

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

DNA-reparations-assays med potentiale for individuel cancerisikovurdering

<i>Host cell reactivation assay (HCR):</i>	Lymfocytter fra blodprøve analyseres for kapacitet til at fjerne skader i en DNA-vektor med specifik type DNA-skade
<i>Comet assay:</i>	Nogle få celler (f.eks. lymfocytter) analyseres for eksisterende DNA-skader og/eller for kapacitet til at fjerne skader, der påføres de pågældende cellers DNA

Figur 2. To metoder, som må forventes at kunne udvikles til brug for cancerisikovurdering.

genekspressionsmønsteret af DNA-reparationsproteiner [4]. Efterhånden som der opnås en dybere forståelse af de processer, der fører til DNA-beskadigelse, og til de forskellige DNA-reparationsprocesser, må man forvente, at der kan udvikles nye behandlingsstrategier ikke kun til at bekæmpe cancersygdomme med, men også til at udskyde aldringsprocessen med. Sådanne strategier kunne involvere metoder til at reducere DNA-skader med og eller fremme/stimulere DNA-reparation, hvorved man må forvente at udsætte eller afværge en

række aldersassocierede sygdomme. Det er på tide at overveje at inkludere analyser af DNA-reparationen i den mere almindelige kliniske analyse af patienter med aldersassocierede sygdomme.

Korrespondance: Lene Juel Rasmussen, Institut for Biologi og Kemi, Roskilde Universitetscenter, DK-4000 Roskilde. Email: ljr@ruc.dk

Antaget: 10. marts 2006
Interessekonflikter: Ingen angivet

Litteratur

1. DePinho RA. The age of cancer. *Nature* 2000;408:248-54.
2. Stevnsner T, Thorslund T, de Souza-Pinto NC et al. Mitochondrial repair of 8-oxoguanine and changes with aging. *Exp Gerontology* 2002;37:1189-96.
3. Larsen NB, Rasmussen M, Rasmussen LJ. Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways? *Mitochondrion* 2005;5:89-108.
4. Kyng KJ, Bohr VA. Gene expression and DNA repair in progeroid syndromes and human aging. *Ageing Res Rev* 2005;4:579-602.
5. Licht CL, Stevnsner T, Bohr VA. Cockayne Syndrome group B cellular and biochemical functions. *Am J Hum Genet* 2003;73:1217-39.
6. Neuman AS, Sturgis EM, Wei Q. Nucleotide excision repair as a marker for susceptibility to tobacco-related cancers: a review of molecular epidemiological studies. *Mol Carcinogenesis* 2005; 42:65-92.
7. Liberti SE, Rasmussen LJ. Is hEXO1 a cancer predisposing gene? *Mol Cancer Res* 2004;2:427-32.
8. Kunkel TA, Erie DA. DNA mismatch repair. *Annu Rev Biochem* 2005; 74:681-710.
9. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnology* 2004;26:249-61.
10. Athas WF, Hedayati MA, Matanoski GM et al. Development and field-test validation of an assay for DNA repair in circulating human lymphocytes. *Cancer Res* 1991;51:5786-93.

Erhvervede mutationer – basal cancerbiologi

1. reservelæge Kirsten Grønæk & professor Per Guldberg

H:S Rigshospitalet, Hæmatologisk Afdeling, og
Kræftens Bekæmpelse, Institut for Biologisk Kræftforskning

En milepæl i bestræbelserne på at kortlægge kræftens biologi har været erkendelsen af, at det er forandringer i cellernes gener (mutationer), der er den drivende kraft bag kræftudviklingen [1-3]. Der foreligger nu uigendriveligt bevis for, at mutationer i cellens genom er en forudsætning for malign vækst. Mutationerne repræsenterer det stabile element, der tilfører cellen nye egenskaber, og som overføres fra en generation af kræftceller til den næste. Fejl i generne opstår ofte tilfældigt i forbindelse med kopiering af genomet under celledeling, men kan også fremprovokeres af påvirkninger udefra.

Når en mutation bidrager positivt til en normal celledeling, vil der gennem gentagne celledelinger dannes en population af celler (klon), der alle har ophav i – og

dermed genetisk set er identiske med – den muterede celle. Herved opstår kræftudviklingens første, præmaligne stadie. For at kræften skal udvikle sig, må en af disse præmaligne celler erhverve sig endnu en mutation med vækstfremmende effekt, efterfulgt af en ny bølge af klonal ekspansion. Kræftdannelsen kan således beskrives som en trinvis – oftest langvarig – proces, hvor hvert trin repræsenterer en mutation i et kræftassocieret gen. Det skønnes, at 4-6 mutationer er nødvendige for dannelsen af en kræftcelle med invasive egenskaber [4]. Antallet afhænger af, hvilken celletype den givne kræftform udspringer fra, samt hvilke gener der muteres [5].

Kræft er altså altid en genetisk sygdom, om end sjældent arvelig i gængs forstand. Langt størstedelen af de registrerede kræfttilfælde er sporadiske sygdomme. I denne statusartikel beskrives, hvorledes gener kan forandres, så de får kræftfremmende egenskaber, endvidere beskrives de cellulære signalkæder og kontrolmekanismer, der påvirkes af mutationerne, og et konkret eksempel på, hvordan dannelsen af en malign tumor kan forklares ved forandringer i specifikke gener.

Onkogener, tumorsuppressorgener og stabilitetsgener

I visse tilfælde opstår kræft som følge af infektion med et virus, hvis genom i sig selv påvirker værtscellens vækstregulation. Langt de fleste kræfttilfælde opstår dog ved, at der sker forandringer i cellens egne gener. Kræftassocierede gener har en funktion i normale celler, hvor de dels styrer cellevækst og celledød, dels overvåger genomet, således at eventuelle skader i genomet kan korrigeres. Man kan inddеле disse gener i tre forskellige hovedtyper: 1) Onkogener, som fremmer cellevækst, 2) tumorsuppressorgener, som hæmmer cellevækst, og 3) stabilitetsgener, som korrigerer opståede fejl i genomet [1]. Den maligne fænotype er bestemt af den samlede status af onkogener, tumorsuppressorgener og stabilitetsgener.

Onkogener er dominante gener. Det vil sige, at når bare en af de to genkopier (alleller) bærer gendefekten, vil dette føre til dannelsen af et protein, som har en vækststimulerende effekt på cellen. Omvendt er tumorsuppressorgener og stabilitetsgener som regel recessive, dvs. begge cellens alleller skal inaktiveres, før den kræfthæmmende funktion fjernes.

Genetiske og epigenetiske forandringer

I kræftceller forandres onkogener således, at de bliver konstant aktive. Dette betyder, at mens generne i den normale celle kun er aktive som følge af en særlig stimulering (f.eks. fra vækstfaktorer), vil de i kræftceller aktiveres ukontrolleret, således at den proces, de styrer i de normale celler, konstant opreguleres. De genetiske fejl, som kan medføre konstant aktivering af onkogener, omfatter translokationer, øgning af antallet af kromosomer, genamplifikation og punktmutationer. Ved en translokation bringes sekvensen fra et gen sammen med sekvensen fra et andet gen, hvorved to principielt forskellige situationer kan opstå: I den første situation kommer materiale fra onkogenet under kontrol af det andet gens transkriptionsapparat, hvilket kan føre til øget transkription og dermed opregulering af onkogenet. I det andet tilfælde smelter de to gener sammen (fusionerer), således at genssekvenser fra begge gener udtrykkes i samme mRNA og koder for et helt nyt fusionsprotein med kræftfremmende egenskaber. Ved øgning af antallet af kromosomer og ved genamplifikation sker der i begge tilfælde det, at man får mere end de to normale kopier af onkogenet i cellen. Genet kan således transkriberes fra flere genomsekvenser end normalt, hvorved mængden af mRNA og protein øges. Ved en onkogen punktmutation vil der typisk være tale om en aktiverende mutation i et område af onkogenet, som koder for en katalytisk del af proteinet. Herved vil den cellulære proces, der katalyseres af det dannede protein, forløbe ukontrolleret.

Når tumorsuppressorgener og stabilitetsgener inaktiveres, taber cellen en funktion, den tidligere havde. Generne inaktiveres ved genetiske forandringer, som ændrer den kodende sekvens, eller ved epigenetiske forandringer, som blokerer gentranskriptionen uden at ændre genets basesekvens. De genetiske forandringer omfatter kromosomtab, større deletioner og punktmutationer. Ved såvel kromosomtab som

større deletioner mistes hele eller store dele af det strukturelle gen. Punktmutationerne omfatter 1) *missense*-mutationer, som typisk vil ændre en enkelt aminosyre, 2) enkeltbasedelektioner og -insertioner, som vil ændre genets læseramme, 3) stopmutationer, som afkorter genets læseramme, og 4) *splice-site*-mutationer, som medfører, at exoner ikke sættes korrekt sammen på mRNA-niveau.

Per definition omfatter de epigenetiske forandringer alle genspressionsændringer, som ikke skyldes ændringer i genernes baseparssekvens, og som »nedarves« stabilt gennem celledelingen. I praksis omfatter dette først og fremmest hypermetylering af CpG-dinukleotider lokaliseret til promoterregionen af tumorsuppressorgener, hvilket medfører, at gentranskriptionen permanent lukkes ned [6]. DNA-metylering er derfor funktionelt ækvivalent til genetiske forandringer som mutationer og deletioner, og de to alleller af et tumorsuppressorgen kan inaktiveres ved en vilkårlig kombination af genetiske og epigenetiske forandringer.

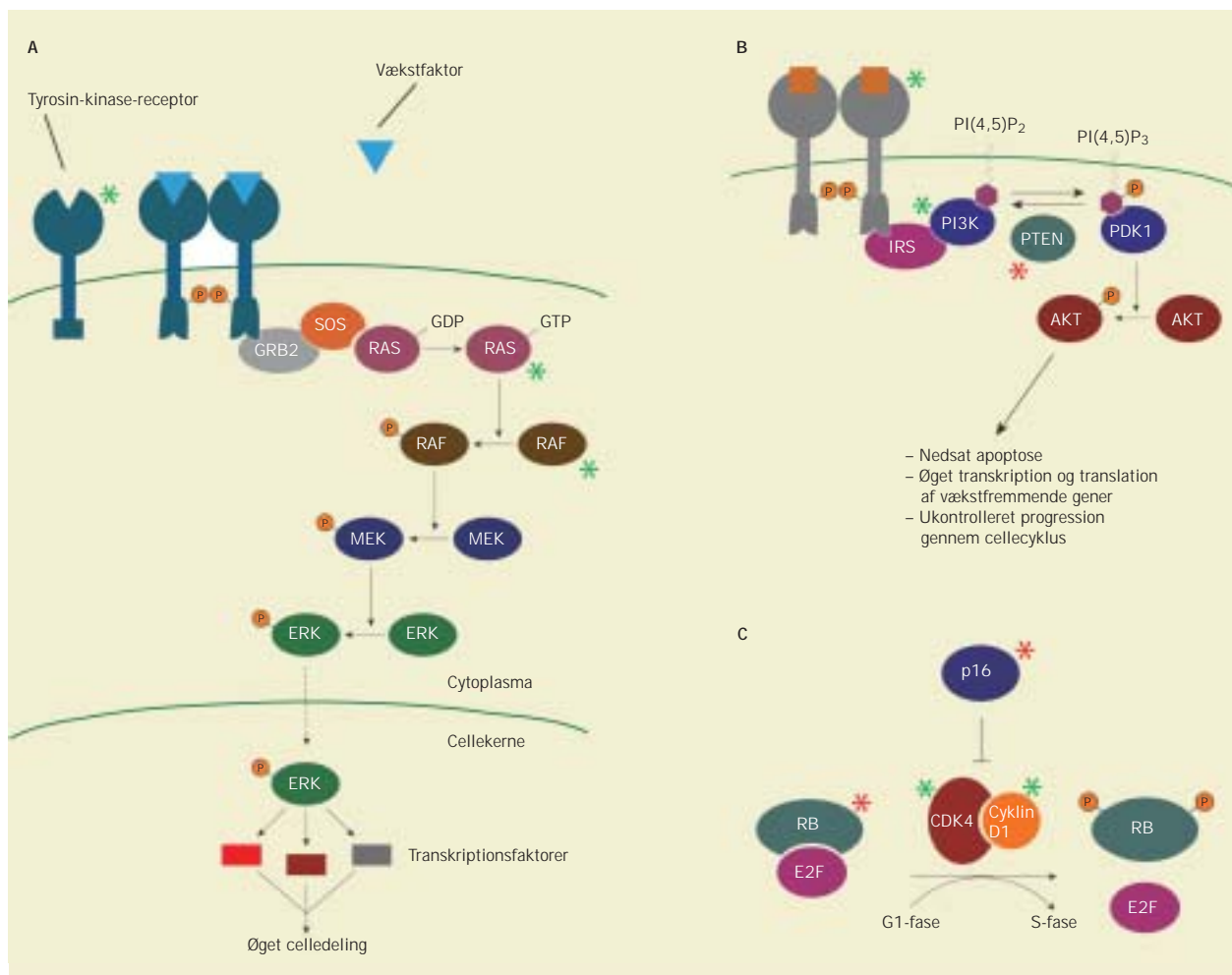
Mutationernes effektormekanismer

– cellulære signalkæder og restriktionspunktet

Onkogener og tumorsuppressorgener koder for proteiner, der indgår i den normale kontrol af cellers vækst og overlevelse. En normal celle deler sig kun, når der er behov for det – for eksempel når væv beskadiges, eller når gamle celler dør. Det er de omkringliggende celler og væv, der giver en celle besked om, hvornår den skal dele sig. Beskeden bliver givet ved udsendelse af et signal i form af vækstfaktorer. Signalet bliver opfanget af målcellen ved hjælp af membranbundne receptorer, der kan binde vækstfaktorerne og videregive information fra receptor til cellens indre (Figur 1). De proteiner, der videregiver informationen, udgør en signalkæde, og aktivering af de enkelte komponenter i signalkæden sker hyppigt ved fosforyleringsreaktioner. Mutationer i gener, der koder for proteiner i signalkæderne, kan forandre proteinerne således, at den naturlige aktiveringsmekanisme efterlignes. Signalkæden er herved konstant aktiv og opfører sig som om, den modtog signaler fra cellens overflade. Figur 1A og B viser to eksempler på cellulære signalkæder, RAS-RAF-MEK-ERK og PI3K-AKT, der er centrale i cellers deling og overlevelse, og hvis komponenter ofte er forandrede ved kræft [7, 8].

Kontrol af den normale celledeling under påvirkning af vækstfaktorer varetages blandt andet i det såkaldte restriktionspunkt, der overvåger overgangen fra G1-fase til S-fase i cellecyklus (Figur 1C). Bliver transmissionen gennem signalkæderne opreguleret uhensigtsmæssigt, som tilfældet er for kræftceller, aktiveres komponenter i restriktionspunktet, således at celledelingen standses. Skal en celle udvikles videre til en kræftcelle efter mutation i en signalkæde, der øger celledelingen, skal G1-S-restriktionspunktet mistes. Dette afspejles i hyppige mutationer af restriktionspunktets komponenter i de fleste kræftformer.

For restriktionspunktet og hver af de nævnte signalkæder



Figur 1. Cellulære signalkæder og G1-S-restriktionspunktet. Komponenter, der ofte findes muterede ved kræft, er markerede med en grøn (onkogene)- eller en rød (tumorsuppressorgener)-stjerne. **A.** RAS-RAF-MEK-ERK-signal-kæden formidler ekstracellulære celledelings-signaler. Vækstfaktor-receptoren er en tyrosinkinase, der kan sætte fosfatgrupper på (fosforylere) andre proteiner. Ved binding af vækstfaktor til receptoren, danner denne en dimer, der selv fosforyleres og efterfølgende kan fosforylere andre proteiner. Herved startes en signalkæde, der ender med, at ERK fosforyleres og transporteres ind i cellekernen, hvor den aktiverer en række transkriptionsfaktorer. Sidstnævnte starter en transkription af gener, der er nødvendige for en række cellulære processer, heriblandt celledeling. Flere af ERK-signal-kædens komponenter (selve receptoren, RAS og RAF) er onkogene eller muterede eller amplificerede i mange kræftformer. **B.** PI3K-AKT-signal-kæden transmitterer ligeledes signaler fra en overfladerceptor efter binding af vækstfaktor. Den kaskade af reaktioner, der startes ved binding af vækstfaktor, involverer aktivering af PI3K (fosfatidylinositol-3-kinase), der katalyserer omdannelsen af fosfatidylinositol-3,4-bisfosfat (PIP₂) til fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfat (PIP₃). Slutteligt fosforyleres kinasen AKT (også kaldet proteinkinase B, PKB), der aktiverer en lang række proteiner, der er involveret i cellens overlevelse og deling. Omdannelsen af PIP₂ til PIP₃ modvirkes af PTEN, der således fungerer som en tumorsuppressor i signalvejen. Ud over receptoren er onkogenet *PIK3CA* ofte aktiveret ved mutation i flere kræftformer, mens tumorsuppressoren *PTEN* ofte findes inaktiveret ved mutation eller deletion. **C.** Restriktionspunktet – overgangen fra G1- til S-fase – blokerer progression i cellecyklus. Passage af restriktionspunktet sker, når retinoblastomproteinet (RB) fosforyleres. Herved frigøres transkriptionsfaktorer (E2F), som er nødvendige, for at generne i syntesefasen (S-fasen) kan transkriberes. Fosforyleringen af RB udføres af en cyklinafhængig kinase (CDK4), som aktiveres ved binding til cyklin D1. Dette kompleks kan imidlertid hæmmes – og celledelingen dermed holdes i skak – af p16. Tab af restriktionspunktet vil medføre ukontrolleret celledeling og ses ved de fleste kræftformer enten gennem aktivering af et af onkogenerne *CCND1* (genet for cyklin D1) og *CDK4* eller gennem inaktivering af et af tumorsuppressorgenerne *RB1* og *CDKN2A*.

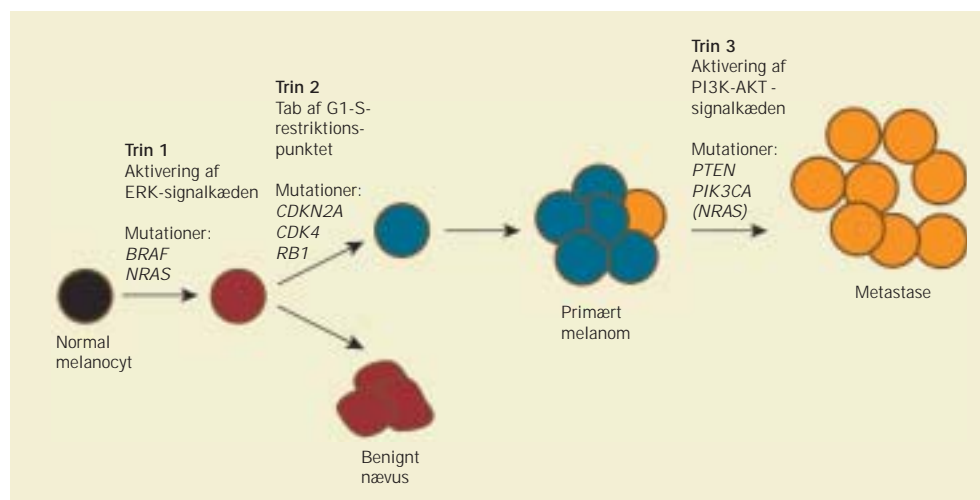
gælder det, at der i undersøgte tumorer er omvendt korrelation mellem forekomsten af mutationer i de enkelte komponenter. Mutation i en komponent er altså – i det mindste i en vis udstrækning – funktionelt ækvivalent til mutation i en anden komponent: Har en celle først fået en mutation i en komponent, er der ikke en selektiv vækstfordel forbundet med at erhverve en mutation i en anden komponent. Eksempelvis findes mutation af *RAS* og *RAF* sjældent i den samme tumor (Figur 1A), ligesom mutation af *RB1* og *CDKN2A* (genet, der koder for p16) sjældent forekommer samtidigt (Figur 1C).

Et eksempel – malignt melanom

For flere af de store kræftsygdomme er man nået langt i kortlægningen af de genetiske forandringer, der ligger til grund for den maligne vækst. I flere tilfælde ved man endda, om et givent gen forandres tidligt eller sent i kræftudviklingen. Som eksempel beskrives her malignt melanom, der opstår fra en melanocyt eller melanocytstamcelle (Figur 2). Selv om der utvivlsomt stadig er flere ubekendte i det genetiske grundlag for melanomudviklingen, kendes tre af de centrale cellulære mekanismer og de involverede gener [9]. Det skal dog under-

VIDENSKAB OG PRAKSIS | STATUSARTIKEL

Figur 2. Genetisk model for udvikling af malignt melanom.



streges, at visse elementer i nedenstående model er hypotetiske, især de, der vedrører metastasering.

Trin 1. Dannelse af en benign tumor – RAS-RAF-MEK-ERK-signalkæden

Første trin i udviklingen af melanom menes at være konstant aktivering af RAS-RAF-MEK-ERK-signalkæden. Dette sker ved mutation af enten *NRAS* eller *BRAF*. Mutation af *BRAF* er den hyppigste genetiske forandring i et melanom og findes i ca. 80% af tumorerne, mens de resterende tumorer i de fleste tilfælde har en *NRAS*-mutation.

Det vigtigste argument for, at *BRAF*- og *NRAS*-mutationer er tidlige hændelser i tumorudviklingen, er, at de forekommer hyppigt i benigne nævi.

Trin 2. Undgåelse af senescens – G1-S-restriktionspunktet

Melanocytter, der udtrykker den muterede form af *BRAF*, vil efter et vist antal delinger indtræde i en tilstand af irreversibel delingsstandsning, en såkaldt senescens. Et nævus kan således betragtes som en præmalign, neoplastisk læsion bestående af senescent celler. Skal melanomudviklingen fortsætte, må cellen slippe af med den barriere, der er ansvarlig for senescensresponsen, nemlig G1-S-restriktionspunktet [10]. Inaktivering af *CDKN2A* ved mutation, deletion eller promoterhypermetylering forekommer således i >70% af alle melanomer, mens aktiverende mutationer i *CDK4* eller inaktiverende mutationer i *RB1* forekommer som mindre hyppige alternativer.

Mutation i den ene allel af *CDKN2A*-genet, og sjældnere i *CDK4*-genet, er beskrevet som arvelige komponenter ved familiært melanom [9].

Trin 3. Metastasering – PI3K-AKT-signalkæden

Vækst af melanocytter og tidlige stadier af melanom er begrænset til epidermis, hvor deres spredning forhindres af omgivende keratinocytter. Samtidig er keratinocytterne gennem

deres produktion af vækstfaktorer vigtige for melanocytternes overlevelse. For at kunne metastasere skal melanocytterne undslippe keratinocytternes negative kontrol, men samtidig kunne overleve (undgå apoptose). Begge dele menes at kunne opnås ved aktivering af PI3K-AKT-signalkæden. Mutationer i *PTEN*-genet findes således hyppigt i melanometastaser, men kun sjældent i primære melanomer. Enkelte mutationer i *PIK3CA* (genet, der koder for PI3K) er også beskrevet i melanomer. Endelig er der mulighed for, at mutation af *NRAS* ud over at aktivere RAS-RAF-MEK-ERK-signalkæden også kan aktivere PI3K-AKT-signalkæden. Der er således invers korrelation mellem *NRAS*- og *PTEN*-mutationer i melanomer.

Korrespondance: Per Guldborg, Institut for Biologisk Kræftforskning, Kræftens Bekæmpelse, Strandboulevarden 49, DK-2100 København Ø.
E-mail: perg@cancer.dk

Antaget: 19. april 2006
Interessekonflikter: Ingen angivet

Litteratur

1. Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004;10:789-99.
2. Nielsen FC. Molekylær cancerbiologi – fra forskning til klinik. *Ugeskr Læger* 2003;165:897-900.
3. Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 2002;347:1593-603.
4. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
5. Rangarajan A, Hong SJ, Gifford A, Weinberg RA. Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell* 2004;6:171-83.
6. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415-28.
7. Smalley KS. A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma? *Int J Cancer* 2003;104:527-32.
8. Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 2005;24:7455-64.
9. De Snoo FA, Hayward NK. Cutaneous melanoma susceptibility and progression genes. *Cancer Lett* 2005;230:153-86.
10. Bennett DC. Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes. *Oncogene* 2003;22:3063-9.