

Somatische Mutationen in Sarkomen

Heinrich Kovar

Forschungsinstitut für krebserkrankte
Kinder im St. Anna Kinderspital
Wien, Austria

Zusammenfassung

Unter den soliden Tumoren zeichnen sich Sarkome meist durch das Vorliegen chromosomaler Translokationen aus, welche zur Bildung einzigartiger und meist Tumor-spezifischer Fusionsproteine führen. Diese chimären Genprodukte eignen sich hervorragend als Marker für den Nachweis disseminierter Tumorzellen. Eine Ausnahme stellt das Osteosarkom dar, in welchem ein äusserst komplexer Karyotyp bisher keine wiederkehrenden chromosomalen Umlagerungen erkennen ließ. Vielmehr weist die scheinbare Unordnung des Chromosomenbildes auf eine allgemeine Instabilität des Genoms von Osteosarkomen hin, welche möglicherweise mit dem häufigen Verlust der Aktivität der p53 oder Rb1 Tumorsuppressorgene zusammenhängt. In jenen Sarkomen, welche durch chromosomale Translokationen charakterisiert sind (Ewing's Sarkom, Synovialsarkom, Rhabdomyosarkom, Liposarkom, usw.) wird eine gewisse molekulare Variation der Genrearrangements beobachtet, welche mit unterschiedlicher Biologie und klinischem Verhalten einhergehen kann. Während zur Diagnose dieser Aberrationen heute vornehmlich klassische und molekularzytogenetische Methoden sowie die Polymerasekettenreaktion Einsatz finden, so liegt die Zukunft der genetischen Diagnostik in der Anwendung von Microarray-basierenden Techniken.

Stichworte

Chromosomale Translokation, Fusionsproteine, Tumorsuppressorgene, minimale Resterkrankung

Summary

Among human solid tumors, sarcomas are characterized by chromosomal translocations that result in the production of unique, tumor specific fusion proteins. These chimeric gene products are excellently suited as markers for the detection of disseminated tumor cells. In this respect osteosarcoma may represent an exception. Here, a frequently very complex karyotype did not allow for the identification of recurrent chromosomal aberrations, so far. Rather the apparent karyotypic mess points to a general instability of the osteosarcoma genome, which may result from the frequent loss of p53 and Rb gene tumor suppressor activity in this tumor. In those sarcomas, which are characterized by specific chromosomal translocations (Ewing's sarcoma, synovial sarcoma, rhabdomyosarcoma, liposarcoma, etc.), molecular variation of the gene rearrangements has been observed which may parallel biological and clinical heterogeneity of the disease. Today, the diagnosis of genetic aberrations in sarcomas is based upon classical and molecular cytogenetics and polymerase chain reaction technology. However, in the future microarray based techniques will become more and more important.

Keywords

chromosomal translocation; fusion proteins; tumor suppressor genes; minimal residual disease;

Translokationen

Das zytogenetische Charakteristikum von Leukämien und Lymphomen ist die chromosomale Translokation. Diese Art der genetischen Aberration wird unter den soliden Tumoren vornehmlich in Sarkomen angetroffen, worin sich diese wesentlich von epithelialen Tumoren unterscheiden. In Leukämien und Lymphomen führen chromosomale Translokationen zu Genumlagerungen, welche entweder die Überexpression eines der beteiligten Gene bewirken oder die Bildung eines Fusionsproduktes mit neuen Eigenschaften zu Folge haben. In Sarkomen wird hingegen ausschließlich die Bildung von chimären Genprodukten, welche meist Transkriptionsfaktoraktivität aufweisen, beobachtet. Obwohl diese Genrearrangements in der Regel reziprok vorliegen, so erfolgt die Expression doch nur von einem der beiden rearrangierten Genloci.

Spezifität und Diagnose

Von großer biologischer und diagnostischer Bedeutung ist die Spezifität der beobachteten Translokationen für verschiedene Sarkomentitäten (Tabelle). Auch wenn vielfach komplexe chromosomale Aberrationen beobachtet werden, deren Struktur nur mittels neuer molekularzytogenetischer Techniken wie „Spectral Karyotyping“ aufgelöst werden kann, so verbirgt sich dahinter meist ein für den Tumor spezifisches, molekulargenetisch definiertes Genrearrangement. Die starke Assoziation dieser Genfusionen mit der spezifischen Erkrankung und experimentelle Daten, welche auf die Unverzichtbarkeit des

Tab Somatische Mutationen in Sarkomen

Erkrankung	Translokation	Genfusion
Alveoläres Rhabdomyosarkom	t(2;13)(q35;q14)	<i>PAX3-FKHR</i> <i>PAX7-FKHR</i>
Ewing's Sarkom Familie	t(11;22)(q24;q12) t(21;22)(q22;q12) t(2;22) t(7;22)(p22;q12) t(17;22)(q12;q12)	<i>EWS-FLI1</i> <i>EWS-ERG</i> <i>EWS-FEV</i> <i>EWS-ETV1</i> <i>EWS-E1AF</i>
Malignes Melanom der Weichteile	t(12;22)(q13;q12)	<i>EWS-ATF1</i>
Desmoplastischer Rundzelltumor	t(11;22)(p13;q12)	<i>EWS-WT1</i>
Extraskelettales Myxoides Chondrosarkom	t(9;22)(q22;q12) t(9;17)(q22;q11.2)	<i>EWS-CHN</i> <i>TAFII68-CHN</i>
Synovialsarkom	t(X;18)(p11;q11) t(X;18)(p11;q11)	<i>SYT-SSX1</i> <i>SYT-SSX2</i>
Myxoides Liposarkom	t(12;16)(q13;p11) t(12;22)(q13;q12)	<i>TLS-CHOP</i> <i>EWS-CHOP</i>
Congenitales Fibrosarkom	t(12;15)(p13;q25)	<i>ETV6-NTRK3</i>
Dermatofibrosarkoma protuberans	t(17;22)(q22;q13)	<i>COL1A1-PDGFB</i>

jeweiligen Fusionsproduktes für das Tumorzellwachstum in-vitro und die Tumorigenität im Mausmodell hinweisen, stellen die Grundlage für den diagnostischen Nachweis auf der Ebene des Genproduktes dar. Denn um die Funktionsfähigkeit des Genproduktes zu erhalten, ist die Ursache der Fusionsgenbildung meist eine Umlagerung innerhalb der Genintrons, welche auf mRNA und folglich Proteinebene nicht mehr enthalten sind. Daher führt die chromosomale Translokation auf RNA Ebene zu streng definierten Produkten, auch wenn die Bruchpunktslage auf den an der Umlagerung beteiligten Chromosomen ein hohes Maß an Variation zeigt. Der Nachweis spezifischer Genfusionen erfolgt deshalb heute meist mittels einer Kombination aus Reverser Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR). Diese Methode geht von RNA aus, welche in ausreichend intakter Form nur aus sofort nach der Entnahme schockgefrorenem Gewebe gewonnen werden kann. Der Vorteil dieser Methode ist die hohe Sensitivität und Spezifität. Von Nachteil ist nicht nur die Problematik des Versandes gefrorenen Materials an das Referenzlabor, sondern auch eine gewisse Fehleranfälligkeit der Analyse, welche sich aus häufig mangelhafter Qualität des Untersuchungsmaterials einerseits, und sensitivitätsbedingtem Kontaminationsrisiko andererseits erklärt. Hier kann die Anwendung von Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) mittels Gen-spezifischer Sonden Abhilfe schaffen. Dieser Methode sind nicht nur Metaphase- und Interphasekerne

in gleicher Weise zugänglich, sondern sie kann auch auf Tupfpräparaten durchgeführt werden, was die Aufarbeitung und den Versand des Materials bedeutend vereinfacht.

Da es sich bei den Translokationsbedingten chimären Genprodukten um absolut einzigartige Moleküle handelt, die ausschließlich von den Tumorzellen gebildet werden, können sie als Tumormarker zum Nachweis residueller Tumorzellen im Rahmen der Evaluation des Therapieansprechens beziehungsweise der minimalen Resterkrankung herangezogen werden. Auch dieser Nachweis erfolgt heute fast ausschließlich mittels RT-PCR. So wird erstmals für solide Tumoren die Bedeutung der minimal disseminierten Erkrankung durch Nachweis der Tumorzellen im Knochenmark mittels RT-PCR im Rahmen der Europäischen Ewing's Sarkom Studie Euro-E.W.I.N.G.99 prospektiv untersucht (Peter, 1995; Zoubek, 1998).

Variation der Translokationen

Wie aus der Tabelle ersichtlich, werden in einigen Sarkomen alternative Genfusionen angetroffen. Dabei zeigt sich, dass ein Fusionspartner, etwa das *EWS* Gen beim Ewing's Sarkom, das *ALV* Gen beim alveolären Rhabdomyosarkom, oder das *SYT* Gen beim Synovialsarkom mit verschiedenen Partnergenen fusionieren kann. Auch dieses Phänomen ist aus Leukämien bekannt (z.B. *TEL*, *MLL*). Anders aber als etwa bei den *MLL* Genrearrangements, fusionieren die konstanten Translokationspartner in Sarkomen immer mit Partnern eines für

die jeweilige Erkrankung spezifischen Typs: So kennen wir aus Ewing's Sarkomen fünf alternative *EWS* Fusionen ausschließlich mit Mitgliedern der *ETS* Transkriptionsfaktor Familie (*FLI1*, *ERG*, *ETV1*, *E1AF*, und *FEV*) (Arvand, 2001). Im alveolären Rhabdomyosarkom fusioniert *ALV* mit einem *PAX* Transkriptionsfaktorgen (Barr, 2001), im Synovial Sarkom finden sich *SYT-SSX1* oder *SYT-SSX2* Translokationen (Ladanyi, 2001). Genrearrangements von *EWS* mit anderen Transkriptionsfaktortypen wie *CHOP*, *ATF1* oder *WT1* sind mit deutlich distinkten Malignomen (myxoides Liposarkom, malignes Melanom der Weichteile, Desmoplastischer Rundzelltumor) assoziiert (Kovar, 1998). Die Bedeutung der Transkriptionsfaktor-komponente für den Tumorphänotyp konnte auch experimentell in einem transgenen System in der Maus belegt werden (Arvand, 2001). Was die konstante Komponente der Translokation betrifft, so stellt das myxoide Liposarkom eine Ausnahme insofern dar, dass *EWS* auch durch das nahe verwandte *TLS* ersetzt werden kann (Kovar, 1998). Auch hier konnte die funktionelle Austauschbarkeit der beiden Gene experimentell belegt werden. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass auch ein weiterer Verwandter des *EWS* Gens, *TAF_{II}68*, in eine Tumor-spezifische Translokation alternativ zu *EWS* mit dem nukleären Rezeptor *CHN* im extraskeletalen myxoiden Chondrosarkoma verwickelt sein kann (Tabelle). Daher kommt der *TLS/EWS/TAF_{II}68 (TET-)* Genfamilie eine besondere Bedeutung für die Sarkomentwicklung zu.

Die molekulare Vielfalt der Fusionspartner wird in einigen Sarkomen noch durch eine gewisse Variation der Struktur des Fusionsproduktes ergänzt. Unterschiedliche Bruchpunktlagen in verschiedenen Introns und alternatives Splicing führen zum Einschluss unterschiedlicher Exons in die Fusions-RNA (Zucman, 1993). Noch ist die biologische Bedeutung dieser Variation unbekannt. Retrospektive Analysen weisen aber auf prognostisch signifikante Unterschiede zwischen *PAX3*- und *PAX5*-Fusionen im alveolären Rhabdomyosarkom und zwischen *SSX1*- und *SSX2*-Fusionen im Synovialsarkom hin (Barr, 2001; Ladanyi, 2001). Für *EWS-FLI1* Fusionen beim Ewing's Sarkom wird derzeit eine in retrospektiven Analysen beobachtete prognostische Bedeutung der Fusionsgenstruktur prospektiv untersucht (De Alava, 1998; Zoubek, 1996).

Funktion der Translokationsprodukte

Die meisten Genfusionen in Sarkomen involvieren Transkriptionsfaktorgene und führen zur Bildung DNA bindender Proteine, welche experimentell stärker Gen-aktivierend wirken als ihr Vorläufer, und welche Mausfibroblasten in-vitro zu tumorigenen Zellen zu transformieren vermögen. Diese Beobachtungen haben zur Hypothese geführt, dass es sich hier um dominante Onkogene handelt, deren Wirkung von der außerplanmäßigen Aktivierung stiller Gene ausgeht. Neuere Untersuchungen an den *EWS*-Fusionsproteinen in Ewing's Sarkomen aber deuten einerseits auch auf eine Gen-reprimierende Wirkung, andererseits auf eine von der DNA-Bindung unabhängige Aktivität hin. Proteininteraktionsstudien legen eine Verbindung zur RNA-Prozessierungsmaschinerie und neuerdings auch zur DNA-Reparatur nahe (Arvand, 2001). Was die *EWS-FLI1* Fusion betrifft, zeigte sich außerdem, dass die experimentelle Expression dieses Proteins in heterologen Zellen zu Veränderungen im Expressionsmuster Zellzyklus-regulierender Gene führt und nur in einem entweder *p53* oder *p16/p14^{ARF}* negativen Zellhintergrund toleriert wird (Deneen, 2001).

Mutationen in Tumorsuppressorgenen

P53 und *Rb1* sind die zentralen Moleküle zweier Zellzyklus-regulierender Wege, welche unter anderem durch die beiden alternativen Genprodukte des *INK4A* Gens *p16* und *p14^{ARF}* verbunden werden. Somatische Mutationen in den entsprechenden Genen stellen die häufigsten genetischen Veränderungen in Tumoren überhaupt dar und treten vielfach erst im Laufe der Tumorprogression auf. Vererbte Mutationen in diesen Genen sind mit hoher Malignomanfälligkeit verbunden. *P53* und *Rb1* spielen eine wesentliche Rolle für die Entscheidung der Zelle, in die Zellteilung einzutreten oder nicht („check-point control“). Defekte in diesen Genen führen zu genomischer Instabilität und damit zu erhöhter Mutationsrate (Sherr, 2001). Innerhalb der Tumorprädispositionssyndrome treten Sarkome (z.B. Rhabdomyosarkom) in Folge von vererbten *p53* Mutationen (Li-Fraumeni Syndrom), und von *Rb1* Mutationen (z.B. Osteosarkom, selten Ewing's Sarkom) auf. Osteosarkome stellen generell zytogenetisch eine meist unlösbare Aufgabe dar, da sie durch einen äußerst komplexen Karyotyp mit vielfachen numerischen und strukturellen Aberrationen gekennzeichnet sind. Dies mag als Hinweis auf eine Defizienz im *Rb1* und/oder *p53* checkpoint gewertet werden. Tatsächlich finden sich als einzige sich wiederholende Veränderungen im Osteosarkom Mutationen in *Rb1*, oder *p53*, oder in mit diesen assoziierten Komponenten (z.B.: Amplifikation von *MDM2*) (Miller, 1996). In dieser Hinsicht stellt aber das Osteosarkom unter den Sarkomen eher eine Ausnahme dar, da sporadische Mutationen in diesen Genen bei anderen Sarkomen eher selten sind. Im Ewing's Sarkom beispielsweise finden sich *p53* Mutationen mit einer Häufigkeit von <10%, *Rb1* Mutationen wurden gar nicht beschrieben und *INK4A* Mutationen vorwiegend in Form von homozygoten Deletionen treten mit einer Häufigkeit von 20-30% auf (Kovar, 1997; Sherr, 2001). Der experimentelle Befund, dass die Ewing's Sarkom spezifische *EWS-FLI1* Fusion von heterologen Zellen nur in Abwesenheit von *p53*

oder *INK4A* toleriert wird, mag aber als Hinweis darauf gedeutet werden, dass andere mit diesen Tumorsuppressorgenen in Verbindung stehende, noch unbekannte Komponenten im Ewing's Sarkom mutiert vorliegen könnten (Deneen, 2001; Sherr, 2001).

Bedeutung zusätzlicher Mutationen

Während das Vorliegen Tumor-spezifischer Translokationen in Sarkomen zu einer deutlichen Verbesserung und Vereinfachung der Diagnose geführt hat, so tragen diese relativ wenig zur Unterscheidung von Patientengruppen mit unterschiedlichem Therapieansprechen bei.

Zusätzliche zytogenetisch definierte Chromosomenaberrationen wurden beschrieben, deren prognostische Bedeutung aber wird vielfach kontrovers diskutiert, weshalb sie bisher nicht zur therapeutischen Stratifizierung beitragen konnten. Neue methodische Ansätze, wie „Spectral Karyotyping (SKY)“, „comparative genome hybridization (CGH)“ sowohl auf Mitosen wie auf Microchips, und letztlich die Genexpressionsanalyse gekoppelt mit neuen bioinformatischen Algorithmen werden mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Lage sein, das Rätsel vieler komplexer Karyotypen in Sarkomen zu lösen und Mutationsmuster, welche mit unterschiedlichem Krankheitsverlauf einhergehen, zu charakterisieren.

Literatur

1. Arvand A, Denny CT (2001) Biology of *EWS/ETS* fusions in Ewing's family tumors. *Oncogene* 20: 5747-5754.
2. Barr FG (2001) Gene fusions involving *PAX* and *FOX* family members in alveolar rhabdomyosarcoma. *Oncogene* 20: 5736-5746.
3. De Alava E, Kawai A, Healey JH, Fligman I, Meyers PA, Huvos AG, Gerald WL, Jhanwar SC, Argani P, Antonescu CR, Pardo-Mindan FJ, Ginsberg J, Womer R, Lawlor ER, Wunder J, Andrulis I, Sorensen PH, Barr FG, Ladanyi M (1998) *EWS-FLI1* fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma [published erratum appears in *J Clin Oncol* 1998 Aug;16(8):2895]. *J Clin Oncol* 16: 1248-1255.
4. Deneen B, Denny CT (2001) Loss of *p16* pathways stabilizes *EWS/FLI1* expression and complements *EWS/FLI1* mediated transformation. *Oncogene* 20: 6731-6741.

5. Kovar H (1998) Progress in the molecular biology of Ewing tumors. *Sarcoma* 2: 3-17.
6. Kovar H, Jug G, Aryee DNT, Zoubek A, Ambros P, Gruber B, Windhager R, Gadner H (1997) Among genes involved in the RB dependent cell cycle regulatory cascade, the p16 tumor suppressor gene is frequently lost in the Ewing family of tumors. *Oncogene* 15:
7. Ladanyi M (2001) Fusions of the SYT and SSX genes in synovial sarcoma. *Oncogene* 20: 5755-5762.
8. Miller CW, Aslo A, Won A, Tan M, Lampkin B, Koeffler HP (1996) Alterations of the p53, Rb and MDM2 genes in osteosarcoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 122: 559-565.
9. Peter M, Magdelenat H, Michon J, Melot T, Oberlin O, Zucker JM, Thomas G, Delattre O (1995) Sensitive detection of occult Ewing's cells by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 72: 96-100.
10. Sherr CJ (2001) The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 731-737.
11. Zoubek A, Dockhorn Dworniczak B, Delattre O, Christiansen H, Niggli F, Gatterer Menz I, Smith TL, Jurgens H, Gadner H, Kovar H (1996) Does expression of different EWS chimeric transcripts define clinically distinct risk groups of Ewing tumor patients? *J Clin Oncol* 14: 1245-1251.
12. Zoubek A, Ladenstein R, Windhager R, Amann G, Fischmeister G, Kager L, Jugovic D, Ambros PF, Gadner H, Kovar H (1998) Predictive potential of testing for bone marrow involvement in Ewing tumor patients by RT-PCR: a preliminary evaluation. *Int J Cancer* 79: 56-60.
13. Zucman J, Melot T, Desmaze C, Ghysdael J, Plougastel B, Peter M, Zucker JM, Triche TJ, Sheer D, Turc Carel C, et al (1993) Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours. *EMBO J* 12: 4481-4487.

Korrespondenzadresse

Univ. Prof. Dr. Heinrich Kovar
 Forschungsinstitut für krebskranke Kinder
 im St. Anna Kinderspital
 Kinderspitalgasse 6
 A-1090 Wien
 Tel 0043-1-40170 / 409
 Fax 0043-1-40170 / 70
 heinrich.kovar@ccri.univie.ac.at