

more than 60 constitutional syndromes and more than 27,000 acquired neoplastic diseases. Chromosome analysis has in later years been further refined by the application of fluorescent in situ hybridisation technologies which enables the detection of genetic rearrangements, depending on the method employed down to single gene levels. Chromosome analysis is not only important in the diagnostic situation, but even more so in the prognostication of a wide range of diseases and especially with regard to malignant diseases in the follow-up to monitor treatment response. In addition, cytogenetics play an important role for unravelling the biology of neoplastic disease and the addition of relevant fluorescent in situ hybridisation and chip technologies will contribute with important information on pathogenetic mechanisms of both constitutional and acquired disease states.

Reprints: *Eigil Kjeldsen*, Klinisk Genetisk Afdeling, Århus Kommuneskøbshospital, Århus Universitetshospital, DK-8000 Århus C.

Antaget den 23. januar 2003.
Odense Universitetshospital, Patologisk Institut, og
Århus Universitetshospital, Klinisk Genetisk Afdeling.

Litteratur

1. Waldeyer W. Über Karyokinese und ihre Beziehung zu den Befruchtungsvorgängen. *Arch Mikr Anat* 1888;32:1.
2. Painter TS. Studies in mammalian spermatogenesis. II. The spermatogenesis of man. *J Exp Zool* 1923;37:291-336.
3. Levitsky GA. Materielle Grundlagen der Vererbung. Kiew: Staatsverlag, 1924.
4. Tijo JH, Levan A. The chromosome number of man. *Hereditas* 1956;42:1-6.
5. Lejeune J, Gautier M, Turpin R. Études des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens. *Compt Rend Acad Sci* 1959;248:1721-2.
6. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960;132:1497.
7. Casperson T, Zech L, Johansson C. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp Cell Res* 1970;60:315-19.
8. Sumner AT. Chromosome banding. London: Unwin Hyman Ltd., 1990.
9. Yunis JJ. High resolution of human chromosomes. *Science* 1976;191:1268-70.
10. Yunis JJ. New chromosome techniques in the study of human neoplasia. *Hum Pathol* 1981;12:540-9.
11. Kjeldsen E, Kølvrå S. FISH techniques, FISH probes and their applications in medicine and biology – an overview. I: Rautenstrauss B, Liehr T, eds. *FISH technology*. Heidelberg: Springer Lab Manual, 2002: 3-50.
12. Mitelman F, ed. *ISCN 1995: An international system for human cytogenetic nomenclature*. Basel: S. Karger; 1995.
13. Venter JC, Adams MD, Myers EW et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291: 1304-51.
14. Lander ES, Linton LM, Birren B et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-921.
15. Schinzel A. *Catalogue of unbalanced chromosome aberrations in man*. 2nd ed. Berlin: Walter de Gruyter and Co., 2001.
16. Mitelman F. *Catalog of chromosome aberrations in cancer*. 5th ed. New York: Wiley-Liss; 1994. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman/> jan. 2003.
17. Schröck E, du Manoir S, Veldman T et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996;273:494-7.
18. Speicher MR, Ballard SG, Ward DC. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet* 1996;12:368-75.
19. Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Sudar D et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumours. *Science* 1992;258:818-28.
20. Chudoba I, Plesch A, Lorch T et al. High resolution multicolor-banding: a new technique for refined FISH analysis of human chromosomes. *Cytogenetic Cell Genet* 1999;84:156-60.
21. Harper PS. *Practical genetic counselling*. 5th ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1999.
22. Joly G, Lapierre JM, Ozilou C et al. Comparative genomic hybridization in mentally retarded patients with dysmorphic features and a normal karyotype. *Clin Genet* 2001;60:212-9.
23. Kirchhoff M, Rose H, Gerdes T et al. Påvisning af submikroskopiske kromosomfejl med komparativ genomisk hybridisering *Ugeskr Læger* 2001;163:5652-7.
24. De Vries BBA, White SM, Knight SJL et al. Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J Med Genet* 2001;38:145-50.
25. Grimwade D, Walker H, Oliver F et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood* 1998;92:2322-33.
26. Forestier E, Johansson B, Gustafsson G et al. Prognostic impact of karyotypic findings in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Nordic series comparing two treatment periods. For the Nordic Society Of Paediatric Haematology and Oncology (NOPHO) Leukemia Cytogenetic Study Group. *Br J Haematol* 2000;110:147-53.
27. Kernstrup G, Kjeldsen E. Acute leukemia cytogenetics: an evaluation of combining G-band karyotyping with multi-colour spectral karyotyping. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;124:7-11.

Molekylær cancerbiologi – fra forskning til klinik

STATUSARTIKEL

Finn Cilius Nielsen

Cancer er i takt med den stigende levealder blevet en af de hyppigste dødsårsager i den vestlige verden. Begrebet dækker over en mangearartet gruppe af tilstande, der alle er karakteriseret ved en ukontrolleret og invasiv cellevækst. Med få undtagelser opstår cancer i en enkelt celle. Overgangen fra normal til transformeret celle skyldes akkumulerede genetiske eller epigenetiske defekter i protoonkogener eller så-

kaldte tumorsuppressorgener, pga. en genetisk prædisposition, miljøfaktorer, mikroorganismer eller aldring. I artiklen beskrives eksempler på molekylære aspekter af cancer og deres anvendelse i cancerdiagnostik og -terapi (1).

Protoonkogener, onkogener og tumorsuppressorgener
Onkogenbegrebet stammer fra slutningen af 1960'erne, hvor man fandt, at en række virale gener kunne transformere celler i kultur. Der kendes nu mere end 50 forskellige protoonkogener og onkogener. Stort set alle koder for proteiner, der er centrale i reguleringen af cellevækst, såsom

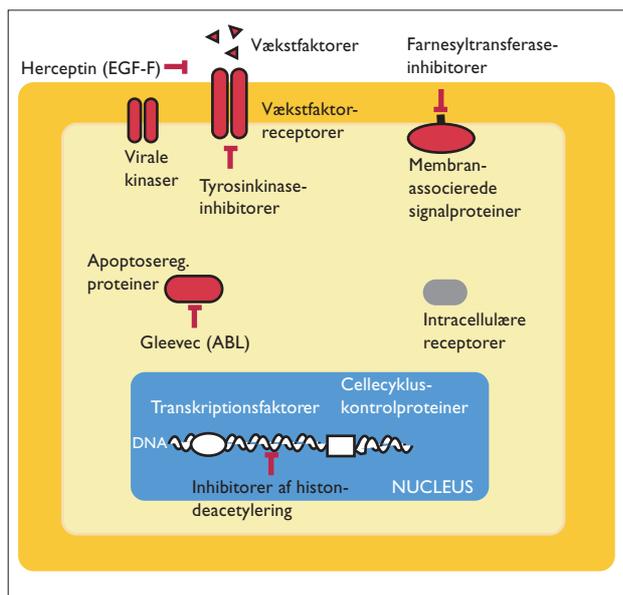


Fig. 1. Protoonkogens og onkogens cellulære funktioner og eksempler på hvordan nye kemoterapeutika er rettet mod blokering af onkogene. *ERB-B2*-signalerung kan hæmmes af et monoklonalt antistof – herceptin – og dette anvendes ved behandlingen af *ERB-B2*-positive brystcancer. En selektiv *EGF-R*-tyrosinkinaseinhibitor (ZD1839) er ydermere under afprøvning for fremskreden småcellet lungecancer. Farnesyltransferasehæmmere forhindrer forankring af *RAS*-protoonkogenet i cellemembranen og kinasehæmmeren Gleevec hæmmer *ABL*-kinasen (se teksten). Promotormetylering modificerer bindingen af transkriptionsfaktorer og er ofte forbundet med repression af genaktivitet og er en almindelig årsag til inaktivering af tumorsuppressorgener i forbindelse med cancer. For få år siden blev det klart, at de enzymer, der acetylerede histonerne fungerede sammen med metyleringsenzymene. Flere farmaceutiske firmaer har øjnet muligheden for at påvirke metylering af DNA og histoner, og et stof, som interfererer med deacetyleringen af histoner, er i klinisk afprøvning mod cancer.

vækstfaktorer, vækstfaktorreceptorer (receptortyrosinkinaser), proteiner involveret i signaltransduktion (G-proteiner, tyrosinkinaser), cytoplasmatiske tyrosin- og serinkinaser samt transkriptionsfaktorer (Fig. 1) (1).

Tumorsuppressorgener er i modsætning til onkogene primært negative regulatorer af celledelingen. Det første bevis for, at tab af genfunktion var forbundet med cancer, stammer primært fra Alfred Knudsons studier af retinoblastomer (2). Retinoblastomer forekommer som mange andre tumorer i både en arvelig og en sporadisk form. I de arvelige tilfælde får barnet typisk bilaterale tumorer inden seks månedersalderen, mens de sporadiske tilfælde normalt optræder senere og unilateralt. Den varierende tumorincidens forklares ved den såkaldte *two-hit*-model, hvor barnet i de arvelige tilfælde arver et defekt tumorsuppressor-allel, hvorefter en somatisk mutation i det andet allel medfører tab af kontrol over celledelingen. Sporadiske tumorer udvikles først efter en tilfældig inaktivering af begge alleler. Tumorsuppressorgener er langt hyppigere forbundet med hereditær cancer end protoonkogene er, sandsynligvis fordi tilstedeværelse af det normale tumorsuppressorallel sikrer en normal udvikling, hvorimod aktivering af et dominant protoonkogen er let. Man kan katalogisere de fleste gener i to grupper, hvor den ene primært omfatter gener, der er involveret i regule-

ring af celledeling, apoptose og cellemotilitet, mens den anden omfatter gener, der er involveret i DNA-reparation og vedligeholdelse af genomets integritet.

Progression fra normal til malign celle

Mennesket består af $\sim 10^{14}$ celler, og der opstår $\sim 10^7$ mutationer under celledelingen. På trods af dette er det kun hver tredje af os, der får cancer. Der er næppe tvivl om, at vi besidder meget effektive antiproliferative systemer, så cancer kun opstår, når disse er defekte. Mellem fire og syv genetiske ændringer skønnes at være nødvendige for malign transformation. Progression fra normalt epitel til karcinom er intensivt undersøgt i kolorektale tumorer, hvor processen omfatter konsekutive mutationer i tumorsuppressorgenerne APC, DCC og p53 og protoonkogene RAS og C-MYC. Generne og rækkefølgen af mutationer varierer fra cancer til cancer, men meget tyder på, at transformationen ikke foreløber tilfældigt, og dette har skabt forhåbning om, at »tumorprofiling« og analyse af cancergener vil kunne anvendes til diagnostik. For mange hæmatologiske og pædiatriske tumorer, herunder sarkomer, kan transformationen formentlig ske via mere selektive mekanismer, idet tumorcellerne ofte bærer specifikke translokationer eller genamplifikationer, der medfører aktivering af proteiner med betydning for vækst og differentiering. Et velbeskrevet eksempel er fusionen af EWS til FLI1, ERG- eller WT1-generne ved Ewing-sarkomer eller PAX3- og FKHR-generne ved rhabdomyosarkomer.

I mange tilfælde har man et detaljeret billede af, hvorledes genaktivering og inaktivering fører til den maligne fænotype. Dette gælder især for de onkogene kinaser, der er målet for en række nye anticancermedler og DNA-reparations-systemerne, der har bidraget væsentligt til vores forståelse af genomisk instabilitet ved både sporadisk og hereditær cancer. Endelig har flere nyopdagede embryonale signalsystemer med afgørende betydning for den normale celledifferentiation vist sig at spille en betydelig rolle ved cancer og har sat fokus på stamcellerne i forbindelse med udviklingen af malign vækst.

Onkogene kinaser

Tyrosinkinaserne er den største gruppe af dominante onkogene, og somatiske mutationer i denne gruppe af gener forårsager en stor fraktion af cancer hos mennesker (3). Den transformerende effekt af receptortyrosinkinaser (RTK) skyldes øget eller konstitutiv kinaseaktivitet med en kvantitativ eller kvalitativ ændret nedestrømssignalerung. Et klassisk eksempel på RTK's rolle ved cancer er NEU/ERB-B2 og EGF-receptor-overekspression i bryst- og lungekarcinomer. *ERB-B2*-signalerung kan hæmmes af et monoklonalt antistof – herceptin – og dette anvendes ved behandlingen af *ERB-B2*-positive brystcancer. En selektiv *EGF-R*-tyrosinkinaseinhibitor (ZD1839) er ydermere under afprøvning ved fremskreden småcellet lungecancer. Cytoplasmatiske tyrosinkinaser er også involveret i forskellige cancer hos mennesker. Kronisk myeloid leukæmi (CML) forårsages således af en specifik translokation – det såkaldte Philadelphia-kromosom, som omfatter nonreceptor-protein-tyrosinkinase c-

ABL på kromosom 9 og BCR-genet på kromosom 22. I kerne medvirker c-ABL ved DNA-skade-induceret apoptose, men BCR-ABL-fusionsproteinet kan ikke mediere denne funktion, fordi det tilbageholdes i cellens cytoplasma. Man har i en årrække forsøgt at udvikle selektive hæmmere af tyrosinkinaser, og i 1996 fandt man STI571 (Gleevec™) (4), som viste sig at være en specifik blokker af BCR-ABL-fusionsproteinet. STI571 kan ikke blot hæmme væksten af BCR-ABL-transformerede leukæmiske celler, men inducerer også apoptose af cellerne, idet BCR-ABL transporteres ind i kernen. STI571 fremkalder remission hos ca. 50% af CML-patienterne, og på grund af kinasehæmmerens udtalte specificitet er der få bivirkninger i forbindelse med denne form for kemoterapi.

DNA-reparation

Arvelige og erhvervede defekter i det genomiske vedligeholdelsessystem bidrager væsentligt til karcinogenesen (5). Den genetiske instabilitet forårsages af DNA-skader og af de fejl, der introduceres af replikationsmaskineriet under celledelingen. Normalt udløser DNA-skader et stop af cellecyklus og/eller celledød, men på længere sigt opstår irreversible mutationer, der nedarves til andre celler. Dobbeltstrenget DNA-brud efter ioniserende stråling starter f.eks. en kaskade af reaktioner for at bremse cellecyklus og rekruttere reparationsfaktorer. En af de tidligste inhibitorer er ataxia teleangiectasia-muteret proteinkinase (ATM), der er inaktiveret ved det røntgenstrålefølsomme ATM-cancersyndrom. Nukleotid-*repeats* er ligeledes ustabile ved mange cancere hos mennesker. Mikrosatellitinstabiliteten forårsages af defekter i *mismatch repair*-systemet, som fjerner misparrede nukleotider og små insertioner eller deletioner. Arvelige mutationer er forbundet med arvelig nonpolyposis kolorektalcancer (HNPCC). Defekter i MMR-systemet øger mutationsraten og stimulerer på den måde karcinogenesen (1).

Stamceller og embryonale signalveje

Stamceller har mange tumorcellekaraktistika – f.eks. evnen til selvfornyelse og ubegrænsede celledelinger. Selv om cancerincidensen vokser med alderen, og dette antages at reflektere nødvendigheden af flere mutationer for at opnå malign transformation, ved man også, at risikoen for hudkarcinomer består igennem hele livet efter kraftig solesponering. Påvirkningen rammer derfor med stor sandsynlighed stamcellerne i huden. Man har identificeret en række embryonale signalveje, som er aktiveret ved forskellige cancerformer, og som under normale omstændigheder kontrollerer stamcellerne. Interessen har samlet sig om de såkaldte *hedgehog*- og *Wnt*-signalproteiner (6). Tumorer, som er forbundet med forstyrrelser i *Wnt*- og *hedgehog*-signalerne, opstår i de væv, hvor signalvejene normalt er aktive, f.eks. hud og tarm. I tumorerne forårsager en mutation en ligand-uafhængig aktivering af signalvejen, og dette stimulerer celledelingen og medfører en fejlagtig specifikation af cellerne, således at de bliver i stand til at dele sig uendeligt. *Hedgehog*-pathway er f.eks. inaktiveret ved Gorlins syndrom med basalcellekarcinomer og medulloblastomer. *Hedgehog* spiller

også en vigtig rolle ved sporadiske medulloblastomer, idet en fortsat proliferation af cerebellums granuleceller kun kan opretholdes i tilstedeværelse af *hedgehog*, der hæmmer deres terminale differentiering.

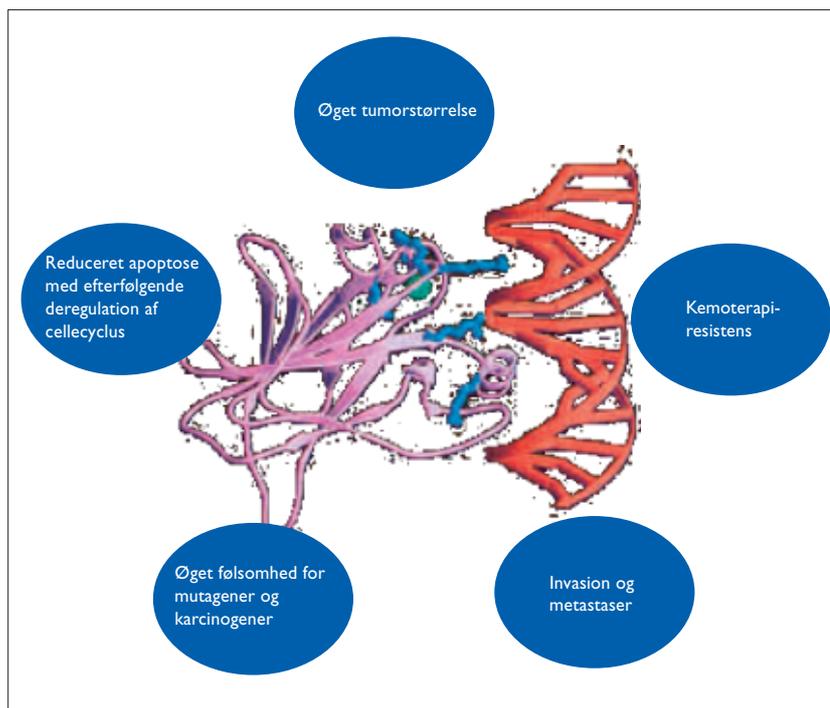
Molekylærgenetisk cancerdiagnostik

Kendskabet til det molekylære grundlag for den maligne vækst har medført betydelige diagnostiske og behandlingsmæssige fremskridt ved cancer (7). Med følsomme PCR-baserede assays har det været muligt at påvise APC-, RAS- og p53-mutationer i blod, urin, spyt eller faeces, før tumorer kunne diagnosticeres med konventionelle procedurer (Fig. 2). De fleste studier er baseret på identifikation af punktmutationer i generne, og dette begrænser selvfølgelig anvendelsen af analyserne. Man har derfor søgt at anvende mere generelle DNA-markører – f.eks. ændringer i mikrosatellitter. Da mikrosatellitterne er polymorfe, kan man adskille maternelle og paternelle alleler. Ved at analysere parrede prøver af normalt DNA og tumor-DNA er det muligt at påvise tab af et eller flere alleler for tumorsuppressorgener. Med mikrosatellitanalyser kan man også detektere tilstedeværelsen af nye alleler som tegn på mikrosatellitinstabilitet, hvilket ses ved 15-20% af alle sporadiske tumorer.

Molekylære markører kan også benyttes til at vurdere invasionen af tumorceller lokalt eller i blodbanen. Hidtil er tumorspredningen fra resektionsrande evalueret histologisk, men dette er ofte meget usikkert, da der kan være ganske få efterladte tumorceller. I et studie af patienter med kolorektal cancer kunne man med en p53-mutationsundersøgelse påvise efterladte tumorceller hos omtrent halvdelen af patienterne med »frie« resektionsrande. På trods af strålebehandling fik en tredjedel af disse patienter recidiv. Ligeledes har det været muligt at påvise p53- og RAS-mutationer i tilsyneladende sygdomsfrie lymfeknuder ved kolorektal- og lungecancer, men det kliniske udbytte for patienterne er endnu ikke endeligt vurderet. Ud over den lokale spredning kan de maligne celler metastasere via blodstrømmen og vokse op i andre organer. Cancerpatienter har store mængder cirkulerende DNA i serum og plasma, og blodprøver kan analyseres for DNA-markører. Hos patienter med hoved-hals-tumorer og småcellede lungekarcinomer har man kunnet påvise mutationer i blodet. Analyse af blod eller marv fra neoplastiske fusionstranskripter bliver nu rutinemæssigt benyttet til at monitorere patienter med kronisk myeloid leukæmi, sarkomer eller neuroblastomer.

UL-baseret biopsitagning udvikler sig med rivende hastighed i disse år, og man kan få små mængder væv fra stort set alle områder af kroppen. Selv om patologisk diagnostik er meget værdifuld, er der næppe tvivl om, at det kan være vanskeligt at skelne mellem benigne præneoplastiske læsioner og cancer. PCR-baseret påvisning af cancerspecifikke forandringer vil her være et vigtigt supplement. Et allerede fungerende eksempel er suppleringen af den cytologiske undersøgelse af cervix-smears med en molekylærgenetisk analyse for tilstedeværelsen af HPV-virus. Ligeledes tyder alt på, at DNA-*microarrays* er særdeles effektive til at klassificere cancere hos mennesker. *Array*-baseret klassifikation

Fig. 2. p53 et centralt molekyle i carcinogenesen. p53 er et af de hyppigst muterede tumorsuppressorgener i cancer hos mennesker. p53 er et DNA-bindende protein, som bl.a. regulerer transkriptionen af p21 – et protein, der er involveret i celleyklusregulation. Billedet i midten viser krystalstrukturen af p53 bundet til DNA (adapteret fra 8), samt de mest almindelige mutationer, der rammer fire argininer, som er nødvendige for DNA-binding. p53 induceres af stråling, oxidativt stress, og forskellige onkogener, og dette medfører en aktivering af p21. Herudover medierer p53-apoptose, hvorved organismen undgår en klonal ekspansion af celler med et skadet genom. Tab af p53-aktivitet er ved de fleste almindelige cancers forbundet med en meget dårlig prognose og patienter med tab af p53 er ofte resistente over for visse kemoterapeutika. p53 har med succes været anvendt til identifikation af cirkulerende tumorceller i blod og tumorceller i urin, fæces eller ekspektorat, og det forventes, at mutationsundersøgelse af p53 er en af de første genetiske markører, der får en plads i den daglige klinik.



har været anvendt ved bryst-, kolorektal-, blære- og prostatakræft, maligne melanomer og ved forskellige former af leukæmier og lymfomer. I alle tilfælde har man fundet, at den patologiske diagnose kunne forfines og forbedres. I et nyere arbejde om brystcancer viste man, at det via *microarray*-undersøgelse var muligt at udpege brystkræftpatienter, der som udgangspunkt havde en god prognose og ikke behøvede kemoterapi. Ligeledes har man kunnet opstille en præcis prognose for patienter med medulloblastomer, hvilket man ikke tidligere har kunnet gøre. *Microarrays* peger således frem mod en mere individuel diagnostik og prognostisk vurdering.

Summary

Finn Cilius Nielsen: Molecular cancer biology.

Ugeskr Læger 2003;165:897-900.

Recent progress in our understanding of the mechanism of transformation has contributed to the development of novel molecular approaches for the detection and classification of cancer. The review focuses on the molecular background of cancer, the role of oncogenic kinases, genetic instability and embryonal signalling pathways. Moreover, examples of novel diagnostic and therapeutic possibilities are described.

Reprints: Finn Cilius Nielsen, Klinisk Biokemisk Afdeling, H:S Rigshospitalet, DK-2100 København Ø.

Antaget den 27. januar 2003.
H:S Rigshospitalet, Klinisk Biokemisk Afdeling.

Litteratur

- Nielsen FC. Klinisk molekylærbiologi. København: Munksgaard, 2002.
- Knudson AG. All in the (cancer) family. Nat Genet 1993;5:103-4.
- Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. Nature 2001;411:355-65.
- Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 2001;344:1031-7.
- Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature 2001;411:366-74.
- Taipale J, Beachy PA. The hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. Nature 2001;411:349-54.
- Sidransky D. Molecular screening – how long can we afford to wait? J Natl Cancer Inst 1994;86:955-6.
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD et al. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. Science 1994;265:346-55.