;11)(q27;q23)	AF6; MLL	M4, M5	Ungünstig
t(7;11)(p15;p15)	HOXA9; NUP98	M2	Ungünstig
-7/del(7q)	?	Alle FAB-Subtypen, Mutagenexposition	Ungünstig
+8	?	M2, M4, M5, MDS-Vorphase	Intermediär
t(8;16)(p11;p13)	MOZ; CBP	M5 (M5b), Erythrophagozytose	Ungünstig
t(8;21)(q22;q22)	ETO; AML1	M2	Günstig
+9	?	M2, M4, M5	?
t(9;11)(p21~22;q23)	AF9; MLL	M5 (M5a)	Intermediär
del(9q)	?	Alle FAB-Subtypen	Intermediär/ ungünstig
t(9;22)(q34;q11)	ABL; BCR	M1, M2	Ungünstig
t(10;11)(p13;q14)	AF10; CALM	M0, M1, M5	Ungünstig
t(10;11)(p12;q23)	?; MLL	M5	Ungünstig
+11	MLL?	M1, M2, M4	? Ungünstig
t(11;17)(q23;q21)	MLL; AF17	M3	?
t(11;17)(q23;q21)	PLZF; RARA	M3v	?
t(11;17)(q23;q25)	MLL; MSF	M2, M4, M5	Ungünstig
t(11;19)(q23;p13.1)	MLL; ELL	M4, M5, ML-Phänotyp ^a	Ungünstig
t(11;19)(q23;p13.3)	MLL; ENL	M4, M5, ML-Phänotyp	Ungünstig
t/del(11q23)	MLL	M5 (M5a), ML-Phänotyp ^a	Ungünstig
t/del(12p)	ETV6/TEL	Alle FAB-Subtypen, Mutagenexposition	Intermediär/ ungünstig
+13	?	Alle FAB-Subtypen	Ungünstig
+14	?	?	?
t(15;17)(q22;q21)	PML; RARA	M3, M3v	Günstig
inv(16)(p13q22),t(16;16)(p13;q22)	MYH11; CBFβ	M4eo	Günstig
t(16;21)(p11;q22)	FUS; ERG	Alle FAB-Subtypen	?
i(17)(q10), del(17p)	TP53?	Alle FAB-Subtypen, MDS-Vorphase	Ungünstig
del(20q)	?	Alle FAB-Subtypen	Ungünstig
+21	?	Alle FAB-Subtypen	Günstig/intermediär
-X,-Y	?	Alle FAB-Subtypen	Intermediär
Normalkaryotyp		Alle FAB-Subtypen	Intermediär

^a ML-Phänotyp: myeloische und lymphatische Merkmale vorhanden. Zusammengestellt aus: Heim u. Mitelman (1995), Grimwade et al. (1998), Slovak et al. (2000), eigene Beobachtungen.

der Polymerasekettenreaktion basierender Test zur molekularen Diagnostik dieser Anomalien beim derzeitigen Wissensstand nicht möglich. Als Alternative wurde daher eine Fluoreszenz-in situ-Hybridisierungsmethode zum Nachweis der inv(3), t(3;3) und t(1;3) in Interphasezellkernen etabliert. PAC-Klone (d.h. Klone, die große Stücke genomischer DNA enthalten), direkt zentromerisch und telomerisch der Bruchpunktregion, werden mit 2 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen – rot und grün – mar-

kiert. In normalen Zellen liegen die beiden Signale eng nebeneinander, sind also kolokalisiert, wenn aber ein 3q21-Rearrangement vorliegt, werden die dem aberranten Chromosom entsprechenden roten und grünen Signale voneinander getrennt (Abb. 3.3.7; Wieser et al. 2001). So kann ein 3q21-Rearrangement nicht nur in effizienter Weise nachgewiesen werden, sondern auch der Prozentsatz der Zellen, die dieses tragen, festgestellt werden – ein bei der Verlaufskontrolle besonders nützlicher Umstand.

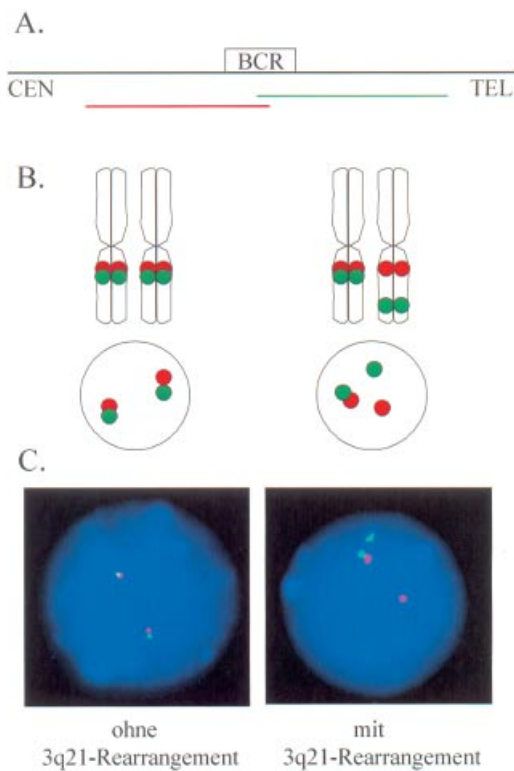


Abb. 3.3.7 A–C. Interphase-Fluoreszenz-in situ-Hybridisierung zum Nachweis von 3q21-Rearrangements, A Sonden zentromerisch (CEN) und telomerisch (TEL) der Bruchpunktregion (breakpoint cluster region, BCR) werden mit rotem bzw. grünem Fluoreszenzfarbstoff markiert, B in normalen Metaphasechromosomen bzw. Interphasen kolokalisieren das rote und das grüne Signal; bei Vorliegen einer 3q21-Aberration [im Bild: inv(3)(q21q26)] werden sie voneinander getrennt (schematische Darstellung), C fluoreszenzmikroskopische Darstellung von Interphasekernen ohne und mit 3q21-Rearrangement

Ähnliche Nachweismethoden wurden bereits für eine Vielzahl wiederkehrender Chromosomenaberrationen etabliert.

AML-Patienten mit einem Normalkaryotyp im Knochenmark, einer Trisomie 8, einem Stückverlust (Deletion) im langen Arm eines Chromosoms 9, einer t(9;11)(p21~22;q23) und anderen Chromosomenanomalien dürften eine intermediäre Prognose haben (Tabelle 3.3.6).

Prognostische Signifikanz von sekundären Karyotypveränderungen

Neben spezifischen primären Chromosomenanomalien treten bei Leukämien häufig zusätzliche sekundäre Karyotypveränderungen auf, die ebenfalls von prognostischer Signifikanz sein können:

Die klinische Relevanz von sekundären Chromosomenanomalien ist derzeit noch unklar, wie

an der Translokation t(8;21)(q22;q22) demonstriert wird. Die t(8;21) ist mit einer Inzidenz von 6–12% eine der häufigsten strukturellen Chromosomenanomalien bei der AML. Bis zu 80% der Patienten mit t(8;21) weisen zusätzliche Chromosomenanomalien auf, besonders häufig den Verlust eines Geschlechtschromosoms. Während einige Arbeitsgruppen fanden, dass diese sekundäre Anomalie die günstige Prognose der 8;21-Translokation nicht zu beeinträchtigen scheint, erwies sich in anderen Arbeiten der Verlust von Geschlechtschromosomen als den Krankheitsverlauf ungünstig beeinflussend (Rege et al. 2000). Auch wurde die partielle Deletion des langen Arms eines Chromosoms 9 in einer Studie als ungünstiger prognostischer Faktor identifiziert. Patienten mit zusätzlicher del(9q) zeigten eine signifikant kürzere mediane Überlebensdauer als die Patienten mit nur t(8;21) oder t(8;21) und Geschlechtschromosomenverlust (Schoch et al. 1996; Abb. 3.3.8). Im Gegensatz dazu wiesen Grimwade et al. (1998) in ihren im Rahmen des Medical Research Council (MRC) AML 10 Trial durchgeführten Untersuchungen nach, dass ein 9q-Verlust die günstige Prognose der t(8;21) nicht beeinträchtigt. Eine andere englische Gruppe (Rege et al. 2000) zeigte ebenfalls, dass Deletionen und Translokationen des langen Arms von Chromosom 9 keine ungünstige Auswirkung auf die Überlebenszeit haben. Die prognostische Signifikanz der, qualitativ und quantitativ unterschiedlichen, 9q-Anomalien wird, z.B. mittels molekulargenetischer Techniken, genauer zu prüfen sein.

Etwa 15–20% aller AML-Patienten weisen einen mehrere numerische und strukturelle Chromosomenanomalien umfassenden, komplex aberranten Karyotyp im Knochenmark auf. Oftmals sind 5q-, Chromosom 7- und/oder 3q-Anomalien die primären Karyotypveränderungen. Komplex aberrante Chromosomensätze sind meist nur unter Einsatz verschiedener molekularzytogenetischer Techniken, zusätzlich zur klassischen Chromosomenbänderungsanalyse, zu klären. Eine orientierende Übersicht und die Identifizierung von mittels Chromosomenbänderung nicht erkannten Aberrationen gelingt bei komplex aberranten Karyotypen häufig mit der Vielfarbenfluoreszenz-in situ-Hybridisierung (Multicolor- oder Multiplex-FISH, M-FISH) (Abb. 3.3.9) oder der SKY-Technik (spectral karyotype imaging). Chromosomale Imbalancen, Stückverluste und -zugewinne werden, wenn sie ein bestimmtes Ausmaß haben, mittels vergleichender Genomhybridisierung (comparative genomic hybridization, CGH) erfasst. Eine genauere Charakterisierung, v.a. von strukturellen Chro-

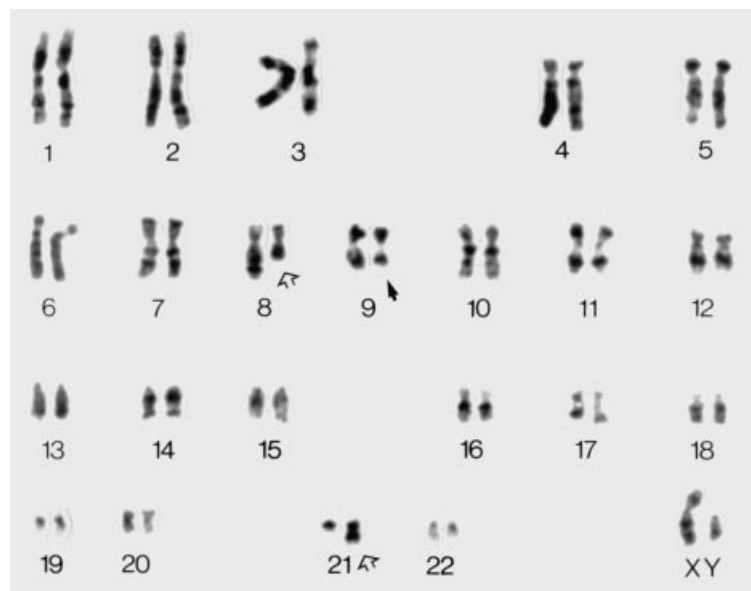


Abb. 3.3.8. Giesma-Banden-Karyogramm einer Knochenmarkszelle eines Patienten mit Translokation $t(8;21)(q22;q22)$ und Deletion im langen Arm eines Chromosoms 9



Abb. 3.3.9. M-FISH-Karyogramm einer Knochenmarkszelle einer Patientin mit AML und komplex aberrantem Karyotyp

mosomenveränderungen, gelingt mittels FISH mit DNA-Sonden für einzelne Gene, Chromosomenbereiche wie Zentromeren und Telomeren, Chromosomenarme oder ganze Chromosomen (Paintingsonden). In Zukunft ist aus der Kombination

klassischer Chromosomenbänderung und molekularzytogenetischer Analysen zu erwarten, dass Hinweise auf Gesetzmäßigkeiten des Auftretens bestimmter komplexer Chromosomenaberrationen gewonnen werden.

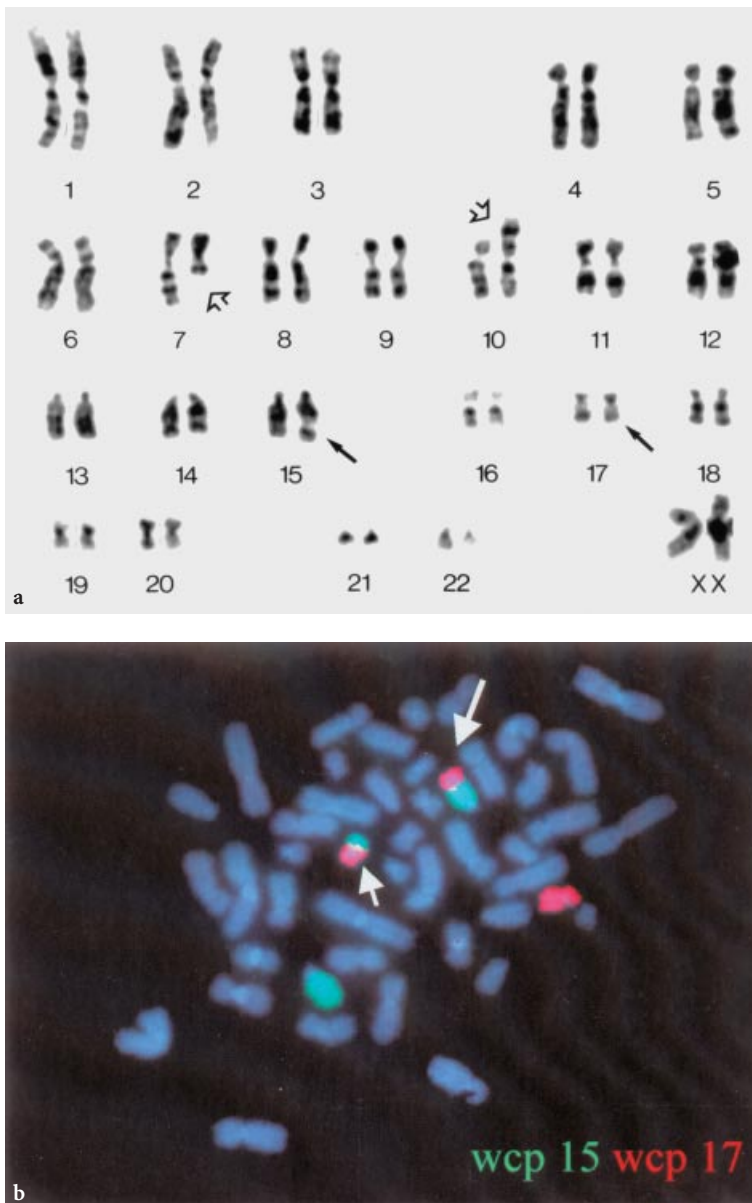


Abb. 3.3.10. a Giemsa-Banden-Karyogramm einer Patientin mit akuter Promyelozytenleukämie und Translokation $t(15;17)(q22;q21)$ sowie einer Translokation zwischen dem langen Arm eines Chromosoms 7 und dem kurzen Arm eines Chromosoms 10 als sekundäre Chromosomenanomalie, b FISH mit Paintingsonden für die Chromosomen 15 (grün) und 17 (rot) an einer Knochenmarkszelle eines Patienten mit AML M3, langstieliger Pfeil Derivatvchromosom der(15), kurzstieliger Pfeil Derivatvchromosom der(17)

Zytopenetischer Befund und Therapieplanung

Therapiemodalitäten können unter Berücksichtigung des zytopenetischen Befunds gewählt werden. Die Rolle desselben bei der Wahl der Therapie ist besonders eindrucksvoll an der akuten Promyelozytenleukämie (APL) mit Translokation $t(15;17)$ zu demonstrieren. Diese Translokation, deren Nachweis mit konventionellen Bänderungstechniken oftmals Schwierigkeiten bereitet, da ungefähr gleich große und ähnlich gebänderte Chromosomensegmente zwischen den langen Armen der Chromosomen 15 und 17 ausgetauscht werden, kann leicht mittels FISH mit Paintingsonden, die

das gesamte Chromosom markieren, erkannt werden (Abb. 3.3.10).

Wie im Abschnitt 3.3.5 „Therapiestrategien bei akuten myeloischen Leukämien“ näher erläutert, wird seit einigen Jahren eine spezifische Therapieform mit all-trans-Retinsäure (ATRA) in Kombination mit Anthrazyklinen eingesetzt. Die Retinsäure bewirkt die terminale Differenzierung der Promyelozyten in reife Granulozyten, die altern und absterben. Das Ansprechen auf die Therapie kann in Verlaufskontrollen überprüft werden, indem die Persistenz des spezifischen Rearrangements zwischen den Chromosomen 15 und 17 mittels Poly-

merasekettenreaktion (Abschnitt 3.3.4 „Molekular-genetische Befunde bei der AML“), aber auch mittels FISH an Metaphasen und Interphasen untersucht wird. Dies leitet zum nächsten Abschnitt der zu besprechenden Einsatzmöglichkeiten der klassischen und molekularen Zytogenetik bei der AML-Diagnostik über.

Überprüfung des Ansprechens auf die Therapie mittels zytogenetischer Untersuchung

Das Ansprechen auf die Therapie kann mit Hilfe einer Chromosomenuntersuchung durch Beobachtung des Verschwindens bzw. Persistierens des chromosomal abnormen Klons überprüft werden:

Da als Folge der Therapie die Ausbeute an Zellen in Teilung (Mitosezellen in Metaphase) gering sein kann, empfiehlt sich die Untersuchung von ungeteilten Zellen (Interphasen) – bei der APL unter Einsatz von Cosmidsonden, die die Gene *PML* (aus der Chromosomenbande 15q22) und *RARA* (aus der Chromosomenbande 17q21) enthalten. In Zellen ohne 15;17-Translokation sind je 2 rote *PML*- und grüne *RARA*-Signale zu erkennen, während in Interphasen mit der 15;17-Translokation eine Kolokalisation eines roten und eines grünen Signals das Rearrangement deutlich macht (Abb. 3.3.11). Das Prinzip dieses Tests ist also – aufgrund der anderen Wahl der Sonden – genau umgekehrt, wie bei dem oben beschriebenen Test für 3q21-Aberrationen. Allerdings erhebt sich die Frage, ob der Nachweis des *PML-RARA*-Rearrangements in Interphasen, also in sich nicht teilenden Zellen, eine Aussage über das Ansprechen auf die

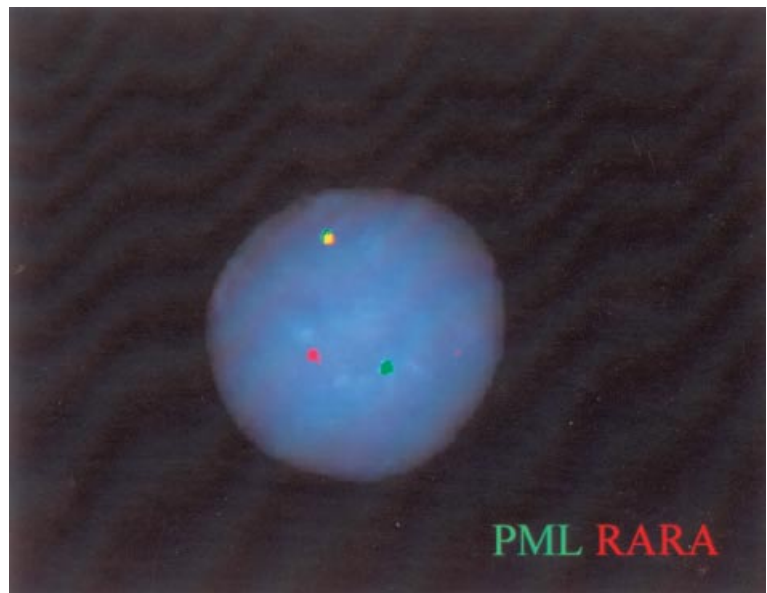
Therapie zulässt, da es sich bei den Zellen in Interphase um ausgereifte, alternde und absterbende Zellen handeln könnte.

Chromosomenanalyse zur Remissionsüberwachung und Früherkennung von Rezidiven

Zytogenetische Analysen dienen der Remissionsüberwachung und können zur Früherkennung von Rezidiven beitragen:

Der Nachweis des Wiederauftauchens von bereits bei der Erstdiagnose vorhandenen Chromosomenanomalien oder neuen oder zusätzlichen Aberrationen kann den klinischen Befund eines Rezidivs stützen. Patienten mit einer parazentrischen Inversion im langen Arm eines Chromosoms 3, also einer Chromosomenanomalie, die mit einer äußerst ungünstigen Prognose vergesellschaftet ist, können nach mehreren Zyklen Induktionstherapie eine komplette hämatologische Remission erreichen. Zytogenetisch ist jedoch die parazentrische Inversion 3 in den meisten Fällen permanent im Knochenmark nachweisbar. Ein Rezidiv kann sich auch zytogenetisch durch das Auftreten von sekundären Chromosomenanomalien in Form z.B. einer dizentrischen Translokation zwischen den kurzen Armen der Chromosomen 7 und 12 ankündigen (Abb. 3.3.12). Zu diskutieren ist, dass zusätzliche Chromosomenanomalien, die ein Rezidiv auszeichnen, möglicherweise durch die Therapie mitinduziert werden.

Abb. 3.3.11. FISH an einer Interphasezelle mit Cosmidsonden für die Gene *PML* (15q22 grün) und *RARA* (17q21 rot). Neben einem grünen und einem roten Signal ist ein gelbes Fusionssignal erkennbar



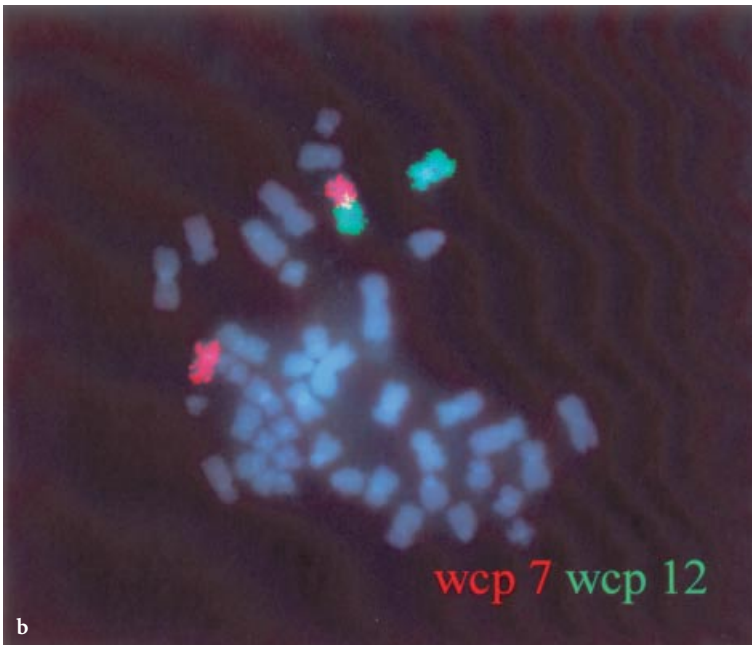
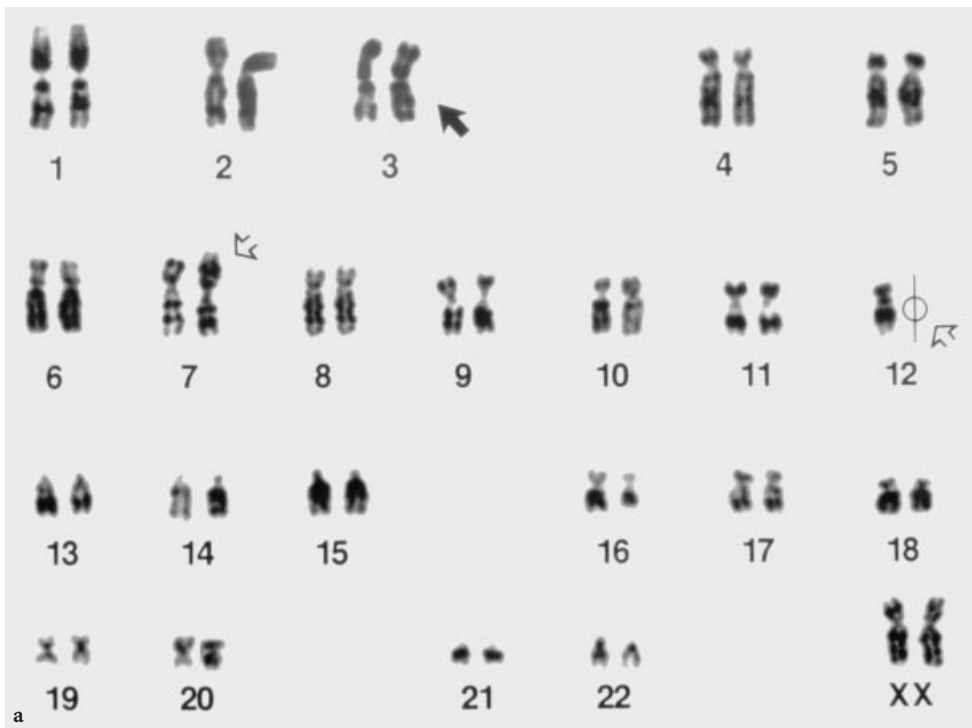


Abb. 3.3.12. a Giemsa-Banden-Karyogramm einer Knochenmarkszelle einer Patientin mit AML und inv(3). Als sekundäre Chromosomenanomalie ist ein dizentrisches Chromosom dic(7;12) zu beobachten. b FISH mit Paintingsonden für die Chromosomen 7 (rot) und 12 (grün) an einer Knochenmarkszelle derselben Patientin. Neben je einem normalen Chromosom 7 und 12 ist das dizentrische Chromosom, bestehend aus jeweils den langen Armen der Chromosomen 7 und 12, zu erkennen. c FISH mit einer Zentromersonde für Chromosom 3 (rot) sowie einer YAC-Sonde, die das *EVII*-Gen (grün) enthält, an einer Knochenmarkszelle eines Patienten mit inv(3). Im invertierten Chromosom 3 liegt ein gesplittetes *EVII*-Signal vor

Entstehungsmechanismen von Chromosomenanomalien

Aus dem zytogenetischen Befund können häufig Rückschlüsse auf Entstehungsmechanismen von Chromosomenanomalien gezogen werden:

Pedersen-Bjergaard u. Rowley (1994) haben festgestellt, dass in sekundären akuten myeloischen

Leukämien (sAML) nach Behandlung mit alkylierenden Zytostatika eher unbalancierte Chromosomenanomalien, z.B. Deletionen, in vivo auftreten, während nach Behandlung mit Topoisomerase-II-Blockern, wie z.B. Etoposid, aber auch Anthrazyklinen, eher balancierte Anomalien, z.B. Translokationen, zu beobachten sind, oftmals dieselben

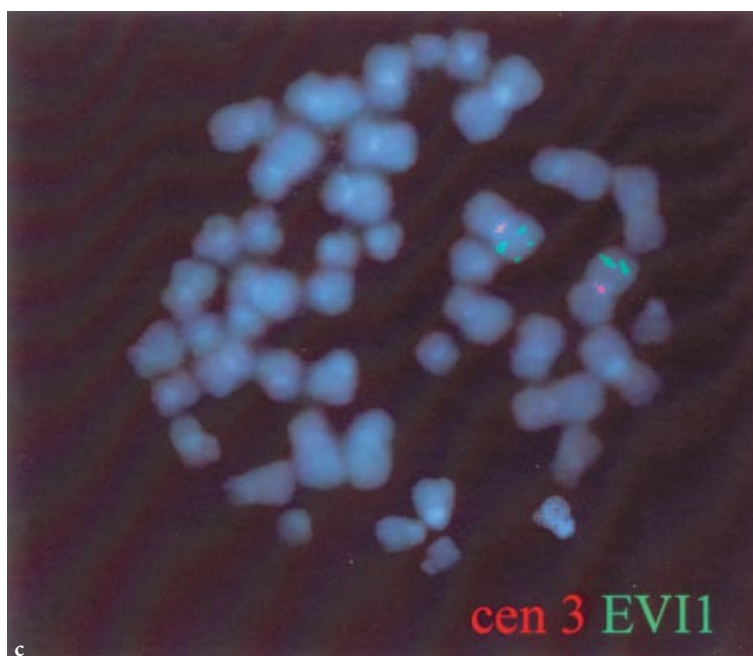


Abb. 3.3.12 c

wie bei der de novo AML. Besonders häufig lässt sich nach Topoisomerase-II-Blocker-Behandlung eine Involvierung der Chromosomenbande 11q23 nachweisen (s. auch Abschnitte 3.3.2 „Morphologie und Immunologie der AML“, 3.3.4 „Molekulargenetische Befunde bei der AML“, und 3.3.5 „Therapiestrategien bei akuten myeloischen Leukämien“). Der Verlust von Teilen des langen Arms von Chromosom 5 und/oder 7 oder eines gesamten Chromosoms 5 und/oder 7 bzw. des kurzen Arms von Chromosom 12 wird häufig im Gefolge der Therapie mit alkylierenden Substanzen beobachtet.

Chromosomale Rearrangements als Basis für die Isolierung und Charakterisierung relevanter Gene

Die Identifizierung und Klonierung der Gene *BCR* und *ABL* bei der Philadelphia-Translokation t(9;22)(q34;q11), der Gene *PML* und *RARA* bei der akuten Promyelozytenleukämie mit 15;17-Translokation, des *MLL*-Gens bei verschiedenen 11q23-Anomalien und vieler anderer, bei der AML von Rearrangements betroffener Gene haben ihren Ausgang von der Kenntnis spezifischer Chromosomenbruchpunkte genommen, die den charakteristischen Translokationen bzw. Inversionen zugrunde liegen (s. Abschnitt 3.3.4 „Molekulargenetische Befunde bei der AML“).

Allerdings ist noch eine Reihe von chromosomalen Strukturanomalien bezüglich der Gene, die darin involviert sind, unaufgeklärt, z.B. die parazentrische Inversion inv(3). Auch von den etwa 40

Translokationspartnern des in 11q23 lokalisierten *MLL*-Gens wurden erst etwa die Hälfte identifiziert und kloniert. Welche Rolle Gene beim Zugewinn oder Verlust ganzer Chromosomen spielen, z.B. bei den Trisomien 8 oder 11 bzw. den Monosomien 5 und 7, ist ebenfalls noch weitgehend unbekannt (Lai et al. 2001).

3.3.3.3 Resümee

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Bedeutung des zytogenetischen Befunds bei akuten myeloischen Leukämien mit Zunahme der Datenfülle wächst und dass verbindlichere Aussagen, z.B. über den Krankheitsverlauf, möglich werden. Parallel dazu haben intensiviertere Bemühungen, therapeutische Ansätze zu kreieren, die direkt auf den genetischen Defekt abzielen, Früchte gezeitigt, wie am Beispiel der Translokation 15;17 bei der akuten Promyelozytenleukämie zu demonstrieren ist, die auf ATRA-Therapie anspricht. Solche therapeutischen Modalitäten basieren auf zytogenetischen und, in Konsequenz, molekulargenetischen Erkenntnissen. Zukünftige Aufgabe der Zytogenetik wird daher sein, durch die Entwicklung und den Einsatz verfeinerter Methoden den Einblick in Mechanismen der malignen Transformation und Metastasierung zu erweitern und damit auch einen Beitrag zur Bekämpfung der akuten myeloischen Leukämien zu leisten.

3.3.4 Molekulargenetische Befunde bei der AML

3.4.4.1 Translokationen und Inversionen mit Beteiligung des Core-binding-Faktors (CBF): t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13q22), t(16;16)(p13;q22)

Der Core-binding-Faktor (CBF) ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, der bei der Aktivierung der Transkription von vielen Genen von Bedeutung ist. Einige dieser Gene (Interleukin-3, Myeloperoxidase, GM-CSF, M-CSF-Rezeptor und T-Zell-Rezeptor-Enhancer) spielen in der Hämatopoese eine wichtige Rolle. Beide Komponenten des heterodimeren CBF-Transkriptionskomplexes, CBF α (Synonym: AML1) und CBF β , können in chromosomale Translokationen bzw. eine Inversion involviert sein, die mit einer AML assoziiert sind.

AML1-ETO

Die Translokation (8;21) ist eine der häufigsten genetischen Veränderungen bei der AML und wird bei ungefähr 15% der erwachsenen Patienten gefunden (Heim u. Mitelman 1995). Als Folge dieser Translokation kommt es zur Fusion des *AML1*(*CBF α*)-Gens von Chromosom 21q22 mit dem *ETO*(eight twenty-one)-Gen von Chromosom 8q22 (Nucifora et al. 1993 a,b; Gao et al. 1991; Miyoshi et al. 1991). Das AML1-ETO-Fusionsprotein ist ein dominanter Inhibitor der Aktivierung der Transkription durch das AML1/*CBF α* -Wildtypprotein (Abb. 3.3.13) (Meyers et al. 1993, 1995).

Die Analyse von *AML1-ETO*-„knock-in“-Mäusen lieferte Hinweise für die dominant-negative Inhibierung der normalen AML1-Funktion durch das AML1-ETO-Fusionsprotein. Die heterozygoten Mäuse (sie besitzen ein *AML1-ETO*-Allel und ein *AML1*-Wildtypallel) zeigten genau den gleichen Phänotyp wie die *aml1*-/-Mäuse; d.h. die Regula-

tion der normalen hämatopoetischen Entwicklung durch AML1 wurde von dem *AML1-ETO*-Allel dominant unterdrückt.

Durch die *AML1-ETO*-Translokation entsteht meist eine spezielle Form der Leukämie, eine akute Myeloblastenleukämie mit Ausreifung, AML M2. Diese Leukämien reagieren gut auf konventionelle Chemotherapien mit Hochdosis-Zytosin-Arabinosid (HD-Ara-C) und sind durch hohe Remissionsraten und lang andauerndes krankheitsfreies Überleben charakterisiert. Das Fusionstranskript *AML1-ETO* kann in den Patienten bis zu 10 Jahre nach Erreichen der kompletten hämatologischen und zytogenetischen Remission sowohl nach Chemotherapie als auch nach autologer Knochenmarkstransplantation nachgewiesen werden. (Chang et al. 1993; Dowing et al. 1993; Guerrasio et al. 1995; Jurlander et al. 1997; Kozu et al. 1993; Kusec et al. 1994; Nucifora et al. 1993 a,b; Saunders et al. 1994).

CBF β -MYH11

Sowohl die *inv*(16)(p13q22) als auch die *t*(16;16)(p13;q22) führen zur Fusion der Core-binding-Faktor β (*CBF β*)-Untereinheit in der Chromosomenbande 16q22 mit dem Smooth-muscle-myosin-heavy-chain(*SMMHC*, *MYH11*)-Gen in der Chromosomenbande 16p13. *CBF β* ist der heterodimere Partner von AML1; beide zusammen bilden den Transkriptionsfaktor CBF. Der Bruchpunkt im *CBF β* -Gen liegt hochkonserviert in einer Domäne, die für die Interaktion mit *AML1*/*CBF α* wichtig ist. Der Mechanismus der malignen Transformation durch *CBF β -MYH11* ist noch nicht vollständig bekannt. Das *CBF β -MYH11*-„knock-in“-Mausmodell zeigt denselben Phänotyp wie *aml1*-/- und *AML1-ETO*-„knock-in“ Mäuse und unterstützt damit die Hypothese, dass das *CBF β -MYH11*-Fusionsprotein ebenfalls ein dominanter Inhibitor des CBF-Transkriptionsfaktors ist (Castilla et al. 1996; Sasaki et al. 1996; Wang et al. 1996 a,b).

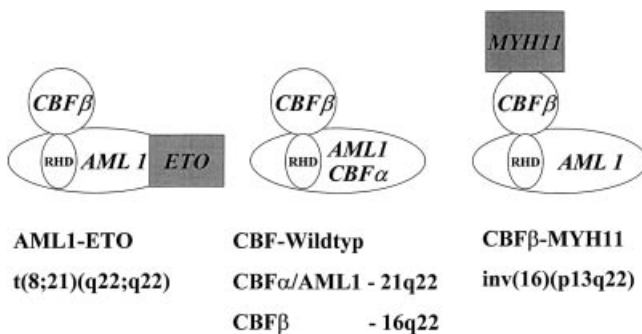


Abb. 3.3.13. Core-binding-Faktor. Der normale Core-binding-Faktor (CBF) besteht aus 2 Untereinheiten, *CBF α* (AML1) und *CBF β* . Beide Komponenten können in chromosomale Anomalien involviert sein. Bei der t(8;21), die v.a. bei der AML M2 gefunden wird, fusioniert das *AML1*-Gen (Chromosomenbande 21q22) mit dem *ETO*-Gen (Chromosomenbande 8q22). Bei der *inv*(16), die bei der AML M4Eo beobachtet wird, fusioniert das *CBF β* -Gen (Chromosomenbande 16q22) mit dem Smooth-muscle-myosin-heavy-chain(*MYH11*)-Gen (Chromosomenbande 16p13)

Klassifikation und Prognose

Patienten mit AML und t(8;21)(q22;q22) werden in ungefähr 90% als FAB M2 und in etwa 6% der Fälle als FAB M1 subklassifiziert (Heim u. Mitelman 1995). Diese Translokation wird häufiger bei jüngeren (unter 60 Jahren) als bei älteren Patienten gefunden (Dastugue et al. 1995). Extramedulläre Ansammlungen von Leukämiezellen (v.a. paraspinal) zum Zeitpunkt der Diagnose stellen einen schlechten Prognosefaktor dar (Byrd et al. 1997). Es wurde berichtet, dass Patienten mit t(8;21)(q22;q22) und Leukämiezellen, die das NK-Zell- bzw. Stammzellantigen CD56 exprimieren, eine signifikant kürzere Remissionsdauer aufweisen als Patienten ohne CD56-Expression (Baer et al. 1997).

Patienten mit AML und inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22) präsentieren sich meist als akute myelomonozytäre Leukämie mit dysplastischer Eosinophilie – FAB M4Eo. Eine Assoziation mit anderen Subtypen (meist FAB M4 und M2), dem myelodysplastischen Syndrom und der Blastenkrise der CML wurde jedoch ebenfalls beschrieben (Le Beau et al. 1983). inv(16)(p13q22) und t(16;16)(p13;q22) sind oft mit hohen initialen Leukozytenzahlen, Lymphadenopathie, Hepatomegalie und ZNS(Zentralnervensystem)-Befall im Rezidiv assoziiert.

Bei CBF-assoziierten Leukämien werden die höchste Remissionsrate (ungefähr 90%) und das längste krankheitsfreie Überleben nach 5 Jahren (ungefähr 50%) von allen de novo AML erreicht. Die guten Ergebnisse bei Patienten mit CBF-Gen-Rearrangements werden auf eine erhöhte Sensitivität der Leukämiezellen gegenüber Zytosin-Arabinosid (Ara-C) zurückgeführt, das in Kombination mit Anthrazyklinen das Grundgerüst der AML-Therapie darstellt (s. Abschnitt 3.3.5 „Therapiestrategien bei akuten myeloischen Leukämien“).

Molekulare Diagnostik

Die genomischen Bruchpunkte des *AML1*- (Intron 5) und des *ETO*-Gens liegen bei allen bisher untersuchten Patienten in den gleichen Introns, sodass mit der RT-PCR nur ein einziges *AML1-ETO*-Fusionstranskript detektiert werden kann. Da RT-PCR-Analysen gezeigt haben, dass *AML1-ETO*-Fusionstranskripte auch bei Patienten mit Langzeitremission, sowohl nach konventioneller Chemotherapie als auch nach autologer und allogener Knochenmarktransplantation, vorhanden sind, ist nur mittels quantitativer RT-PCR das Ausmaß der Restleukämie festzustellen und die Kinetik der Erkrankung einzuschätzen. Etwa 2–4 Monate vor einem Rezidiv ist in der Regel ein Anstieg der *AML1*-

ETO-Fusionstranskripte zu beobachten. Patienten mit einem drohenden Rezidiv können mit quantitativer RT-PCR früh identifiziert und einer therapeutischen Intervention zugeführt werden (Marcucci et al. 1998; Tobal et al. 2000).

Bei Patienten mit inv(16) oder t(16;16) finden sich auf molekularer Ebene sehr heterogene *CBFβ-MYH11*-Fusionstranskripte. Diese Heterogenität entsteht durch variable genomische Bruchpunkte in den betroffenen Genen *CBFβ* und *MYH11* und durch alternatives Spleißen der mRNA-Vorstufen. Der Typ „A“ des *CBFβ-MYH11*-Fusionstranskripts (Fusion von Nukleotid 495 der *CBFβ*-mRNA und Nukleotid 1921 der *MYH11*-mRNA) wird bei mehr als 80% der Patienten mit inv(16) oder t(16;16) gefunden. Zumindest 7 weitere Varianten (Typ B–H) wurden bisher beschrieben; sie machen aber in der Summe weniger als 20% der Fälle aus (Claxton et al. 1994; Liu et al. 1995; van der Reijden et al. 1995). Es ist derzeit noch nicht geklärt, ob die verschiedenen Fusionstranskripte eine unterschiedliche biologische oder klinische Bedeutung haben.

3.3.4.2 Translokationen mit Beteiligung des Retinsäurerezeptora(*RARA*)-Gens: t(15;17)(q22;q21)

Die akute Promyelozytenleukämie (APL) oder AML FAB M3 gehört zu den am besten charakterisierten klinisch-genetischen Entitäten und wird bei ungefähr 5–8% der Fälle mit AML diagnostiziert. Der APL-Phänotyp (sowohl die hyper- als auch die mikrogranuläre Form der AML M3) ist mit chromosomalen Translokationen assoziiert, die das *RARA*-Gen in der Chromosomenbande 17q21 involvieren. In fast allen Fällen der APL ist die Ursache eine t(15;17)(q22;q21), die zur Fusion des *RARA*-Gens mit dem *PML*-Gen führt (Kakizuka et al. 1991; de Thé et al. 1990, 1991). In seltenen Fällen findet man eine Fusion des *RARA*-Gens mit dem *PLZF*-Gen (in der Chromosomenbande 11q23 lokalisiert) (Chen et al. 1994), dem *NPM*-Gen (5q31) (Corey et al. 1994) oder mit dem *NUMA*-Gen (11q13). Die APL ist bisher eine der wenigen neoplastischen Erkrankungen, die mit einem Therapeutikum, das direkt gegen den kausalen genetischen Defekt gerichtet ist, erfolgreich behandelt werden kann. Die APL war einst durch eine sehr hohe Frühmortalitätsrate und eine sehr bescheidene Rate an Langzeitremissionen (ungefähr 30%) charakterisiert. Die derzeitige hohe Rate an Langzeitremissionen (ungefähr 70–80%) ist auf die krankheitskausale Therapie mit all-trans-Retinsäu-

re (ATRA) zurückzuführen, die eine Differenzierung der APL-Zellen induziert (Huang et al. 1998; Fenaux et al. 1992; Warrell et al. 1994; Tallman et al. 1997).

Molekulare Pathogenese

RARA ist ein bei der Transkription aktives Protein, das eine DNA bindende Zinkfingerdomäne und eine Liganden-bindende Domäne für die Interaktion mit Retinsäurederivaten besitzt. Das PML-Protein enthält ebenfalls Zinkfingerdomänen und spielt in der Regulation von Zellzyklus und Apoptose eine Rolle. Es ist in spezifischen nukleären Strukturen, den Kernkörperchen oder „pods“ (PML oncogenic domains), lokalisiert, die durch eine Antikörperfärbung nachgewiesen werden können. Bei der APL wird durch die Fusion von PML mit RARA die Struktur dieser Kernkörperchen verändert, sodass sie als nukleäre „speckles“ erscheinen (Dyck et al. 1994).

PML-RARA bildet einen Komplex mit dem nukleären Korepressor (NCoR) und Histondeazetylase (HDAC) und unterdrückt die Transkription von RARA-Zielgenen (Abb. 3.3.14) (Grignani et al. 1998; He et al. 1998; Lin et al. 1998). Im Gegensatz zum normalen RARA-Protein wird die Wechselwirkung von PML-RARA mit NCoR und HDAC bei physiologischen Konzentrationen von Retinsäure nicht aufgehoben. PML-RARA bleibt an die Promotorregion der Zielgene gebunden und funktioniert als Repressor der Transkription. Bei pharmakologischen Konzentrationen von Retinsäure wird die Bindung des PML-RARA an den nukleären Korepressor gelöst. PML-RARA kann nun den nukleären Koaktivator-Histonazetylase-Komplex binden und ein Aktivator

der Transkription werden. Die Ursache für die festere Bindung des nukleären Korepressors an PML-RARA ist noch nicht bekannt. Es ist jedoch vorstellbar, dass der PML-Anteil des Fusionsproteins die Interaktion zwischen RARA und dem nukleären Korepressor stabilisiert. Die Bindung des nukleären Korepressors an PLZF-RARA kann durch Retinsäure nicht gelöst werden. Es zeigte sich, dass in der aminoterminalen POX-Domäne (Pox-Virus und Zinkfinger) des PLZF-Proteins eine 2. Bindungsstelle für den nukleären Korepressor existiert, die durch Retinsäure nicht beeinflusst wird. Diese Bindungsstelle ist für die starke Inhibierung der Transkription durch PLZF verantwortlich.

Klassifikation und Prognose

Die Identifikation der APL ist für Therapie und Prognose in zweierlei Hinsicht bedeutend.

1. Diese Form der Leukämie ist ein medizinischer Notfall, und bis zu 10% der Patienten verstarben früher sogar bei optimaler Therapie rasch, z.T. aufgrund der schweren Gerinnungsstörungen, die mit dieser Erkrankung assoziiert sind.
2. Die optimale Behandlungsstrategie, die auch die Kontrolle der lebensbedrohenden Koagulopathie erlaubt, beinhaltet die zusätzliche Verabreichung von ATRA zur Chemotherapie und unterscheidet sich somit von der Behandlung anderer AML-Subtypen.

Die morphologische Diagnostik scheint bei den meisten Patienten mit der hypergranulären Variante der APL zuverlässig zu sein. Die mikrogranuläre Variante der APL kann morphologisch nicht sicher identifiziert werden, da sie häufig nur schwer von der akuten Myeloblastenleukämie mit Ausreifung

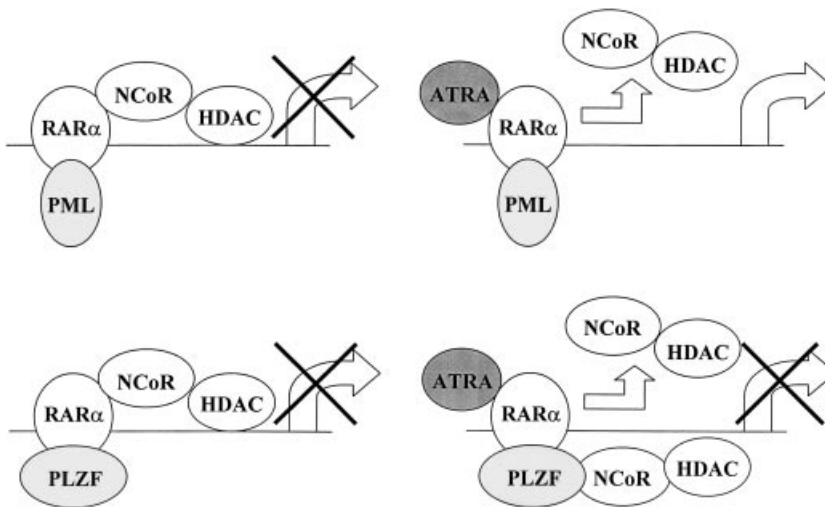


Abb. 3.3.14. PML-RARA, assoziiert mit dem nukleären Korepressor (NCoR) und Histondeazetylase (HDAC), blockiert dadurch die RARA-medierte Transkription und Differenzierung. Pharmakologische Konzentrationen von all-trans-Retinsäure (ATRA) lösen die Bindung an den NCoR-HDAC-Komplex. Im Gegensatz dazu rekrutiert PLZF-RARA einen 2. NCoR-HDAC-Komplex, der durch ATRA nicht gelöst werden kann

(M2) und der akuten myelomonozytären Leukämie (M4) zu unterscheiden ist. ATRA induziert die Differenzierung und Ausreifung nur in Leukämiezellen, die das PML-RARA-Fusionsprotein exprimieren. Die mikrogranuläre Variante der APL spricht ebenso wie die hypergranuläre Variante gut auf eine Therapie mit ATRA an. Im Gegensatz dazu zeigen Leukämiezellen, die morphologisch einer APL entsprechen, jedoch variante Fusionsproteine wie PLZF-RARA exprimieren, kein Ansprechen auf eine Therapie mit ATRA.

Molekulare Diagnostik

Das RARA-Gen, in der Chromosomenbande 17q21 lokalisiert, bricht konstant im 2. Intron, während das PML-Gen, das in 15q22 liegt, 3 unterschiedliche genomische Bruchpunktregionen besitzt:

1. Brüche im PML-Intron 3 führen zu einem PML-Exon-3-RARA-Exon-3-Fusionstranskript (bcr3- oder „S“/„short“-Form).
2. Brüche im PML-Intron 6 führen zu einem PML-Exon-6-RARA-Exon-3-Fusionstranskript (bcr1- oder „L“/„long“-Form).
3. Brüche im PML-Exon 6 führen zu einem PML-Exon-6-RARA-Exon-3-Fusionstranskript, in dem jedoch ein Teil des PML-Exons 6 fehlt (bcr2- oder „V“/„variant“-Form).

Diese unterschiedlichen PML-RARA-Isoformen können durch eine RT-PCR sehr präzise und sensitiv (10^{-4}) nachgewiesen werden (Huang et al. 1993; Miller et al. 1993; Warrell et al. 1993, 1994). Die RT-PCR kann daher zur Detektion von minimaler Resterkrankung eingesetzt werden. Die Isolierung von qualitativ hochwertiger RNA, eine effiziente reverse Transkription und die Kontrolle des eingesetzten Materials durch Amplifikation eines Kontrollgens sind Grundvoraussetzungen für die Analyse der minimalen Resterkrankung.

3.3.4.3 Translokationen mit Beteiligung des MLL-Gens

Strukturelle Veränderungen der chromosomalen Bande 11q23 werden bei akuten Leukämien sehr häufig beobachtet. Durch Klonierung der Bruchpunktregionen konnte das MLL-Gen identifiziert werden, das mit bis zu 40 verschiedenen chromosomalen Partnern in reziproke Translokationen involviert sein kann (Thirman et al. 1993). Der Name MLL steht für „myeloid-lymphoid leukemia“ oder „mixed lineage leukemia“, da strukturelle Veränderungen dieses Gens sowohl bei der ALL

(5% der Erwachsenen, 50–60% der Kinder unter 1 Jahr) als auch bei der de novo AML (5%), bei der sekundären AML nach Behandlung mit Topoisomerase-II-Inhibitoren (>85%) und bei biphenotypischen Leukämien zu finden sind. Andere Bezeichnungen für dieses Gen lauten ALL1, da das Gen erstmals bei einem Patienten mit ALL identifiziert wurde, oder HRX bzw. HTRX aufgrund der starken Homologien zum Drosophila-Trithoraxgen.

Molekulare Pathogenese

MLL kodiert für ein 3972 Aminosäuren langes Protein, das eine große Ähnlichkeit mit dem komplexen Drosophila-Trithoraxprotein aufweist. Dieses Protein reguliert die Transkription von Homöotdeloboxgenen (Antennapedia- und Bithoraxkomplex), die für die Anordnung der embryonalen Segmente entlang der antero-posterioren Achse entsprechend dem Grundbauplan des Embryos und somit für die normale Entwicklung von Drosophila verantwortlich sind (Breen et al. 1991, 1993; Lewis 1978; Mazo et al. 1990; Sedkov 1994). Die normale Funktion des humanen MLL-Proteins ist noch wenig bekannt. Es ist jedoch anzunehmen, dass das humane MLL-Protein, ähnlich wie das Drosophila-Trithoraxprotein, ein Regulator der homöotischen Genexpression ist (Kennison 1993). Die Homöoboxgene wurden im Verlauf der Evolution konserviert und sind von Drosophila bis zu den Wirbeltieren (hier als HOX-Gene bezeichnet) fast identisch. Versuche mit transgenen Mäusen zeigten die große Bedeutung des MLL-Gens für die Regulation der homöotischen Gene und in der Folge für die Säugetierentwicklung. MLL-defiziente homozygote (mll^{-/-}) Mäuse starben bereits während der Embryonalentwicklung, heterozygote (mll^{+/-}) Mäuse zeigten Defekte bei der axialen Skelettentwicklung und in der Hämatopoese (Yu et al. 1995). In MLL^{-/-}-Knockout-Zellen konnte die Blockierung der hämatopoetischen Differenzierung auch in vitro nachgewiesen werden (Fidanza et al. 1996). Das aminoterminal Ende des MLL-Proteins enthält ein „AT-hook“-Motiv, das die Bindung des MLL-Proteins an die kleine Furche der DNA ermöglicht (Reeves u. Nissen 1992). Nahe dem aminoterminalen Ende befindet sich eine Region mit Homologie zur regulatorischen Domäne von DNA-Methyltransferasen (Ma et al. 1993). Die funktionelle Rolle dieser Region ist noch nicht bekannt, sie könnte jedoch bei der Erkennung der Chromatinstruktur von Bedeutung sein. Das C-terminale Ende von MLL enthält die während der Evolution stark konservierte SET-Domäne. Diese interagiert mit Proteinen, die wiederum an der

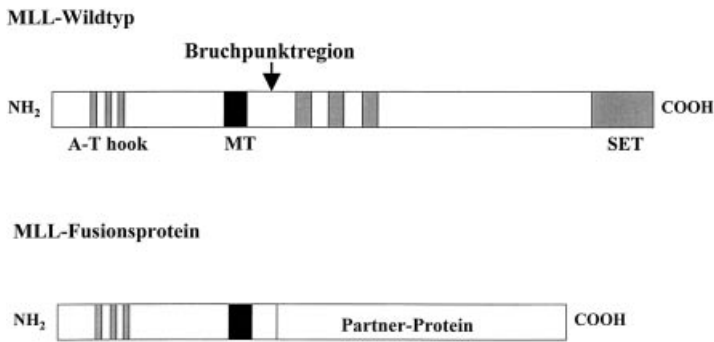


Abb. 3.3.15. MLL-Fusionsprotein. Bei Translokationen mit Beteiligung des *MLL*-Gens wird ein MLL-Fusionsprotein exprimiert, das aus dem N-terminalen Anteil des MLL-Wildtypproteins und dem C-terminalen Anteil eines Partnerproteins besteht

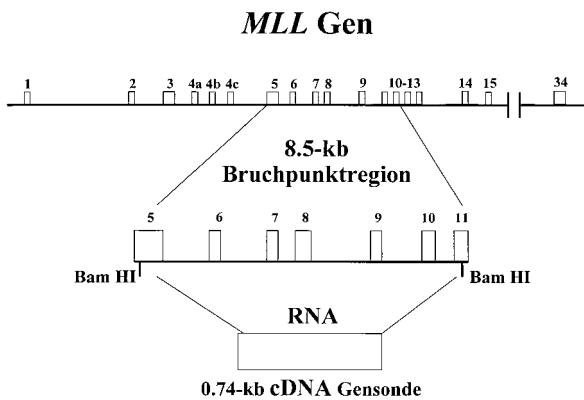


Abb. 3.3.16. Das *MLL*-Gen bricht in einer 8,5 kb großen Bruchpunktregion, die die Exons 5–11 umspannt. Durch eine Southern Blot-Analyse mit einer 0,74 kb großen cDNA-Gensonde können alle *MLL*-Anomalien detektiert werden

ATP-abhängigen Modifizierung des Chromatins beteiligt sind (Rozenblatt-Rosen et al. 1998).

Es sind derzeit etwa 30–40 Gene bzw. Chromosomenbanden bekannt, die an Translokationen mit dem *MLL*-Gen beteiligt sein können. Diese Partnergene kodieren häufig für sehr unterschiedliche Proteine (Abb. 3.3.15). Die Translokationen des *MLL*-Gens führen zu Fusionen im Leseraster und damit zur Expression von Fusionsproteinen. Obwohl das *MLL*-Gen sehr groß ist, ereignen sich alle Brüche in einer nur 8,5 kb großen Bruchpunktregion, die die Exons 5–11 umspannt (Abb. 3.3.16). Die Fusion des 5'-Endes von *MLL* mit dem 3'-Ende des Partnergens führt zur Entstehung des leukämogenen Fusionsproteins (Domer et al. 1993, Rowley 1992). Diese Fusionsproteine enthalten nur das AT-hook-Motiv und das DNA-Methyltransferase-Motiv von MLL gekoppelt an den jeweiligen Fusionspartner. Es ist noch unklar, ob die unterschiedlichen MLL-Fusionsproteine die hämatopoetischen Zellen durch einen gemeinsamen Mechanismus, wie etwa durch den Bruch des MLL-Pro-

teins und den Verlust der SET-Domäne, transformieren oder ob die unterschiedlichen Fusionspartner mit ihren funktionellen Motiven ebenfalls zur Leukämogenese beitragen.

Klassifikation und Prognose

Trotz der Variabilität der chromosomalen Partner zeigen die leukämischen Zellen von Patienten mit AML und *MLL*-Anomalien meist eine monozytäre Differenzierung und werden als FAB M4 oder M5 subklassifiziert (Bower et al. 1994). Auch Fälle mit partieller Duplikation des *MLL*-Gens wurden beschrieben – diese werden üblicherweise als M1 oder M2 diagnostiziert. Akute Leukämien mit *MLL*-Rearrangements exprimieren häufig sowohl myeloische als auch lymphatische Antigene (Thirman et al. 1993).

Patienten mit Anomalien des *MLL*-Gens zeigen oft einen aggressiven Krankheitsverlauf. Das Auftreten eines *MLL*-Rearrangements wird generell mit einer schlechten Prognose in Zusammenhang gebracht. Die bei der de novo AML des Erwachsenen erhobenen Daten sind allerdings nicht einheitlich. Eine Studie von Kindern mit AML zeigte, dass Patienten mit einer t(9;11)(p22;q23) eine signifikant bessere Prognose haben als Patienten mit Translokation zwischen 11q23 und anderen Partnerchromosomen (Martinez-Climent et al. 1995). In einer ähnlichen Studie konnte auch für erwachsene Patienten mit primärer AML und t(9;11)(p22;q23) ein günstigerer klinischer Verlauf als für Patienten mit anderen 11q23-Translokationen gefunden werden (Mitterbauer et al. 1999; Mrozek et al. 1997). Es sollte erwähnt werden, dass die Patienten dieser Studie sowohl als Induktions- als auch als Konsolidierungstherapie hochdosiertes Zytosin-Arabinosid erhielten. Bei Bestätigung dieser Ergebnisse durch prospektive Studien könnten derartige Chemotherapieprotokolle die Therapie der Wahl für Erwachsene mit primärer AML und

t(9;11)(p22;q23) werden. Für Patienten mit anderen *MLL*-Translokationen, die bei einer Behandlung mit konventioneller Chemotherapie eine schlechte Prognose haben, sollten eine allogene Stammzelltransplantation in erster kompletter Remission oder alternative therapeutische Ansätze in Betracht gezogen werden.

Molekulare Diagnostik

Durch eine Southern Blot-Analyse mit einer cDNA-Gensonde, die die gesamte *MLL*-Bruchpunktregion von Exon 5–11 umspannt, können alle *MLL*-Anomalien identifiziert werden, die auf Translokationen beruhen. Die Southern Blot-Analyse ist daher eine ideale Screeningmethode; sie liefert jedoch keine Informationen über die beteiligten Fusionspartner. Durch eine RT-PCR mit spezifischen Oligonukleotidprimern für das *MLL*- und das Partnergen ist es möglich, spezifische Fusionstranskripte zu amplifizieren und zu detektieren. Die hohe Sensitivität der RT-PCR erlaubt die Beobachtung der Dynamik des leukämischen Klon im Verlauf der Erkrankung. Bei Patienten mit *MLL*-*AF9*-positiver AML scheint eine schnelle Reduktion der leukämischen Zellen unter die Nachweisgrenze der RT-PCR eine Voraussetzung für Langzeitremissionen zu sein und sollte daher als therapeutisches Ziel angestrebt werden (Mitterbauer et al. 1999). Verlaufsuntersuchungen bei Patienten mit *MLL*-*AF6*-positiver AML zeigten, dass diese Patienten zwar häufig eine morphologische Remission, jedoch nur selten eine molekulare Remission erreichen und generell eine sehr schlechte Prognose haben (Mitterbauer et al. 2000 a, b).

3.3.4.4 Resümee

Eine Subklassifikation der AML, die auf den kausalen genetischen Veränderungen beruht, ermöglicht eine exaktere Einteilung in prognostisch einheitliche Gruppen als die bisher verwendete FAB-Subklassifikation, die sich v. a. auf morphologische Kriterien bezieht. Durch das Verstehen der molekularen Pathogenese wird es in Zukunft möglich sein, für funktionell definierte Subgruppen der AML Therapien zu entwickeln, die direkt in den Prozess der Leukämogenese eingreifen. Durch die Verabreichung dieser optimierten krankheitsspezifischen Therapien erhofft man sich in Subgruppen mit derzeit schlechter Prognose eine deutliche Verbesserung der klinischen Resultate.

Der Nachweis von minimaler Resterkrankung mit hochsensitiven Methoden hat in Abhängigkeit

von der zugrunde liegenden genetischen Veränderung eine jeweils unterschiedliche Bedeutung und sollte immer im Zusammenhang mit den klinischen Daten kritisch interpretiert werden. Durch die Quantifizierung der minimalen Resterkrankung wird es möglich sein, Patienten mit hohem Rezidivrisiko von Patienten in Langzeitremission zu unterscheiden und eine an den individuellen Krankheitsverlauf optimal angepasste Therapie zu verabreichen.

3.3.4.5 Zukunft der molekularen Diagnostik

Die Forderung nach neuen diagnostischen Werkzeugen, die die gleichzeitige Analyse vieler Gene ermöglichen, hat die Entwicklung der DNA-Chip-Technologie in den letzten Jahren rasch vorangetrieben. Neben der Detektion von Pathogenen ermöglicht diese Technologie die Feststellung von Unterschieden in den Expressionsmustern von Genen in unterschiedlichen Zellpopulationen sowie die Analyse der Expression krankheitsrelevanter Gene bei Patienten im Vergleich zu gesunden Personen.

Zurzeit werden 2 unterschiedliche Techniken für die Untersuchung der Genexpression eingesetzt:

- Oligonukleotidmikroarrays und
- cDNA-Mikroarrays.

Beide Technologien beruhen auf der Messung von Fluorochromen. Durch gleichzeitige Hybridisierung von 2 mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Proben können eine bessere Normalisierung und Vergleichbarkeit von z. B. 2 Zellpopulationen erzielt werden. Die matrixbasierte, vergleichende Genomhybridisierung (matrix comparative genome hybridisation, Matrix-CGH) erlaubt den Nachweis von Zugewinn bzw. Verlust von Nukleinsäurematerial in komplexen Gemischen mit einer bisher nicht gekannten hohen Auflösung. Im Unterschied zur chromosomalen CGH, die aufgrund der hohen technischen Anforderungen nur in Forschungslabors angewendet wird, ist zu erwarten, dass die DNA-Mikroarray-Technologie, die sich hervorragend automatisieren lässt, Einzug in die diagnostische Routine finden wird.

Man kann davon ausgehen, dass in absehbarer Zeit verschiedene Matrixchips für unterschiedliche Anwendungen verfügbar sein werden. Vorstellbar sind z. B. ein Chip mit dem gesamten Genom in Fragmenten von 100 kb Länge sowie Chips für bestimmte Fragestellungen, wie z. B. die Zuordnung

eines Patienten zu einer bestimmten Tumorklasse (AML vs. ALL). Mit dem Genomchip wären Genamplifikationen und -deletionen nicht nur sofort feststellbar, sondern die Genomregionen, die an der Amplifikation bzw. Deletion beteiligt sind, könnten rasch genau zugeordnet werden. Diese Chiptechnologie wird in der Zukunft ein ideales Werkzeug zum Screenen von Mikrodeletionen darstellen und speziell in Fällen mit unklarem Chromosomenbänderungsmuster zu eindeutigen Resultaten beitragen. Darüber hinaus eröffnet die Chiptechnologie die Möglichkeit für ein umfangreiches Studium von Genexpressionsprofilen. Wie bereits erwähnt, ist die Entstehung der akuten myeloischen Leukämie (AML) wesentlich durch eine Dysregulation von Genen, die in der normalen Entwicklung der Myelopoese eine wichtige Rolle spielen, bedingt. Während die beteiligten Transkriptionsfaktoren z.T. bereits identifiziert werden konnten, befindet sich die Erforschung der dysregulierten Gene erst am Anfang. Die Mikroarray-technologie bietet sich zur Untersuchung der Genexpression bei Leukämien an (Lockhart et al. 1996; Schena et al. 1996).

Mit Hilfe der Methode konnten bereits neue Erkenntnisse über die biologischen Mechanismen, die für die Entstehung der Leukämien relevant sind, gewonnen werden (Tamayo et al. 1999). Darüber hinaus zeigten Golub et al. (1999), dass mit Hilfe der Mikroarrayanalyse Patientenproben zum Zeitpunkt der Diagnose sehr zuverlässig einer Klasse, die auf dem Genexpressionsmuster basiert, zugeordnet werden können. Bisher erfolgt die Klassenzuordnung, wie im ersten Teil des Beitrags ausgeführt, aufgrund des morphologischen Erscheinungsbilds der Tumorzellen. Obwohl die morphologische Zuordnung in der Regel recht zuverlässig ist, gibt es doch Berichte, dass Tumorerkrankungen mit ähnlichem histopathologischem Erscheinungsbild unterschiedlich verlaufen können.

Die Zuordnung von Patientenproben zu molekular definierten Subgruppen wird eine genauere Einschätzung der Prognose der leukämischen Erkrankungen und in der Folge die Verabreichung von optimalen, krankheitsspezifischen Therapien ermöglichen.

3.3.5 Therapiestrategien bei akuten myeloischen Leukämien

3.3.5.1 Einleitung

Die Therapie der akuten myeloischen Leukämie (AML) besteht aus der Induktionstherapie und der Konsolidierungstherapie. Bei manchen Subtypen, z.B. M 3, ist zusätzlich eine Erhaltungstherapie erforderlich (Burnett 1999; Estey et al. 1997; Fenaux et al. 1999; Mayer et al. 1994; Mrozek et al. 1997). Zytogenetische und molekulargenetische Befunde spielen in allen Phasen der Behandlung eine bedeutende Rolle bei Therapieentscheidungen. Sie ergänzen einander, indem der prätherapeutische zytogenetische Befund der wahrscheinlich wichtigste prognostische Faktor ist, der eine bedeutende Rolle bei der Wahl der Konsolidierungstherapie spielt, z.B. für die Entscheidung zur Stammzelltransplantation (stem cell transplantation, SCT) in erster kompletter Remission (CR) oder die Art der Chemotherapie [bei t(15;17) und t(8;21)] (Slovak et al. 2000; Mandelli et al. 1997). In dieser Rolle ist die Zytogenetik der Molekularbiologie überlegen, da sie bei jedem Patienten ein aussagekräftiges Ergebnis liefert und chromosomale Veränderungen aufdecken kann, die (bisher) mit molekularen Methoden nicht erfassbar sind. Die Molekularbiologie spielt hier nur eine ergänzende Rolle, indem bei etwa 5–10% der Patienten molekulare Veränderungen aufgedeckt werden, die zytogenetisch nicht erfasst werden können (Langabeer et al. 1997; Mitterbauer et al. 1998, 2000 a,b). Die Domäne der Molekularbiologie ist das Monitoring der „minimal residual leukemia“ (MRL), dessen Ergebnisse Therapiestrategien während der Behandlung entscheidend modifizieren können (Jäger et al. 1996; Liu 1999). Etwa 40–50% aller akuten myeloischen Leukämien sind durch einen spezifischen Marker mittels Polymerasekettenreaktion erfassbar (Pallisgaard et al. 1998).

3.3.5.2 Remissions-Induktionstherapie

Das Ziel der Induktionstherapie besteht darin, die Leukämiezellmasse so weit (etwa 2–3 log) zu reduzieren, dass sich die normale Hämatopoese regenerieren kann. Für die Wahl der Induktionstherapie ist es essenziell, zu entscheiden, ob eine akute Promyelozytenleukämie (APL, FAB M3) oder ein anderer Subtyp der AML (M1, 2, 4–7) vorliegt, da sich die Therapiestrategien deutlich voneinander unterscheiden.

Tabelle 3.3.7. Leukämien mit molekularer Remission (MR)

Transkript	AML-Typ	Hämatologische CR	MR	Voraussetzung für CCR
<i>PML/RARA</i>	M3	>90%	>90%	Ja
<i>AML1/ETO</i>	M2	>90%?	>20%	Fraglich
<i>CBFβ/MYH11</i>	M4Eo	>90%	>50%	Ja
<i>MLL/AF9</i>	M5	>50%	<70%	Ja ^a
<i>MLL/AF6</i>	Verschiedene	>70%	20%	Ja ^a
<i>MLL/AF10</i>	Verschiedene	?	?	Ja ^a
<i>BCR/ABL</i>	Verschiedene	<70%	<20%	?

^a Noch zu wenige Daten für definitive Aussage (Mitterbauer et al. 1999, 2000).

Therapie der Promyelozytenleukämie

Bei der Promyelozytenleukämie besteht die Therapie in der Kombination von all-trans-Retinsäure (ATRA) und Chemotherapie (Fenaux et al. 1997). ATRA (ein Vitamin-A-Derivat) führt zur Inaktivierung des für die Promyelozytenleukämie charakteristischen *PML/RARA*-Fusionsproteins und damit zur Differenzierung (Chen et al. 1995). Voraussetzung für die Wirksamkeit von ATRA ist das Vorliegen der t(15;17)-Translokation bzw. des *PML/RARA*-Rearrangements, während die (seltene) M3 mit einer t(11;17) bzw. dem *PZLF1/RARA*-Rearrangement ATRA-refraktär ist (Chen et al. 1995). ATRA wird in einer Dosis von 45 mg/sqm täglich oral bis zum Eintreten der Remission verabreicht. Monotherapie mit ATRA kann zwar hämatologische Remissionen induzieren, es lassen sich jedoch in der Regel keine molekularen Remissionen erreichen (Fenaux et al. 1997, 2000). Allerdings konnte kürzlich gezeigt werden, dass durch lang dauernde i.v. Verabreichung von liposomalem ATRA auch molekulare Remissionen erzielt werden können (Estey et al. 1999).

Eine optimale Wirksamkeit ist nur dann zu erwarten, wenn ATRA mit einer Chemotherapie kombiniert wird. Als Chemotherapie wird entweder das auch bei anderen AML-Subtypen verwendete 3+7-Schema (s. unten; Fenaux et al. 1999) oder ein Anthrazyklin als Monotherapie (AIDA-Protokoll) verwendet (Mandelli et al. 1997). Mit beiden Schemata werden mehr als 90% hämatologische und molekulare CR erzielt (Tabelle 3.3.7). Prognostische Faktoren für das Erreichen einer CR sind Alter und Leukozytenzahl. Hauptkomplikationen sind neben Infektionen das Auftreten des so genannten Retinoidsyndroms (Tallmann et al. 2000).

Induktionstherapie bei anderen AML-Subtypen

Bei diesen Patienten besteht die Standardinduktionstherapie in der Kombination eines Anthrazyklins mit Zytosin-Arabinosid (Ara-C). Das klassische Schema besteht aus 45 mg/sqm Daunorubicin Tag 1–3 und einer Dauerinfusion von Ara-C, 100 mg/sqm Tag 1–7 (Büchner et al. 1999; Estey 1997). Es wurden zahlreiche Modifikationen dieses Protokolls erprobt, ohne dass eine eindeutige Überlegenheit einer dieser Modifikationen bewiesen werden konnte. Mit der Induktionstherapie kann im Durchschnitt bei 2/3 der Patienten eine CR erzielt werden. Die wichtigsten prognostischen Faktoren für das Erreichen einer CR sind Zytogenetik, Alter, Performancestatus und Leukozytenzahl (Slovak et al. 2000). Die Haupttoxizität ist die Knochenmarkdepression. Die schwere, lang andauernde Neutropenie führt bei fast allen Patienten zu Infektionen, die bei etwa 5% der Patienten unter 60 Jahren und bei 15% der Patienten über 60 Jahren zum Tod führt.

Die Induktionstherapie bei sekundären Leukämien unterscheidet sich im Prinzip nicht von der bei de novo AML. Die Erfolgsrate ist jedoch deutlich geringer (etwa 50%). Vorangehendes MDS und Zytogenetik sind die wichtigsten prognostischen Faktoren (Estey 2000; Ganser et al. 2000; Oosterveld u. de Witte 2000).

3.3.5.3 Postremissionstherapie (Konsolidierungstherapie)

Die Konsolidierungstherapie wird bei Patienten verabreicht, die eine hämatologische CR erreicht haben, mit dem Ziel, die Leukämiezellzahl weiter zu reduzieren, sodass (bisher unbekannte) körpereigene Mechanismen ein Wiederwachstum des Leukämiezellklons verhindern können. Die Konsolidierungstherapie kann in einer konventionellen Chemotherapie, einer Hochdosistherapie mit nachfolgender allogener oder autologer Stammzelltransplantation (SCT) oder allogener SCT nach reduzierter Konditionierung (nichtmyeloablative SCT) bestehen. Bei APL scheint eine Erhaltungstherapie mit ATRA bessere Ergebnisse zu bringen (Fenaux et al. 1999; Laczika et al. 2000). Der therapeutische Algorithmus ist sehr komplex und hängt von einer Reihe von Faktoren, wie primären Risikofaktoren für Rezidiv (Karyotyp, Alter, Leukozytenzahl), Ansprechen auf die Induktionstherapie (1, 2 oder 3 Zyklen bis zur CR) (Estey 2000) sowie der Verfügbarkeit eines Familien- oder Fremdsponders ab.

Bei Anwendung moderner Konsolidierungstherapien (Mayer et al. 1994) beträgt das

krankheitsfreie Überleben (disease-free survival, DFS) nach 5 Jahren etwa 40%. Die Therapie mit hoch dosiertem Ara-C (HiDAC) ist besonders bei den so genannten Core-binding-Faktor(CBF)-Leukämien mit *CBFβ/MYH11*- und *AML1/ETO*-Rearrangements wirksam (Liu et al. 1993; Bloomfield et al. 1998; Byrd et al. 1999; Strout et al. 1999). Zusätzliche autologe SCT nach intensiverer Konsolidierungstherapie verbessert das DFS und das Gesamtüberleben (overall survival, OS) (Burnett 1999; Slovak et al. 2000). Bei allogener SCT in erster CR ist eine Heilungsrate von 50–60% zu erzielen (Greinix et al. 1996). Die höchsten Heilungsraten sind bei Promyelozytenleukämie erreichbar (etwa 70%) (Mandelli et al. 1997; Sanz et al. 2000). Die Heilungsrate bei sekundären Leukämien ist bei Verabreichung einer Konsolidierungstherapie sehr gering (<10%). Mit allogener SCT lässt sich ein 5-Jahres-DFS von 25–30% (Michallet et al. 2000) erzielen.

3.3.5.4 Molekulare Remission (MR)

Eine molekulare Remission liegt vor, wenn mit einer sensitiven PCR-Methode keine leukämiespezifischen Transkripte im Knochenmark und peripheren Blut mehr nachweisbar sind. Es gibt derzeit keine exakte Definition der MR. In der Praxis spricht man dann von einer MR, wenn weniger als eine Leukämiezelle unter 10^{4-5} Zellen nachweisbar ist. Der Begriff der MR ist nur bei etwa 40–50% der AML anwendbar, bei denen ein leukämiespezifisches Transkript mit der PCR erfassbar ist (Pallisgaard et al. 1998). Diese Leukämien sind in Tabelle 3.3.7 zusammengefasst. Darüber hinaus gibt es unspezifischere, aber allgemeingültigere Parameter, die möglicherweise für das Monitoring von Wert sind, z. B. das Wilms-Tumor-Suppressorgen, *WT1* (Schmid et al. 1997).

Mit Ausnahme der M3 sind die Daten über die Inzidenz, den Zeitpunkt und die prognostische Bedeutung von molekularen Remissionen noch limitiert. Einige Schlussfolgerungen lassen sich schon jetzt ziehen.

1. Eine hämatologische Remission ist eine unabdingbare Voraussetzung für eine molekulare Remission (Laczika et al. 1994; Mandelli et al. 1997; LoCoco et al. 1999).
2. Eine MR kann gleichzeitig mit der hämatologischen CR eintreten, tritt aber meist erst während oder sogar nach Ende der Konsolidierung ein. Ob die Schnelligkeit des Erreichens einer MR prognostische Bedeutung hat, ist noch nicht

hinreichend evaluiert (Hebert et al. 1994; Laczika et al. 1998; Marcucci et al. 1997; Martin et al. 2000).

3. Mit Ausnahme von *AML1/ETO* (Kusec et al. 1994) dürfte das Nichterreichen einer MR ein ungünstiger prognostischer Faktor sein. Eine hohe Rezidivrate bei fehlender molekularer Remission wurde für *PML/RARA*, *CBFβ/MYH11*, *MLL/AF9* und *MLL/AF6* nachgewiesen (Claxton et al. 1994; Costello et al. 1997; LoCoco et al. 1999; Martinelli et al. 2000; Mitterbauer et al. 1999, 2000 a,b; Poirel et al. 1995). Allerdings ist noch nicht gesichert, dass das Nichterreichen einer MR unweigerlich ein Rezidiv zur Folge hat.
4. Das Erreichen einer MR dürfte bei den meisten Leukämietypen ein günstiger prognostischer Faktor sein, stellt allerdings keine Garantie für eine Langzeitremission dar. Auch Patienten mit MR können molekular und später hämatologisch rezidivieren (Korninger et al. 1994).
5. PCR-Negativität kann im peripheren Blut und Knochenmark gleichzeitig eintreten, häufig geht die PCR-Negativität im Blut der im Knochenmark voraus (Laczika et al. 1994).

Infolge der limitierten Anzahl von molekular beobachteten Patienten sind aber noch viele Phänomene ungeklärt. Es scheint, dass bei *PML/RARA* und *MLL/AF6* die meisten Patienten, die eine hämatologische Remission erreichten, auch eine MR erzielen, während dies bei *CBFβ/MYH11* und noch mehr bei *AML1/ETO* nicht der Fall zu sein scheint. Bei einem *CBFβ/MYH11*-Rearrangement tritt die MR häufig Monate (5–9) nach Erreichen der hämatologischen CR ein, manchmal erst Monate nach Ende der Konsolidierungstherapie. In den letztgenannten Fällen dürfte es sinnvoll sein, quantitative PCR-Methoden, wie kompetitive PCR oder real-time-PCR, zum Monitoring einzusetzen (Evans et al. 1997; Laczika et al. 1998; Krauter et al. 1999; Marcucci et al. 1998, 1999; Tobal et al. 2000; Wattjes et al. 2000).

Die therapeutischen Konsequenzen bei Erreichen oder Nichterreichen einer molekularen Remission sind noch nicht durch prospektive Studien gesichert. Aus den bisherigen Daten lassen sich jedoch folgende vorläufige Schlüsse ziehen: Patienten mit M3 in MR nach Konsolidierungstherapie sind keine Kandidaten für eine allogene und wahrscheinlich auch nicht für eine autologe SCT, da sie mit Chemotherapie allein eine ausgezeichnete Prognose haben. Umgekehrt sind Patienten ohne MR nach Konsolidierungstherapie sichere Kandidaten für eine allogene SCT (Geschwister oder

unverwandt), je nach Alter, nach Hochdosistherapie oder reduzierter Konditionierung (nicht myeloablative SCT) (Giralt et al. 1999). Eine autologe SCT ohne MR dürfte nicht effektiv sein (Meloni et al. 1997). Die gleichen Schlussfolgerungen könnten für Patienten mit *MLL/AF9*- und *MLL/AF6*-Rearrangement zutreffen, allerdings ist die Zahl der Beobachtungen noch sehr klein. Bei *CBFβ* ist die Beurteilung viel schwieriger, da MR noch nach mehr als 9 Monaten eintreten können.

Die quantitative PCR (kompetitive oder real-time-PCR) könnte insofern eine bessere Beurteilung erlauben, als die Kinetik der minimalen Rest-erkrankung schon während und unmittelbar nach der Konsolidierungstherapie erfasst werden kann, und daher Therapieentscheidungen früher und mit größerer Sicherheit getroffen werden können.

3.3.5.5 Monitoring der MRL bei Patienten in MR

Auch Patienten, die eine MR erreicht haben, haben noch ein substanzielles Risiko für ein Wiederauftreten der Erkrankung (Rezidiv). Das Monitoring soll bewirken, dass eine Zunahme des leukämischen Klon frühzeitig erkannt wird und therapeutische Maßnahmen eingeleitet werden können, bevor ein hämatologisches Rezidiv entsteht. Dies ist deshalb möglich, weil das molekulare Rezidiv dem hämatologischen Wochen bis Monate vorausgeht (Laczika et al. 1994). Man geht davon aus, dass eine Chemotherapie bei molekularem Rezidiv wirksamer und weniger riskant ist als erst im hämatologischen Rezidiv. Obwohl dies logisch erscheint und durch verschiedene Einzelbeobachtungen gestützt wird, gibt es keine Studien, die dies eindeutig belegen. Eine Beobachtung, die in diesem Sinn interpretiert werden kann, ist, dass beim molekularen Rezidiv der M3 mit ATRA allein wieder molekulare Remissionen erzielbar sind, was beim hämatologischen Rezidiv nicht der Fall ist. LoCoco et al. (1999) konnten zeigen, dass eine Zweitremission bei 12 von 14 Patienten (86%) erzielt werden konnte, die im molekularen Rezidiv nach dem AIDA-Protokoll behandelt wurden. 7 dieser 12 Patienten erreichten bereits nach ATRA-Monotherapie eine MR. Dies ist im Vergleich zu Patienten, die im hämatologischen Rezidiv behandelt wurden, sehr viel. Das 2-Jahres-Überleben beträgt bei Therapie des molekularen Rezidivs 92%, bei Therapie des hämatologischen Rezidivs nur 44%. Beim molekularen Rezidiv nach allogener Knochenmarktransplantation kann durch Reduktion der Immunsuppression mit oder ohne Verabrei-

chung von DLI (donor lymphocyte infusion) wieder eine MR erzielt werden (Elmaagacli et al. 1998; Laczika et al. 1998).

Eine Reihe von Fragen, das molekulare Monitoring betreffend, sind aber noch unbeantwortet. Die bisher erhobenen Daten erlauben keine Schlüsse über die Dynamik des Wachstums des leukämischen Klon bei einzelnen Leukämietypen. Es gibt Hinweise darauf, dass Unterschiede in der Wachstums-schnelligkeit bei verschiedenen Leukämieformen oder beim gleichen Leukämietyp bei verschiedenen Patienten bestehen, z.B. in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Rezidivs. Diese Fragen werden erst durch systematische Anwendung der quantitativen PCR zu beantworten sein. Ferner ist ungeklärt, welche Sensitivität die semiquantitative PCR idealerweise haben sollte. Ist sie zu unsensitiv, wird die Diagnose des molekularen Rezidivs zu spät gestellt, bei zu hoher Sensitivität sind falsch-positive Befunde zu erwarten. Durch viele Einzelbeobachtungen ist gesichert, dass das molekulare Rezidiv im Knochenmark früher erkennbar ist. Infolge dieser vielen Unsicherheiten ist es schwierig, eine optimale Monitoringstrategie zu definieren. Eine mögliche Strategie, die wir derzeit verfolgen, ist das Monitoring der PCR im peripheren Blut (PB) monatlich und im Knochenmark alle 3 Monate während der ersten 2 Jahre nach CR. Bei einem positiven Befund im PB wird die Untersuchung sofort wiederholt und eine Knochenmarkuntersuchung durchgeführt. Ein molekulares Rezidiv wird dann angenommen, wenn mindestens 2 positive Befunde im PB und/oder Knochenmark erhoben werden.

3.3.5.6 Rezidivtherapie

Es gibt nur wenige die Rezidivtherapie betreffende randomisierte Studien, sondern meist nur Kohortenstudien. Fast alle Studien beziehen sich auf hämatologische Rezidive, während es nur wenige Daten, vorwiegend bei APL, über die Therapie des molekularen Rezidivs gibt.

Für die Therapie des hämatologischen Rezidivs wurden verschiedene Protokolle verwendet, wie das 3+7-Protokoll in einer der Varianten, hochdosierte Ara-C kombiniert mit Anthrazyklinen, Mitoxantron, AMSA, Topotecan oder Fludarabin und andere Zytostatikakombinationen (Estey 2000). Beim Rezidiv der M3 ist Arsentrioxid eine wirkungsvolle Therapie. Eine Erfolg versprechende Rezidivtherapie (und später vielleicht auch Primärtherapie) ist ein neues Zytostatikum, kom-

biniiert mit einem Anti-CD33-Antikörper (CMA 676, Myelotarg). Aus allen Studien geht hervor, dass die Wahrscheinlichkeit einer CR umso größer ist, je länger die Erstremission dauerte (Thalhammer et al. 1996). Bei Frührezidiven (<6–9 Monaten) ist die Remissionsrate niedrig, bei Rezidiven nach einer Remissionsdauer von >12 Monaten gleich gut wie bei der Ersttherapie. Neben der Erstremissionsdauer sind Karyotyp und Alter wichtige prognostische Faktoren. Patienten, die nach Rezidivtherapie eine komplette oder gute Teilremission erreichen, sind Kandidaten für eine allogene Stammzelltransplantation (nach Hochdosistherapie oder reduzierter Konditionierung). Bei frühem Rezidiv könnte die allogene SCT auch ohne vorherige Chemotherapie durchgeführt werden. Bei Patienten in zweiter kompletter Remission ist auch eine autologe SCT eine Option. Die Remissionsraten betragen bei alleiniger Chemotherapie 60%, die mittlere Remissionsdauer 6–7 Monate (Stoiser et al. 2000). Diese Angaben sind Mittelwerte verschiedener, meist kleiner Serien und nicht das Ergebnis randomisierter Studien.

Über die Therapie bei molekularem Rezidiv gibt es wenige Daten. Während man früher gezögert hat, Patienten mit molekularem Rezidiv, aber noch in hämatologischer Remission zu behandeln, mehrer sich die Daten, dass ein eindeutiges molekulares Rezidiv (wie oben definiert) praktisch immer vom hämatologischen Rezidiv gefolgt wird und daher eine Indikation für eine Rezidivtherapie dar-

stellt. Relativ am besten studiert sind die Verhältnisse bei der M3, wo gezeigt werden konnte, dass Patienten, die nach Therapie des Rezidivs mit ATRA und Chemotherapie eine molekulare Remission erreichen, mit autologer SCT eine ausgezeichnete Prognose haben (Meloni et al. 1997). Für andere Formen der AML existieren nur wenige Daten über die Beeinflussung des molekularen Rezidivs durch Chemotherapie oder SCT. Ein potenzieller therapeutischer Algorithmus ist in Abb. 3.3.17 dargestellt.

3.3.5.7 Zukunftsperspektiven

Während der Nachweis zytogenetischer Veränderungen vor Therapiebeginn schon jetzt als obligat gilt, wird in Kürze das molekulare Monitoring eine obligate Begleitmaßnahme während der Therapie und damit eine wichtige Grundlage für Therapieentscheidungen sein. Die Kombination von semi-quantitativer und quantitativer PCR wird die Interpretation wesentlich erleichtern. Dies gilt auch für die Reinheit von autologen Stammzellpräparaten. Es ist zu erwarten, dass mit molekulargenetischen Methoden bei Patienten mit normalem zytogenetischem Befund Genveränderungen gefunden werden können, die prognostisch relevant sind und vielleicht auch Hinweise auf die Wirksamkeit spezifischer Therapien geben (wie bei APL oder den CBF-Leukämien). Die Analyse der Genexpression bei verschiedenen Leukämietypen wird wahrscheinlich die Entwicklung von spezifischen „designer drugs“ ermöglichen. Der Einsatz dieser neuen Substanzen wird aber den Nachweis der Expression von bestimmten Genen bzw. Proteinen erfordern. Es ist zu erwarten, dass nur die Kombination verschiedener, bei einer bestimmten Leukämieform wirksamer Substanzen die Heilungsrate erhöhen wird.

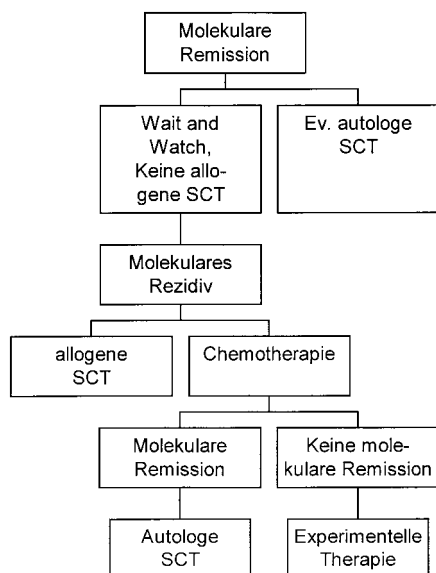


Abb. 3.3.17. Potenzieller therapeutischer Algorithmus bei Leukämien, die einem molekularen Monitoring unterzogen werden können

3.3.6 Literatur

- Ambros PF, Mehes G, Hattinger C et al. (2001) Unequivocal identification of disseminated tumor cells in the bone marrow by combining immunological and genetic approaches – functional and prognostic information. *Leukemia* 15:275–277
- Baer MR, Stewart CC, Lawrence D et al. (1997) Expression of the neural cell adhesion molecule CD56 is associated with short remission duration and survival in acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22). *Blood* 90:1643–1648
- Bain JB (1988) *Leukemia diagnosis. Guide to the FAB classification.* Wolfe, London

- Beltinger CP, Debatin KM (1998) A simple combined microdissection and aspiration device for the rapid procurement of single cells from clinical peripheral blood smears. *Mol Pathol* 51:233–236
- Bene MC, Castoldi G, Knapp W et al. (1995) Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 9:1783–1786
- Bene MC, Bernier M, Casasnovas RO et al. (1998) The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. The European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL). *Blood* 92:596–599
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33:451–458
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. (1985a) Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103:460–462
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. (1985b) Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103:620–625
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. (1991) Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol* 78:325–329
- Bernstein ID (2000) Monoclonal antibodies to the myeloid stem cells: therapeutic implications of CMA-676, a humanized anti-CD33 antibody calicheamicin conjugate. *Leukemia* 14: 474–475
- Bitter MA, Le Beau MM, Rowley JD, Larson RA, Golomb HM, Vardiman JW (1987) Associations between morphology, karyotype, and clinical features in myeloid leukemias. *Hum Pathol* 18:211–225
- Bloomfield CD, Goldman A, Hossfeld D, Chapelle A de la (1984) Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1982: Clinical significance of chromosomal abnormalities in acute nonlymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 11:332–350
- Bloomfield CD, Herzig GP, Peterson BA, Wolff SN (1997a) Long-term survival of patients with acute myeloid leukemia: updated results from two trials evaluating postinduction chemotherapy. *Cancer [Suppl 11]* 80:2186–2190
- Bloomfield CD, Shuma C, Regal L et al. (1997b) Long-term survival of patients with acute myeloid leukemia: a third follow-up of the Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia. *Cancer [Suppl 11]* 80:2191–2198
- Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC et al. (1998) Frequency of prolonged remission duration following high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res* 58:4173–4179
- Bower M, Parry P, Carter M et al. (1994) Prevalence and clinical correlations of MLL gene rearrangements in AML-M4/M5. *Blood* 84:3776–3780
- Breen TR, Harte PJ (1991) Molecular characterization of the trithorax gene, a positive regulator of homeotic gene expression in *Drosophila*. *Mech Dev* 35:113–127
- Breen TR, Harte PJ (1993) Trithorax regulates multiple homeotic genes in the bithorax and antennapedia complexes and exerts different tissue-specific, parasegment-specific and promotor-specific effects on each. *Development* 117:119–134
- Büchner T, Hiddemann W, Wörmann B et al. (1999) Double induction strategy for acute myeloid leukemia: the effect of high-dose cytarabine with mitoxantrone instead of standard-dose cytarabine with daunorubicin and 6-thioguanine: a randomized trial by the German AML Cooperative Group. *Blood* 93:4116–4124
- Burnett AK (1999) Tailoring the treatment of acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol* 11:14–19
- Byrd JC, Weiss RB, Arthur DC et al. (1997) Extramedullary leukemia adversely affects hematologic complete remission rate and overall survival in patients with t(8;21)(q22;q22): results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *J Clin Oncol* 15:466–475
- Byrd JC, Dodge RK, Carroll A et al. (1999) Patients with t(8;21)(q22;q22) and acute myeloid leukemia have superior failure-free and overall survival when repetitive cycles of high-dose cytarabine are administered. *J Clin Oncol* 17:3767–3775
- Campana D, Pui CH (1995) Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 85:1416–1434
- Campana D, Coustan-Smith E (1996) The use of flow cytometry to detect minimal residual disease in acute leukemia. *Eur J Histochem [Suppl 1]* 40:39–42
- Campana D, Coustan-Smith E (1999) Detection of minimal residual disease in acute leukemia by flow cytometry. *Cytometry* 38:139–152
- Castilla LH, Wijmenga C, Wang Q et al. (1996) Failure of embryonic hematopoiesis and lethal hemorrhages in mouse embryos heterozygous for a knocked-in gene CBFβ-MYH11. *Cell* 87:687–696
- Catovsky D, Matutes E, Buccheri V et al. (1991) A classification of acute leukaemia for the 1990 s. *Ann Hematol* 62:16–21
- Chang KS, Fan YH, Stass SA et al. (1993) Expression of AML1-ETO fusion transcripts and detection of minimal residual disease in t(8;21)-positive acute myeloid leukemia. *Oncogene* 8:983–988
- Chen Z, Guidez F, Rousselot P et al. (1994) PLZF-RAR alpha fusion proteins generated from the variant t(11;17)(q23;q21) translocation in acute promyelocytic leukemia inhibit ligand-dependent transactivation of wild-type retinoic acid receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1178–1182
- Chen SJ, Wang ZY, Chen Z (1995) Acute promyelocytic leukemia: from clinic to molecular biology. *Stem Cells* 13:22–31
- Cheson BD, Cassileth PA, Head DR et al. (1990) Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 8:813–819
- Claxton DF, Liu P, Hsu HP et al. (1994) Detection of fusion transcripts generated by the inversion 16 chromosome in acute myelogenous leukemia. *Blood* 83:1750–1756
- Corey SJ, Locker J, Oliveri DR et al. (1994) A non-classical translocation involving 17q12 (retinoic receptor alpha) in acute promyelocytic leukemia (APML) with atypical features. *Leukemia* 8:1350–1353
- Costello R, Sainty D, Blaise D, Gastaut JA, Gabert J (1997) Prognosis value of residual disease monitoring by polymerase chain reaction in patients with CBFβ/MYH11-positive acute myeloblastic leukemia. *Blood* 89:2222–2223
- Dastugue N, Payen C, Lafage-Pochitaloff M et al. (1995) Prognostic significance of karyotype in de novo adult acute myeloid leukemia. The BGMT group. *Leukemia* 9:1491–1498
- David G, Alland L, Hong SH, Wong CW, DePinho RA, Dejean A (1998) Histone deacetylase associated with mSin3A

- mediates repression by the acute promyelocytic leukemia-associated PLZF protein. *Oncogene* 16:2549–2556
- De Thé H, Chomienne C, Lanotte M, Degos L, Dejean A (1990) The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature* 347:558–561
- De Thé H, Lavau C, Marchio A, Chomienne C, Degos L, Dejean A (1991) The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 66:675–684
- Domer PH, Fakharzadeh SS, Chen CS et al. (1993) Acute mixed-lineage leukemia t(4;11)(q21;q23) generates an MLL-AF4 fusion product. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7884–7888
- Downing JR, Head DR, Curcio-Brint AM et al. (1993) An AML1/ETO fusion transcript is consistently detected by RNA-based polymerase chain reaction in acute myelogenous leukemia containing the (8;21)(q22;q22) translocation. *Blood* 81:2860–2865
- Drexler HG, Thiel E, Ludwig WD (1993) Acute myeloid leukemias expressing lymphoid-associated antigens: diagnostic incidence and prognostic significance. *Leukemia* 7:489–498
- Dyck JA, Maul GG, Miller JH Jr, Chen JD, Kakizuka A, Evans RM (1994) A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell* 76:333–343
- Elmaagacli AH, Beelen DW, Kroll M, Trzaskowski S, Stein C, Schaefer UW (1998) Detection of CBFβeta/MYH11 fusion transcripts in patients with inv(16) acute myeloid leukemia after allogeneic bone marrow or peripheral blood progenitor cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 21:159–166
- Engel H, Goodacre A, Keyhani A et al. (1997) Minimal residual disease in acute myelogenous leukaemia and myelodysplastic syndromes: a follow-up of patients in clinical remission. *Br J Haematol* 99:64–75
- Erickson P, Gao J, Chang KS et al. (1992) Identification of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to *Drosophila* segmentation gene, runt. *Blood* 80:1825–1831
- Estey EH (2000) Treatment of relapsed and refractory acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 14:476–479
- Estey EH, Lima M de, Strom S, Pierce S, Freireich EJ, Keating MJ (1997) Long-term follow-up of patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia treated at the University of Texas M.D. Anderson Cancer Center. *Cancer [Suppl 11]* 80:2176–2180
- Estey EH, Giles FJ, Kantarjian H et al. (1999) Molecular remissions induced by liposomal-encapsulated all-trans retinoic acid in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Blood* 94:2230–2235
- Evans PA, Short MA, Jack AS et al. (1997) Detection and quantitation of the transcripts associated with the inv(16) in presentation and follow-up samples from patients with AML. *Leukemia* 11:364–369
- Exner M, Thallhammer R, Kapiotis S et al. (2000) The „typical“ immunophenotype of acute promyelocytic leukemia (APL-M3): does it prove true for the M3-variant? *Cytometry* 42:106–109
- Fang L, Godley LA, Joslin J et al. (2001) Transcript map and comparative analysis of the 1.5-Mb commonly deleted segment of human 5q31 in malignant myeloid diseases with a del(5q). *Genomics* 71:235–245
- Fenaux P, Castaigne S, Dombret H et al. (1992) All-trans retinoic acid followed by intensive chemotherapy gives a high complete remission rate and may prolong remissions in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: a pilot study on 26 cases. *Blood* 80:2176–2181
- Fenaux P, Chomienne C, Degos L (1997) Acute promyelocytic leukemia: biology and treatment. *Semin Oncol* 24:92–102
- Fenaux P, Chastang C, Chevret S et al. (1999) A randomized comparison of all-trans retinoic acid (ATRA) followed by chemotherapy and ATRA plus chemotherapy and the role of maintenance therapy in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. The European APL Group. *Blood* 94:1192–1200
- Fenaux P, Chevret S, Guerci A et al. (2000) Long-term follow-up confirms the benefit of all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. European APL Group. *Leukemia* 14:1371–1377
- Fidanza V, Melotti P, Yano T et al. (1996) Double knockout of the ALL-1 gene blocks hematopoietic differentiation in vitro. *Cancer Res* 56:1179–1183
- Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D (1989) Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 339:58–61
- Fonatsch C, Nowotny H, Pittermann-Höcker E et al. (2001) Amplification of ribosomal RNA genes in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 32:11–17
- Gaiger A, Schmid D, Heinze G et al. (1998) Detection of the WT1 transcript by RT-PCR in complete remission has no prognostic relevance in de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 12:1886–1894
- Ganser A, Heil G, Seipelt G et al. (2000) Intensive chemotherapy with idarubicin, ara-C, etoposide, and m-AMSA followed by immunotherapy with interleukin-2 for myelodysplastic syndromes and high-risk acute myeloid leukemia (AML). *Ann Hematol* 79:30–35
- Gao J, Erickson P, Gardiner K et al. (1991) Isolation of a yeast artificial chromosome spanning the 8;21 translocation breakpoint t(8;21)(q22;q22.3) in acute myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4882–4886
- Giralt S, Khouri I, Champlin R (1999) Non myeloablative „mini transplants“. *Cancer Treat Res* 101:97–108
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P et al. (1999) Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286:531–537
- Greaves M (1997) Silence of the leukemic clone. *N Engl J Med* 336:367–369
- Greinix HT, Keil F, Brugger SA et al. (1996) Long-term leukemia-free survival after allogeneic marrow transplantation in patients with acute myelogenous leukemia. *Ann Hematol* 72:53–59
- Grignani F, De Matteis S, Nervi C et al. (1998) Fusion proteins of the retinoic receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* 391:815–818
- Grimwade D, Walker H, Oliver F et al. (1998) The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood* 92:2322–2333
- Guerrasio A, Rosso C, Martinelli G et al. (1995) Polyclonal haemopoiesis associated with long-term persistence of the AML1-ETO transcript in patients with FAB M2 acute myeloid leukaemia in continuous clinical remission. *Br J Haematol* 90:364–368

- Hajra A, Collins FS (1995) Structure of the leukemia-associated human CBFB gene. *Genomics* 26:571–579
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J et al. (1999) World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 17:3835–3849
- He LZ, Guidez F, Tribioli C et al. (1998) Distinct interactions of PML-RAR α and PLZF-RAR α with co-repressors determine differential responses to RA in APL. *Nat Genet* 18:126–135
- Hébert J, Cayuela JM, Daniel MT, Berger R, Sigaux F (1994) Detection of minimal residual disease in acute myelomonocytic leukemia with abnormal marrow eosinophils by nested polymerase chain reaction with allele specific amplification. *Blood* 84:2291–2296
- Heim S, Mitelman F (1995) *Cancer cytogenetics*, 2nd edn. Wiley-Liss, New York
- Hong SH, David G, Wong CW, Dejean A, Privalsky ML (1997) SMRT corepressor interacts with PLZF and with the PML-retinoic acid receptor α (RAR α) and PLZF-RAR α oncoproteins associated with acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9028–9033
- Huang W, Sun GL, Li XS et al. (1993) Acute promyelocytic leukemia: clinical relevance of two major PML-RAR α isoforms and detection of minimal residual disease by retrotranscriptase/polymerase chain reaction to predict relapse. *Blood* 82:1264–1269
- Huang ME, Ye YC, Chen SR et al. (1998) Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 72:567–572
- Hurwitz CA, Raimondi SC, Head D et al. (1992) Distinctive immunophenotypic features of t(8;21)(q22;q22) acute myeloblastic leukemia in children. *Blood* 80:3182–3188
- Hussong JW, Rodgers GM, Shami PJ (2000) Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 95:309–313
- Jablon S, Kato H (1970) Childhood cancer in relation to prenatal exposure to atomic-bomb radiation. *Lancet* 2:1000–1003
- Jäger U, Laczika K, Scholten C, Mitterbauer M, Novak M, Lechner K (1996) Clinical use of the polymerase chain reaction for diagnosis and management of malignant diseases. *Wien Klin Wochenschr* 108:634–639
- Jurlander J, Caligiuri MA, Ruutu T et al. (1996) Persistence of the AML1/ETO fusion transcript in patients treated with allogeneic bone marrow transplantation for t(8;21) leukemia. *Blood* 88:2183–2191
- Kakizuka A, Miller WH Jr, Umesono K et al. (1991) Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR α with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* 66:663–674
- Kampmeier P, Spielberger R, Dickstein J, Mick R, Golomb H, Vardiman JW (1994) Increased incidence of second neoplasms in patients treated with interferon α 2b for hairy cell leukemia: a clinicopathologic assessment. *Blood* 83:2931–2938
- Kanamaru A, Takemoto Y, Tanimoto M et al. (1995) All-trans retinoic acid for the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. Japan Adult Leukemia Study Group. *Blood* 85:1202–1206
- Kato H, Yoshimoto Y, Schull WJ (1989) Risk of cancer among children exposed to atomic bomb radiation in utero: a review. *IARC Sci Publ* 16:365–374
- Kennison JA (1993) Transcriptional activation of *Drosophila* homeotic genes from distant regulatory elements. *Trends Genet* 9:75–79
- Khalidi HS, Medeiros LJ, Chang KL, Brynes RK, Slovak ML, Arber DA (1998) The immunophenotype of adult acute myeloid leukemia: high frequency of lymphoid antigen expression and comparison of immunophenotype, French-American-British classification, and karyotypic abnormalities. *Am J Clin Pathol* 109:211–220
- Klampfer L, Zhang J, Zelenetz AO, Uchida H, Nimer SD (1996) The AML1/ETO fusion protein activates transcription of BCL-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14.059–14.064
- Korninger L, Knöbl P, Laczika K et al. (1994) PML-RAR α PCR positivity in the bone marrow of patients with APL precedes haematological relapse by 2–3 months. *Br J Haematol* 88:427–431
- Kozu T, Miyoshi H, Shimizu K et al. (1993) Junctions of the AML1/MTG8(ETO) fusion are constant in t(8;21) acute myeloid leukemia detected by reverse transcription polymerase chain reaction. *Blood* 82:1270–1276
- Krauter J, Hoellge W, Wattjes M et al. (1999) Real time PCR for the detection and quantification of CBF β /MYH11 fusion transcripts in inv(16) positive AML. *Blood [Suppl 1]* 94:207b
- Kusec R, Laczika K, Knöbl P et al. (1994) AML1/ETO fusion mRNA can be detected in remission blood samples of all patients with t(8;21) acute myeloid leukemia after chemotherapy or autologous bone marrow transplantation. *Leukemia* 8:735–739
- Kwok S, Higuchi R (1989) Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237–238
- Laczika K, Mitterbauer G, Knoebel P et al. (1994) Rapid achievement of PML-RAR α PCR-negativity by combined treatment with all-trans retinoic acid and chemotherapy: a pilot study. *Leukemia* 8:1–5
- Laczika K, Novak M, Hilgarth B et al. (1998) Competitive CBF β /MYH11 reverse-transcriptase polymerase chain reaction for quantitative assessment of minimal residual disease during postremission therapy in acute myeloid leukemia with inversion(16): a pilot study. *J Clin Oncol* 16:1519–1525
- Laczika K, Mitterbauer G, Weltermann A et al. (2000) Prolonged third remission in a patient with acute promyelocytic leukemia after consolidation chemotherapy with intermittent intermediate dose Ara-C and maintenance with intermittent all-trans retinoic acid (ATRA). *Leuk Lymphoma* 36:625–629
- Lai F, Godley LA, Joslin J et al. (2001) Transcript map and comparative analysis of the 1.5-Mb commonly deleted segment of human 5q31 in malignant myeloid diseases with a del(5q). *Genomics* 71:235–245
- Lamy T, Goasguen JE, Mordelet E et al. (1994) P-glycoprotein (P-170) and CD34 expression in adult acute myeloid leukemia (AML). *Leukemia* 8:1879–1883
- Langabeer SE, Walker H, Gale RE et al. (1997) Frequency of CBF β /MYH11 fusion transcripts in patients entered into UK MRC AML trials. *Br J Haematol* 96:736–739
- Layton DM, Mufti GJ (1986) Myelodysplastic syndromes: their history, evolution and relation to acute myeloid leukaemia. *Blut* 53:423–436
- Le Beau MM, Larson RA, Bitter MA, Vardiman JW, Golomb HM, Rowley JD (1983) Association of an inversion of chromosome 16 with abnormal marrow eosinophils in acute myelomonocytic leukemia. A unique cytogenetic-clinico-pathological association. *N Engl J Med* 309:630–636

- Legrand O, Perrot JY, Simonin G et al. (1998) Adult biphenotypic acute leukaemia: an entity with poor prognosis which is related to unfavourable cytogenetics and P-glycoprotein over-expression. *Br J Haematol* 100:147-155
- Leone G, Mele L, Pulsoni A, Equitani F, Pagano L (1999) The incidence of secondary leukemias. *Haematologica* 84:937-945
- Levine EG, Bloomfield CD (1992) Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation, and environmental exposure. *Semin Oncol* 19:47-84
- Lewis EB (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276:565-570
- Lin RJ, Nagy L, Inoue S, Shao W, Miller WH Jr, Evans RM (1998) Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukemia. *Nature* 391:811-814
- Liu P, Tarlé SA, Hajra A et al. (1993) Fusion between transcription factor CBF β /PEBP2 β and myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science* 261:1041-1044
- Liu PP, Hajra A, Wijmenga C, Collins FS (1995) Molecular pathogenesis of the chromosome 16 inversion in the M4Eo subtype of acute myeloid leukemia. *Blood* 85:2289-2302
- Liu Yin JA (1999) Detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia: methodologies, clinical and biological significance. *Br J Haematol* 106:578-590
- Lo YM, Mehal WZ, Fleming KA (1988) False-positive results and the polymerase chain reaction. *Lancet* 2:679
- Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC et al. (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 14:1675-1680
- LoCoco F, Diverio D, Avvisati G et al. (1999) Therapy of molecular relapse in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 94:2225-2229
- Look AT (1997) Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 278:1059-1064
- Ma Q, Alder H, Nelson KK et al. (1993) Analysis of the murine All-1 gene reveals conserved domains with human ALL-1 and identifies a motif shared with DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6350-6354
- Mandelli F, Diverio D, Avvisati G et al. (1997) Molecular remission in PML/RAR alpha-positive acute promyelocytic leukemia by combined all-trans retinoic acid and idarubicin (AIDA) therapy. *Blood* 90:1014-1021
- Marcucci G, Caligiuri MA, Bloomfield CD (1997) Defining the „absence“ of the CBF β /MYH11 fusion transcript in patients with acute myeloid leukemia and inversion of chromosome 16 to predict long-term complete remission: a call for definitions. *Blood* 90:5022-5025
- Marcucci G, Livak KJ, Bi W, Strout MP, Bloomfield CD, Caligiuri MA (1998) Detection of minimal residual disease in patients with AML1/ETO-associated acute myeloid leukemia using a novel quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assay. *Leukemia* 12:1482-1489
- Marcucci G, Caligiuri MA, Maghraby EA et al. (1999) Quantification of CBF β /MYH11 transcripts in inv(16) acute myeloid leukemia (AML) by real time RT-PCR. *Blood [Suppl 1]* 94:740a
- Martin G, Barragan E, Bolufer P et al. (2000) Relevance of presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission in the prognosis of acute myeloid leukemia with CBF β /MYH11 rearrangement. *Haematologica* 85:699-703
- Martinelli G, Ottaviani E, Testoni N, Montefusco V, Pastano R, Tura S (2000) Long-term disease-free acute myeloblastic leukemia with inv(16) is associated with PCR undetectable CBF β /MYH11 transcript. *Haematologica* 85:552-555
- Martinez-Climent JA, Espinosa R 3rd, Thirman MJ, Le Beau MM, Rowley JD (1995) Abnormalities of chromosome band 11q23 and the MLL gene in pediatric myelomonocytic and monoblastic leukemias. Identification of the t(9;11) as an indicator of long survival. *J Pediatr Hematol Oncol* 17:277-283
- Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA et al. (1994) Intensive post-remission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 331:896-903
- Mazo AM, Huang DH, Mozer BA, Dawid IB (1990) The trithorax gene, a trans-acting regulator of the bithorax complex in *Drosophila*, encodes a protein with zinc-binding domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:2112-2116
- Meloni G, Diverio D, Vignetti M et al. (1997) Autologous bone marrow transplantation for acute promyelocytic leukemia in second remission: prognostic relevance of pretransplant minimal residual disease assessment by reverse-transcription polymerase chain reaction of the PML/RAR alpha fusion gene. *Blood* 90:1321-1325
- Meyers S, Downing JR, Hiebert SW (1993) Identification of AML1 and the t(8;21) translocation protein (AML1/ETO) as sequence-specific DNA-binding proteins: the runt homology domain is required for DNA-binding and protein-protein interactions. *Mol Cell Biol* 13:6336-6345
- Meyers S, Lenny N, Hiebert SW (1995) The t(8;21) fusion protein interferes with AML-1B-dependent transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 15:1974-1982
- Michallet M, Thomas X, Vernant JP et al. (2000) Long-term outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for advanced stage acute myeloblastic leukemia: a retrospective study of 379 patients reported to the Societe Francaise de Greffe de Moelle (SFGM). *Bone Marrow Transplant* 26:1157-1163
- Miller WH Jr, Levine K, DeBlasio A, Frankel SR, Dmitrovsky E, Warrell RP Jr (1993) Detection of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia by a reverse transcription polymerase chain reaction assay for the PML/RAR-alpha fusion mRNA. *Blood* 82:1689-1694
- Mitterbauer M, Kusec R, Schwarzingger I, Haas OA, Lechner K, Jaeger U (1998) Comparison of karyotype analysis and RT-PCR for AML1/ETO in 204 unselected patients with AML. *Ann Hematol* 76:139-143
- Mitterbauer G, Zimmer C, Fonatsch C et al. (1999) Monitoring of minimal residual leukemia in patients with MLL-AF9 positive acute myeloid leukemia by RT-PCR. *Leukemia* 13:1519-1524
- Mitterbauer M, Laczika K, Novak M et al. (2000a) High concordance of karyotype analysis and RT-PCR for CBF beta/MYH11 in unselected patients with acute myeloid leukemia. A single center study. *Am J Clin Pathol* 113:406-410
- Mitterbauer G, Zimmer C, Pirc-Danoewinata H et al. (2000b) Monitoring of minimal residual disease in patients with MLL-AF6-positive acute myeloid leukemia by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Br J Haematol* 109:622-628
- Miwa H, Kita K, Nishii K et al. (1993) Expression of MDR1 gene in acute leukemia cells: association with CD7+ acute myeloblastic leukemia/acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 82:3445-3451
- Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T, Maseki N, Kaneko Y, Ohki M (1991) t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukaemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10431-10434

- Mrózek K, Heinonen K, Chapelle A de la, Bloomfield CD (1997a) Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemias. *Semin Oncol* 24:17–31
- Mrózek K, Heinonen K, Lawrence D et al. (1997b) Adult patients with de novo acute myeloid leukemia and t(9;11)(p22;q23) have a superior outcome to patients with other translocations involving band 11q23: a cancer and leukemia group B study. *Blood* 90:4532–4538
- Mrózek K, Heinonen K, Bloomfield CD (2001) Clinical importance of cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 14:19–47
- Nucifora G, Birn DJ, Erickson P et al. (1993a) Detection of DNA rearrangements in the AML1 and ETO loci and of an AML1/ETO fusion mRNA in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia. *Blood* 81:883–888
- Nucifora G, Larson RA, Rowley JD (1993b) Persistence of the 8;21 translocation in patients with acute myeloid leukemia type M2 in long-term remission. *Blood* 82:712–715
- Nucifora G, Dickstein JL, Torbenson V, Roulston D, Rowley JD, Vardiman JW (1994) Correlation between cell morphology and expression of the AML1/ETO chimeric transcript in patients with acute myeloid leukemia without the t(8;21). *Leukemia* 8:1533–1538
- Okuda T, Deursen J van, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR (1996) AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84:321–330
- Okuda T, Cai Z, Yang S et al. (1998) Expression of a knocked-in AML1-ETO leukemia gene inhibits the establishment of normal definitive hematopoiesis and directly generates dysplastic hematopoietic progenitors. *Blood* 91:3134–3143
- Oosterveld M, Witte T de (2000) Intensive treatment strategies in patients with high-risk myelodysplastic syndrome and secondary acute myeloid leukemia. *Blood Rev* 14:182–189
- Padro T, Ruiz S, Bieker R et al. (2000) Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 95:2637–2644
- Paietta E (1995) Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* 9:2147–2148
- Paietta E, Wiernik PH, Andersen J, Bennett J, Yunis J (1993) Acute myeloid leukemia M4 with inv(16) (p13q22) exhibits a specific immunophenotype with CD2 expression. *Blood* 82:2595
- Paietta E, Andersen J, Wiernik PH (1996) A new approach to analyzing the utility of immunophenotyping for predicting clinical outcome in acute leukemia. Eastern Cooperative Oncology Group. *Leukemia* 10:1–4
- Pallisaard N, Hokland P, Riishoj DC, Pedersen B, Jorgensen P (1998) Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction and chromosomal aberrations in acute myeloid leukemia. *Blood* 92:574–588
- Pedersen-Bjergaard J, Rowley JD (1994) The balanced and the unbalanced chromosome aberrations of acute myeloid leukemia may develop in different ways and may contribute differently to malignant transformation. *Blood* 83:2780–2786
- Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK (1998a) Secondary or therapy-related MDS and AML and their chromosome aberrations: important to study but difficult to establish causality. *Haematologica* 83:481–482
- Pedersen-Bjergaard J, Andersen MK, Johansson B (1998b) Balanced chromosome aberrations in leukemias following chemotherapy with DNA-topoisomerase II inhibitors. *J Clin Oncol* 16:1897–1898
- Poirel H, Radford-Weiss I, Rack K et al. (1995) Detection of chromosome 16 CBF β -MYH11 fusion transcript in myelomonocytic leukemias. *Blood* 85:1313–1322
- Pui CH, Behm FG, Raimondi SC et al. (1989) Secondary acute myeloid leukemia in children treated for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 321:136–142
- Reeves R, Nissen MS (1990) The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA-structure. *J Biol Chem* 265:8573–8582
- Rege K, Swansbury GJ, Atra AA et al. (2000) Disease features in acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22). Influence of age, secondary karyotype abnormalities, CD19 status, and extramedullary leukemia on survival. *Leuk Lymphoma* 40:67–77
- Rimsza LM, Kopecky KJ, Ruschulte J et al. (2000) Microsatellite instability is not a defining genetic feature of acute myeloid leukemogenesis in adults: results of a retrospective study of 132 patients and review of the literature. *Leukemia* 14:1044–1051
- Rinsky RA, Smith AB, Hornung R et al. (1987) Benzene and leukemia. An epidemiologic risk assessment. *N Engl J Med* 316:1044–1050
- Rowley JD (1992) The der(11) chromosome contains the critical breakpoint junction in the 4;11, 9;11, and the 11;19 translocations in acute leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 5:254–266
- Rowley JD (2000) Cytogenetic analysis in leukemia and lymphoma: an introduction. *Semin Hematol* 37:315–319
- Rozenblatt-Rosen O, Rozovskaia T, Burakov D et al. (1998) The C-terminal SET domains of ALL-1 and TRITHORAX interact with the INI1 and SNR1 proteins, components of the SWI/SNF complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4152–4157
- San Miguel JF, Martinez A, Macedo A et al. (1997) Immunophenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood* 90:2465–2470
- Sanz MA, LoCoco F, Martin G et al. (2000) Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. *Blood* 96:1247–1253
- Sasaki K, Yagi H, Bronson RT et al. (1996) Absence of fetal liver hematopoiesis in mice deficient in transcriptional coactivator core binding factor beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12359–12363
- Saunders MJ, Tobal K, Yin JA (1994) Detection of t(8;21) by reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients in remission of acute myeloid leukaemia type M2 after chemotherapy or bone marrow transplantation. *Leuk Res* 18:891–895
- Schena M, Shalon M, Heller R, Chai QA, Brown PO, Davis RW (1996) Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10.614–10.619
- Schmid D, Heinze G, Linnerth B et al. (1997) Prognostic significance of WT1 gene expression at diagnosis in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 11:639–643
- Schoch C, Haase D, Haferlach T et al. (1996) Fifty-one patients with acute myeloid leukemia and translocation t(8;21)(q22;q22): an additional deletion in 9q is an adverse prognostic factor. *Leukemia* 10: 1288–1295
- Second MIC Cooperative Study Group (1988) Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classifica-

- tion of the acute myeloid leukemias. *Br J Haematol* 68:487–497
- Sedkov Y, Tillib S, Mizrokhi L, Mazo A (1994) The bithorax complex is regulated by trithorax earlier during *Drosophila* embryogenesis than is the antennapedia complex, correlating with a bithorax-like expression pattern of distinct early trithorax transcripts. *Development* 120:1907–1917
- Sievers EL, Appelbaum FR, Spielberger RT et al. (1999) Selective ablation of acute myeloid leukemia using antibody-targeted chemotherapy: a phase I study of an anti-CD33 calicheamicin immunoconjugate. *Blood* 93: 3678–3684
- Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA et al. (2000) Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group study. *Blood* 96: 4075–4083
- Smith MA, McCaffrey RP, Karp JE (1996) The secondary leukemias: challenges and research directions. *J Natl Cancer Inst* 88:407–418
- Stindl R, Fiegl M, Regele H, Gisslinger H, Breitenseher MJ, Fonatsch C (1998) Alveolar rhabdomyosarcoma in a 68-year-old patient identified by cytogenetic analysis of bone marrow. *Cancer Genet Cytogenet* 107:43–47
- Stoiser B, Knöbl P, Fonatsch C et al. (2000) Prognosis of patients with a second relapse of acute myeloid leukaemia. *Leukemia* 14:2059–2063
- Streubel B, Valent P, Jäger U et al. (2000) Amplification of the MLL gene on double minutes, a homogeneously staining region, and ring chromosomes in five patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. *Genes Chromosomes Cancer* 27:380–386
- Strout MP, Marcucci G, Caligiuri MA, Bloomfield CD (1999) Core-binding factor (CBF) and MLL-associated primary acute myeloid leukemia: biology and clinical implications. *Ann Hematol* 78:251–264
- Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA et al. (1997) All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 337:1021–1028
- Tallmann MS, Andersen JW, Schiffer CA et al. (2000) Clinical description of 44 patients with acute promyelocytic leukemia who developed the retinoic acid syndrome. *Blood* 95:90–95
- Tamayo P, Slonim D, Mesirov J et al. (1999) Interpreting patterns of gene expression with self-organizing maps: methods and application to hematopoietic differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2907–2912
- Taylor PR, Reid MM, Stark AN, Bown N, Hamilton PJ, Proctor SJ (1995) De novo acute myeloid leukaemia in patients over 55-years-old: a population-based study of incidence, treatment and outcome. Northern Region Haematology Group. *Leukemia* 9:231–237
- Taylor CG, Stasi R, Bastianelli C et al. (1996) Diagnosis and classification of the acute leukemias: recent advances and controversial issues. *Hematopathol Mol Hematol* 10:1–38
- Thalhammer F, Geissler K, Jäger U et al. (1996) Duration of second complete remission in patients with acute myeloid leukemia treated with chemotherapy: a retrospective single-center study. *Ann Hematol* 72:216–222
- Thirman MJ, Gill HJ, Burnett RC et al. (1993) Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *N Engl J Med* 329:909–914
- Tobal K, Johnson PRE, Saunders MJ, Harrison CJ, Liu Yin JA (1995) Detection of CBF β /MYH11 transcripts in patients with inversion and other abnormalities of chromosome 16 at presentation and remission. *Br J Haematol* 91:104–108
- Tobal K, Newton J, Macheta M et al. (2000) Molecular quantitation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia with t(8;21) can identify patients in durable remission and predict clinical relapse. *Blood* 95:815–819
- Van der Reijden BA, Dauwerse JG, Wessels JW et al. (1993) A gene for a myosin peptide is disrupted by the inv(16)(p13q22) in acute nonlymphocytic leukemia M4Eo. *Blood* 82:2948–2952
- Van der Reijden BA, Lombardo M, Dauwerse HG et al. (1995) RT-PCR diagnosis of patients with acute nonlymphocytic leukemia and inv(16)(p13q22) and identification of new alternative splicing in CBF β -MYH11 transcripts. *Blood* 86:277–282
- Venditti A, Buccisano F, Del PG et al. (2000) Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 96:3948–3952
- Wang Q, Stacy T, Binder M, Marin-Padilla M, Sharpe AH, Speck NA (1996a) Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3444–3449
- Wang Q, Stacy T, Miller JD et al. (1996b) The CBF β subunit is essential for CBF α 2 (AML1) function in vivo. *Cell* 87:697–708
- Warrell RP Jr, De Thé H, Wang ZY, Degos L (1993) Acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med* 329:177–189
- Warrell RP Jr, Maslak P, Eardley A, Heller G, Miller WH Jr, Frankel SR (1994) Treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans retinoic acid: an update of the New York experience. *Leukemia* 8:929–933
- Wattjes MP, Krauter J, Nagel S, Heidenreich O, Ganser A, Heil G (2000) Comparison of nested competitive RT-PCR and real-time RT-PCR for the detection and quantification of AML1/MTG8 fusion transcripts in t(8;21) positive acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 14:329–335
- Westendorf JJ, Yamamoto CM, Lenny N, Downing JR, Selsted ME, Hiebert SW (1998) The t(8;21) fusion product, AML1-ETO, associates with C/EBP- α , inhibits C/EBP- α -dependent transcription, and blocks granulocytic differentiation. *Mol Cell Biol* 18:322–333
- Wieser R, Schreiner U, Pirc-Danoewinata H et al. (2001) Interphase fluorescence in situ hybridization assay for the detection of 3q21 rearrangements in myeloid malignancies. *Genes Chromosomes Cancer* 32: 373–380
- Willman CL (1999) Acute leukemias: a paradigm for the integration of new technologies in diagnosis and classification. *Mod Pathol* 12:218–228
- Wörmann B, Safford M, Konemann S, Büchner T, Hiddemann W, Terstappen LW (1993) Detection of aberrant antigen expression in acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry. *Recent Results Cancer Res* 131:185–196
- Yergeau DA, Hetherington CJ, Wang Q et al. (1997) Embryonic lethality and impairment of haematopoiesis in mice heterozygous for an AML1-ETO fusion gene. *Nat Genet* 15:303–306
- Yu BD, Hess JL, Horning SE, Brown GA, Korsmeyer SJ (1995) Altered HOX expression and segmental identity in MLL-mutant mice. *Nature* 378:505–508
- Zhang Z, Nakamura M, Taniguchi E, Shan L, Yokoi T, Kaku-do K (1997) A simple approach to single-cell microdissection and molecular analysis. *Anal Quant Cytol Histol* 19:514–518

Molekularmedizinische Grundlagen von
hämatologischen Neoplasien

Ruckpaul, K.; Ganten, D.; Schlegelberger, B.; Fonatsch,
C. (Hrsg.)

2003, XL, 521 S., Hardcover

ISBN: 978-3-540-41640-1