



Medizinische Universität Graz

MOLEKULARE TUMORGENESE

G. Höfler
Institut für Pathologie
Universität Graz

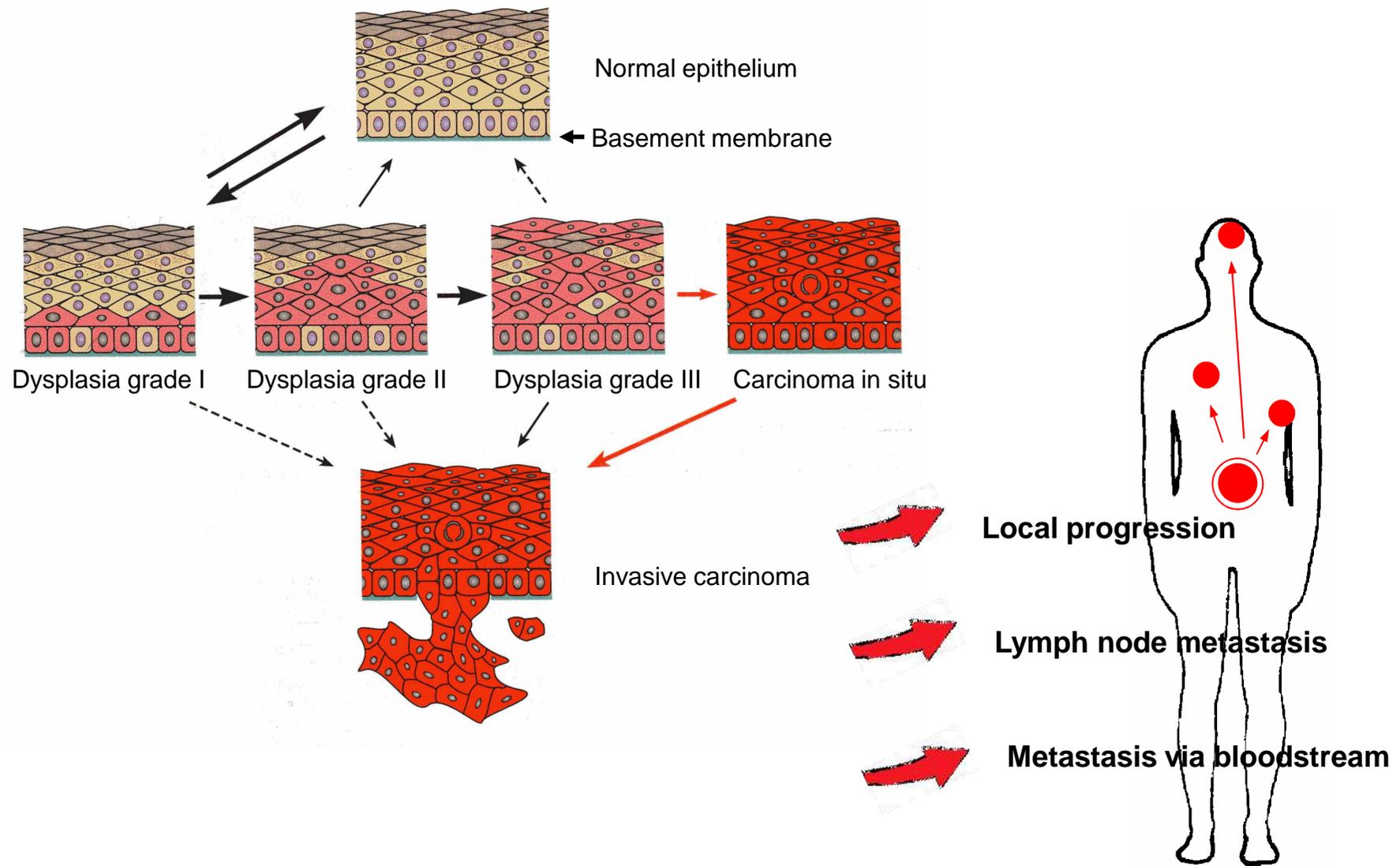
Tumor – Geschwulst – Neoplasma (Neubildung)



Medizinische Universität Graz

- Abnorme Gewebsmasse, entstanden durch Vermehrung körpereigener Zellen
- Regulationsstörung
 - Zellteilung (Proliferation)
 - Zellverlust (Apoptose)
- Tumorwachstum: autonom
 - irreversibel, progressiv, nicht mit normalem Gewebe koordiniert
 - Invasion, Destruktion
 - Stoffwechselprodukte (Hormone)
 - Metastasen

Neoplasie

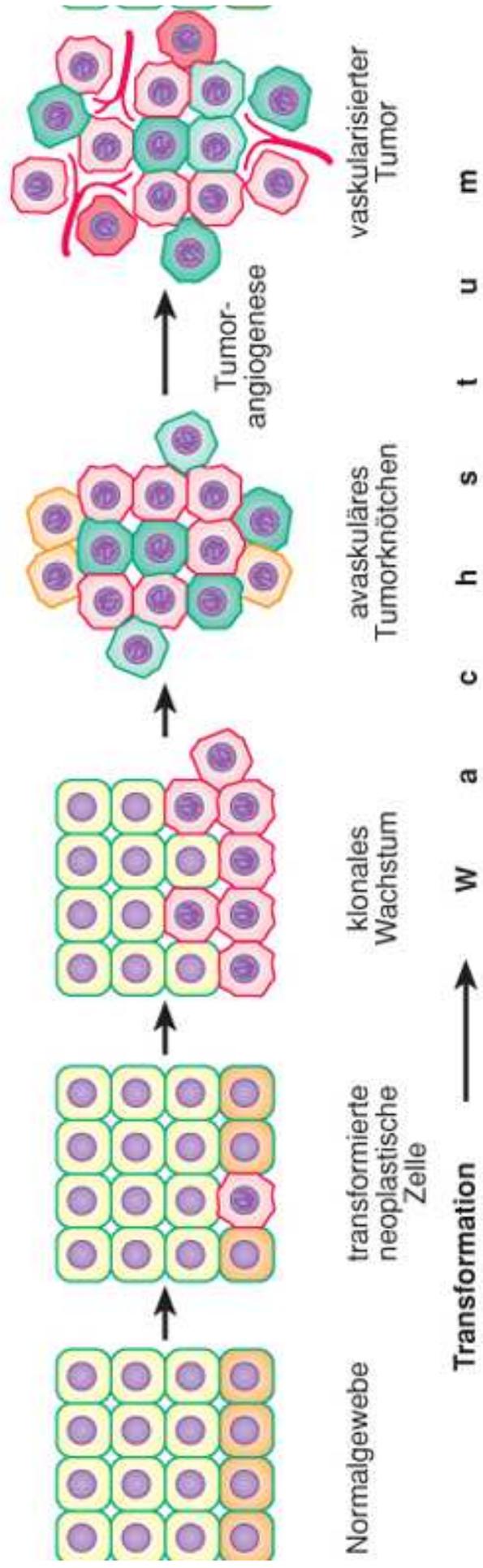
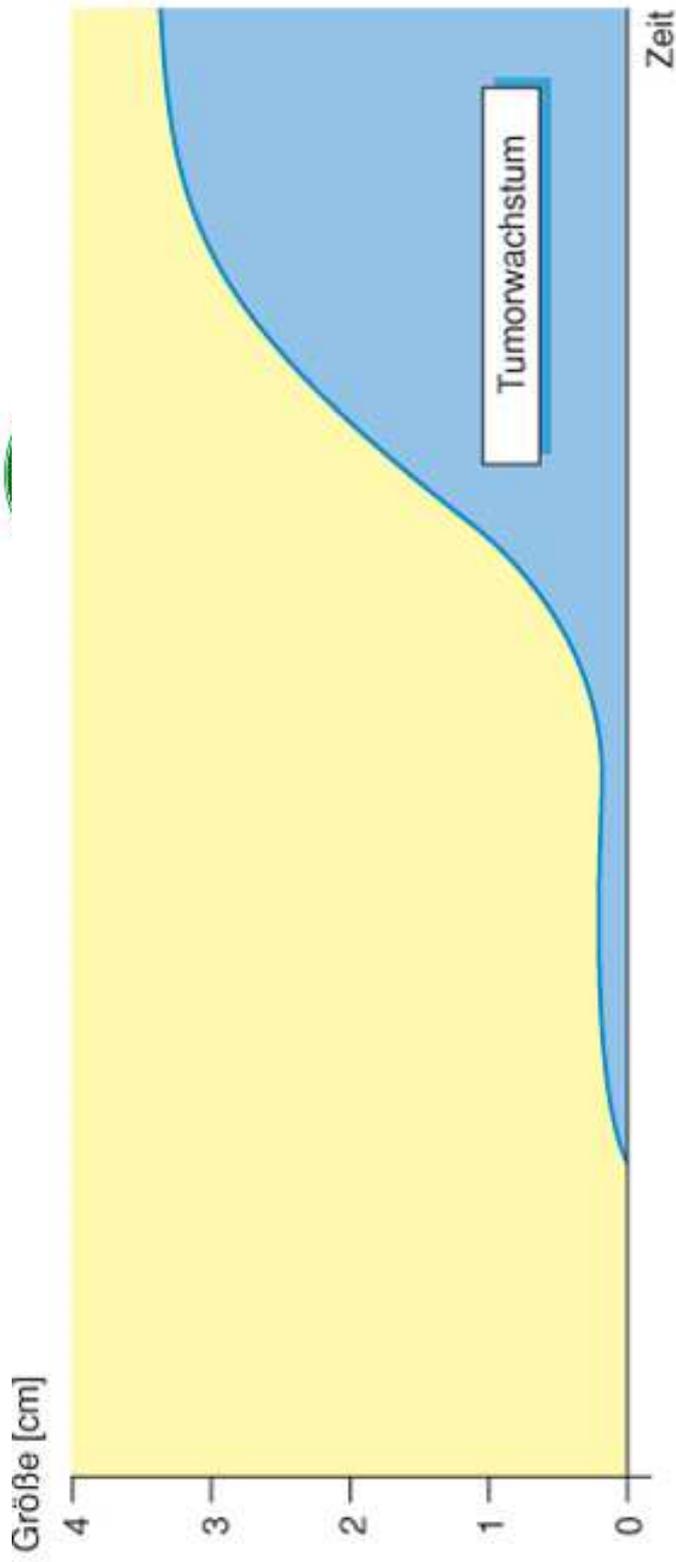


Mammakarzinom

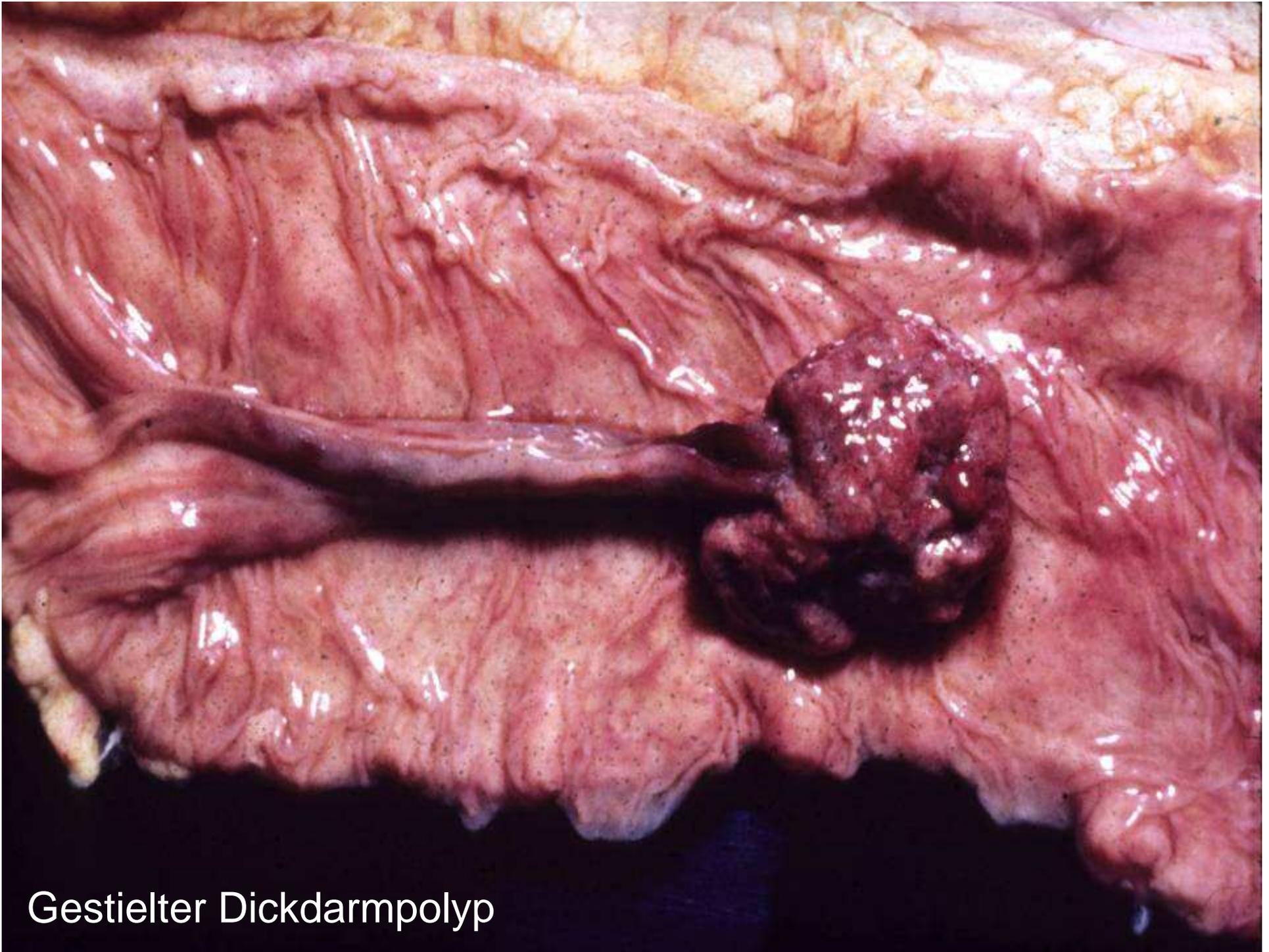


Magenkarzinom



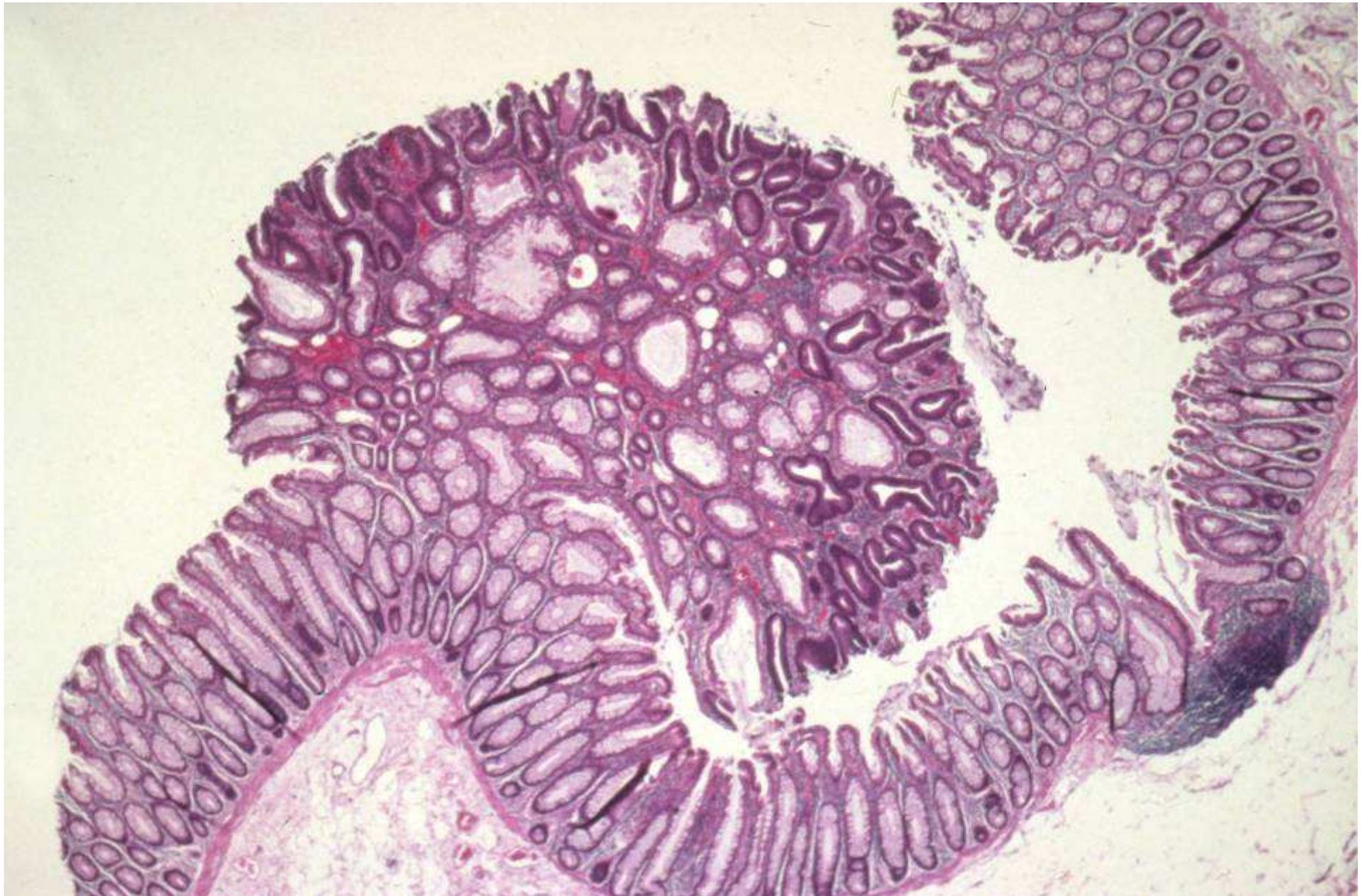


Böcker et al.: Pathologie, 4.A. © Elsevier GmbH. www.studentconsult.de



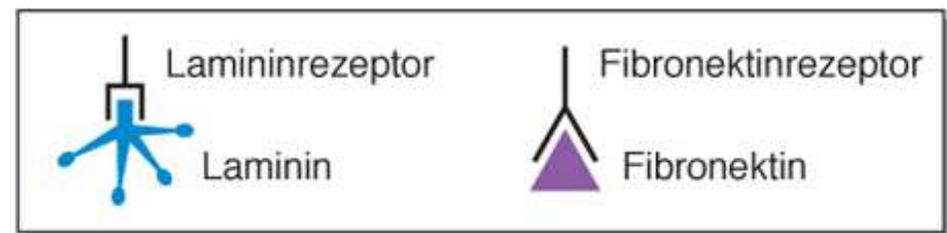
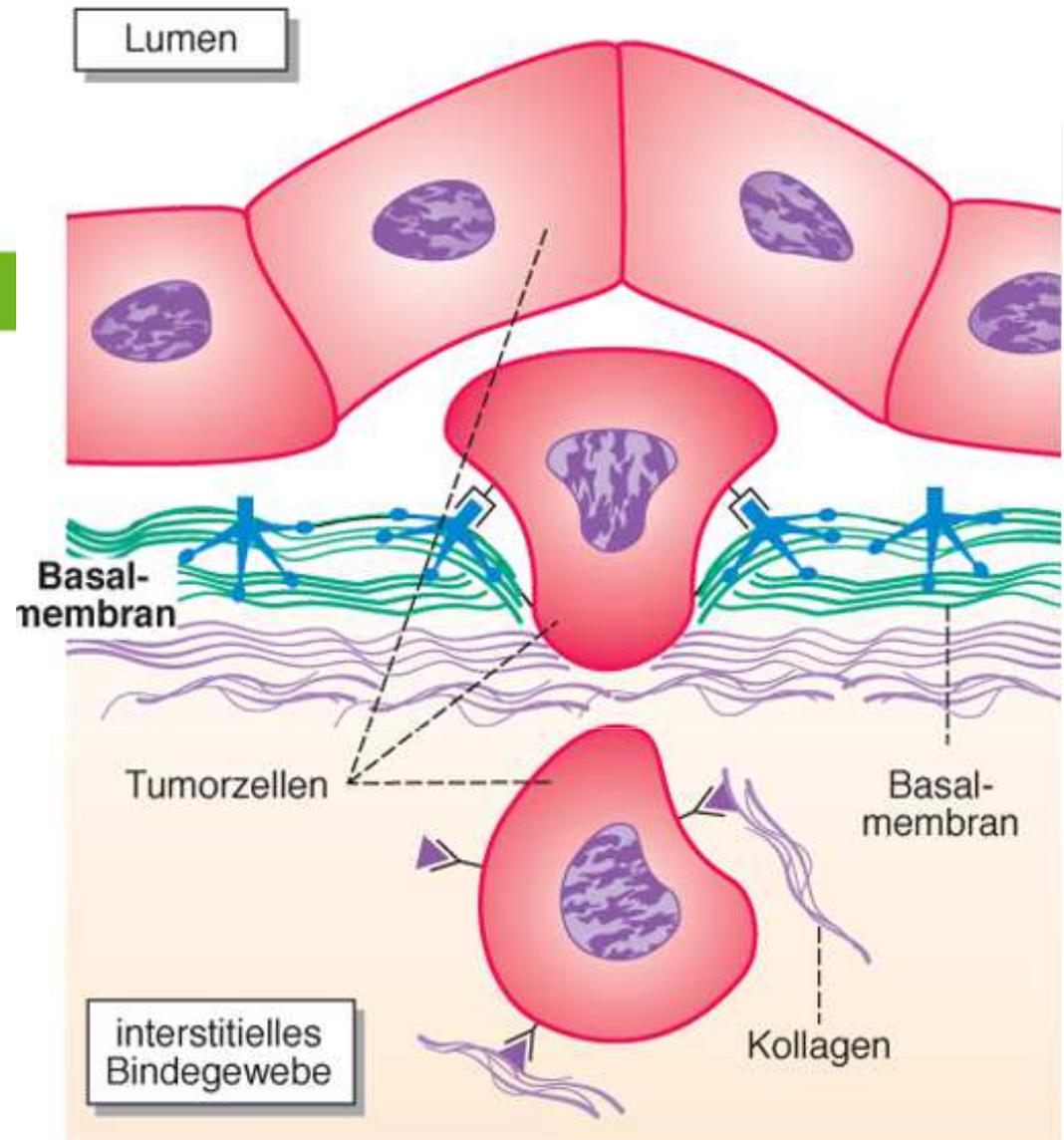
Gestielter Dickdarmpolyp

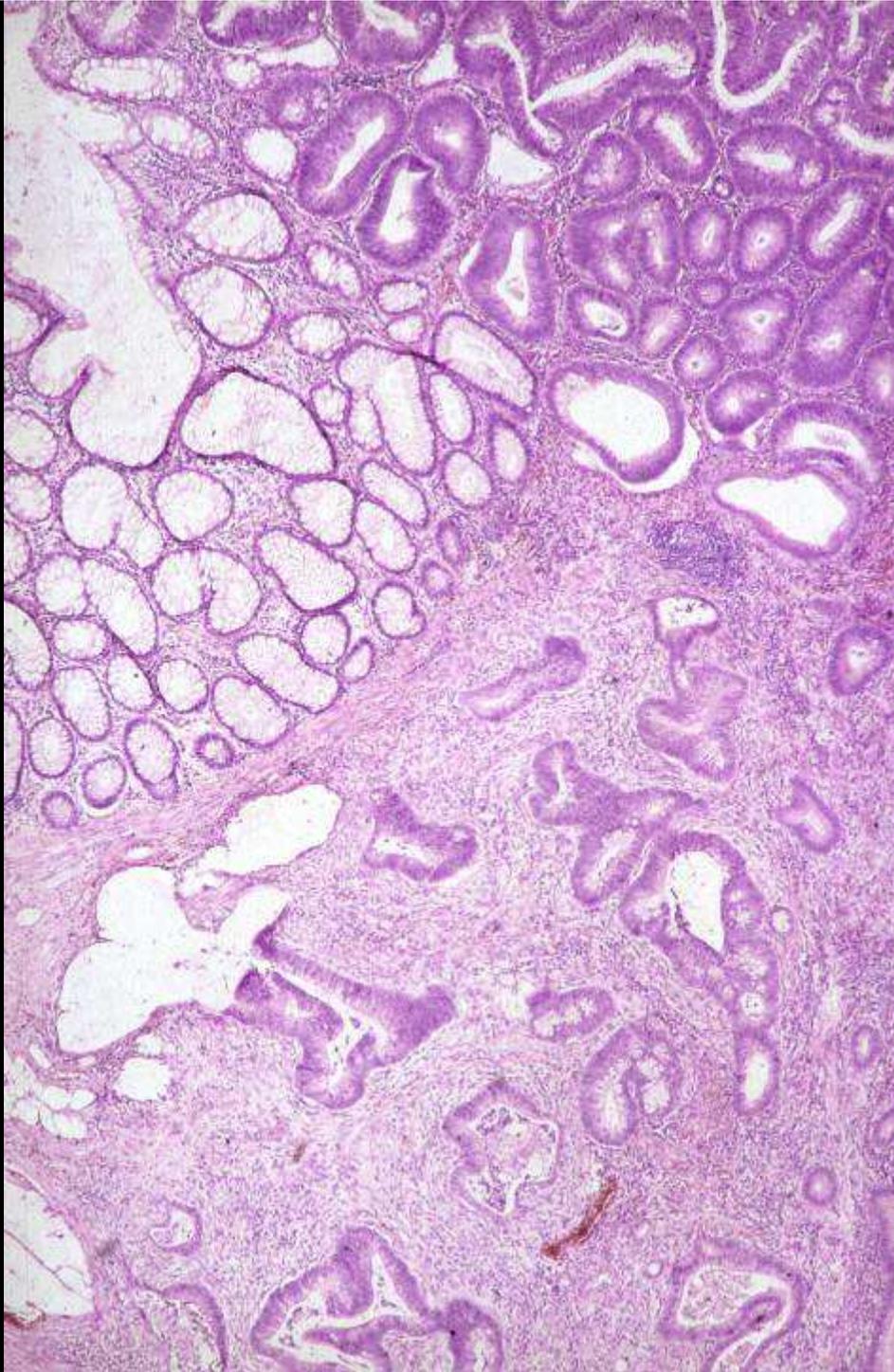
Tubuläres Adenom der Dickdarmschleimhaut (geringgradige intraepitheliale Neoplasie)



Invasion

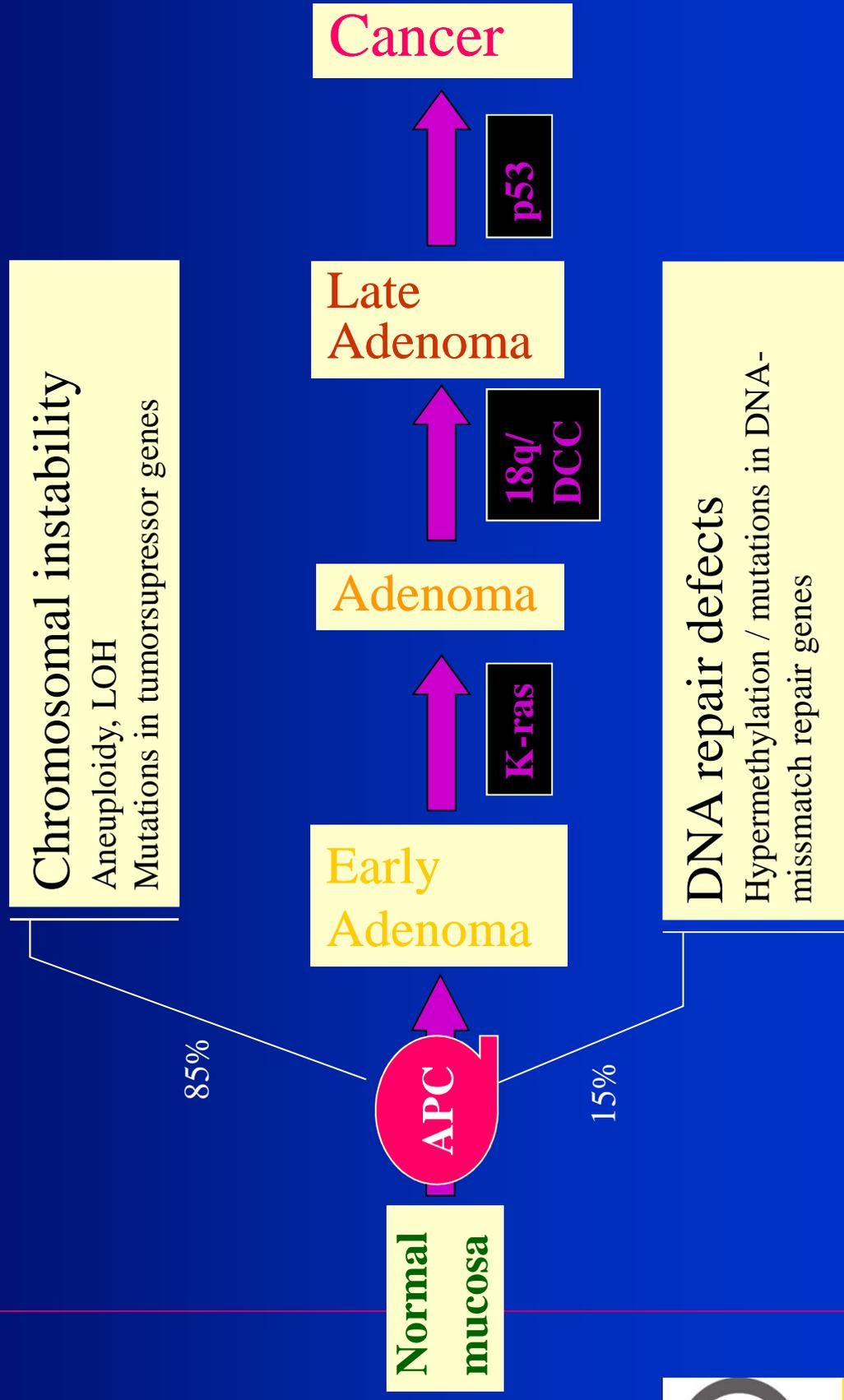
- Verminderte Zell-Zell-Adhäsion
- Tumorzelle löst sich aus dem epithelialen Tumorverband
- Bindung Tumorzelle - Basalmembran
- Rezeptor-Liganden-Bindung induziert Prokollagenase IV
- Basalmembran fokal aufgelöst
- Tumorzelle wandert aktiv durch Basalmembran
- Fibronektinrezeptoren geben Halt im interstitiellen Bindegewebe

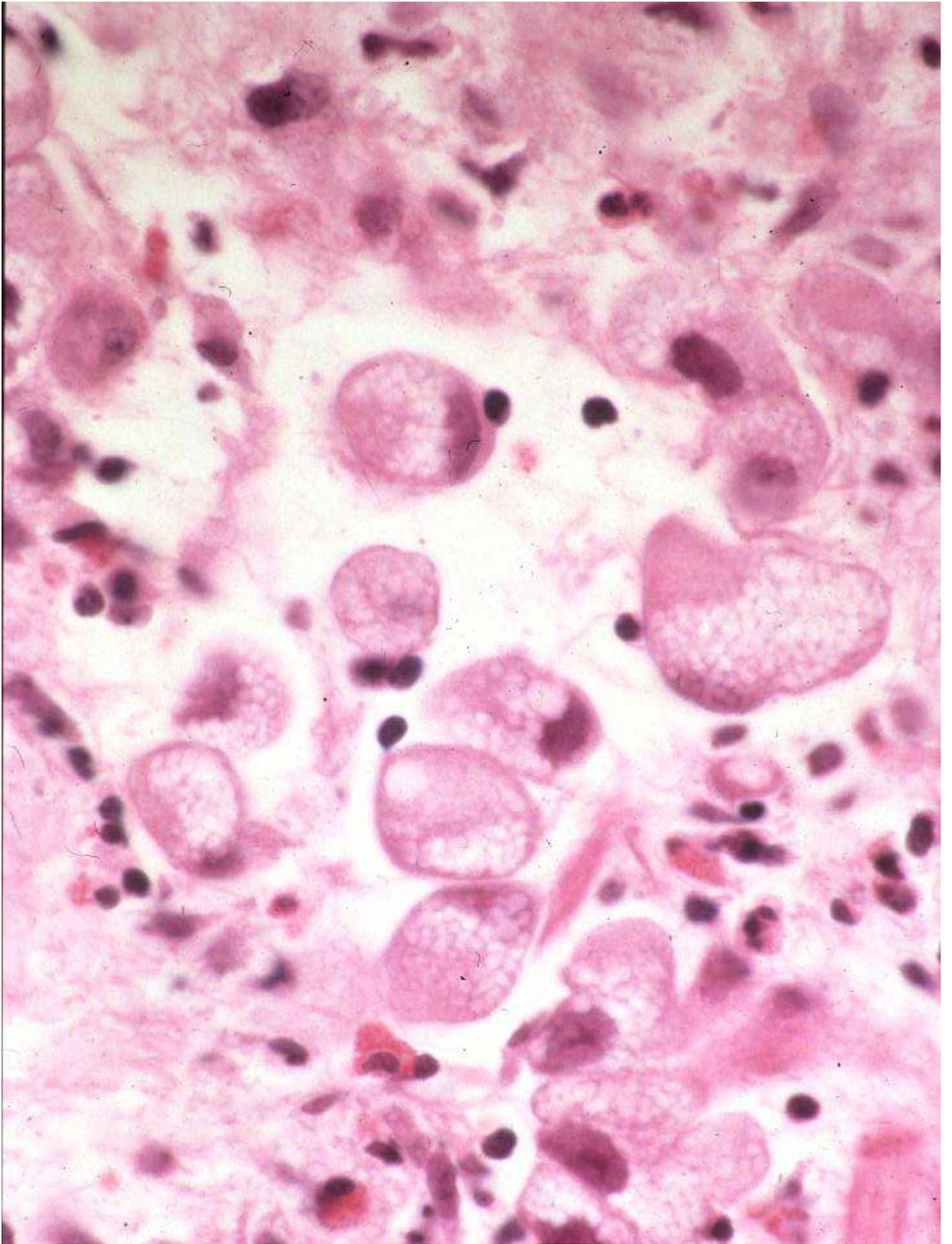




Adenokarzinom
des Dickdarms

Colorectal cancer / molecular events





Aufbau

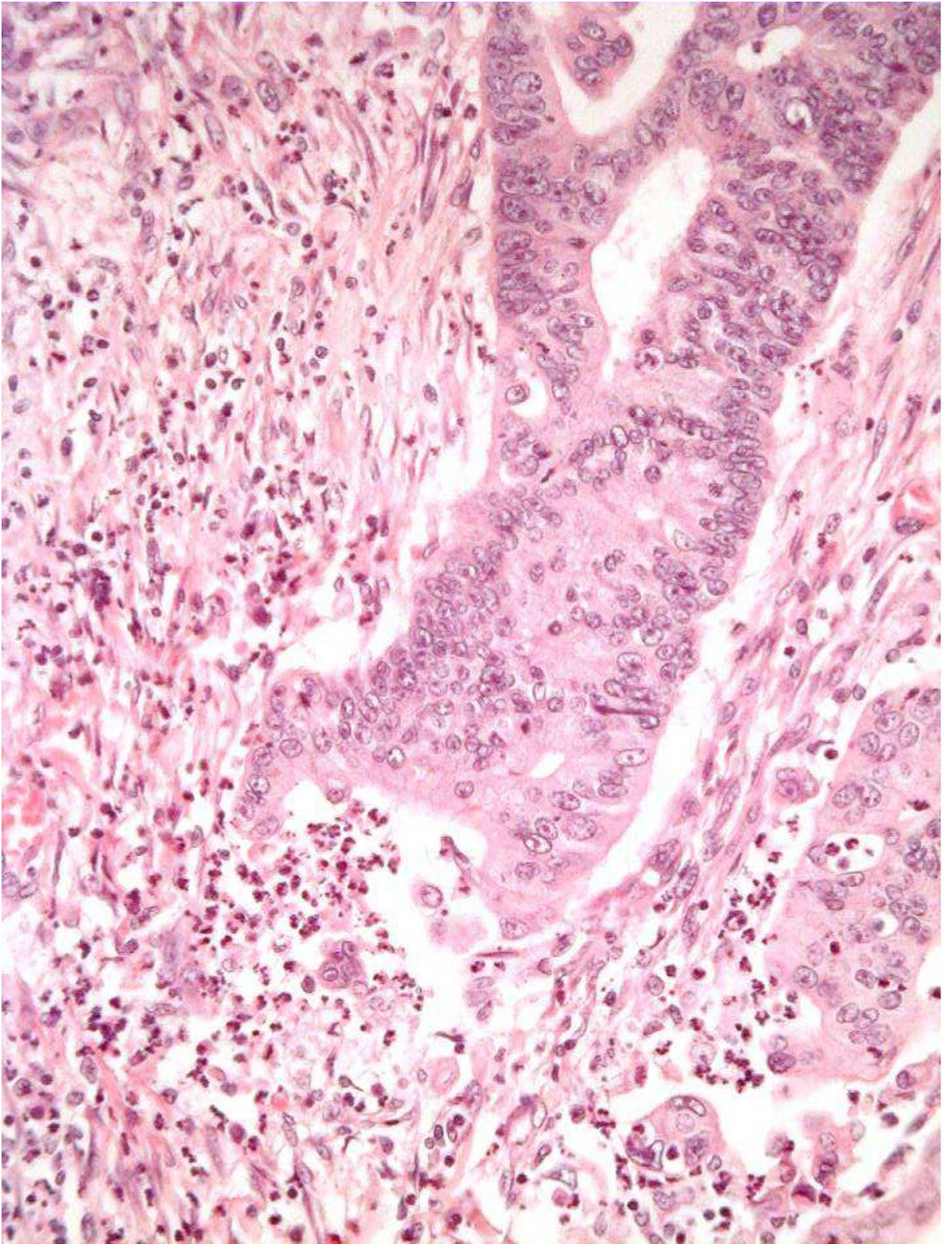
● Tumorparenchym

- Tumorzellen

● Tumorstroma

- Bindegewebe
- Gefäße
- Entzündungszellen: Lymphozyten, Makrophagen





Dignitätsbeurteilung

Merkmale	Benigner TU	Maligner TU
Wachstumsrate	Langsam, wenige Mitosen	Langsam bis schnell, Mitosen ev. zahlreich, atypische Mitosen
Lokale Ausbreitung	Zusammenhängend Gut begrenzt Expansiv. Verdrängend Kapsel	Schlecht begrenzt Invasiv, destruierend
Histologie	Hoher Differenzierungsgrad Meist monomorph	Differenzierungsverlust Zellatypien
Umgebung	Kompression Druckatrophie Hormonsekretion	Invasion, Destruktion Rezidive Metastasen

Zelluläre Atypien (I)

● Zellpolymorphie:

- Variable Zellgröße, -form

● Anisonukleose (-karyose):

- Variable Kerngröße

● Kernpolymorphie

- Unterschiedliche Kernform

● Kernhyperchromasie:

- Vergrößertes, stärker anfärbbares Chromatin
- Erhöhter DNA-Gehalt

Zelluläre Atypien (II)

● Mitosefiguren

- Vermehrtes Auftreten
- Atypische Formen: tri-, tetrapolar

● Nucleolenvergrößerung

● Verschiebung der Kern/Plasma-Relation

- Zugunsten des Kerns

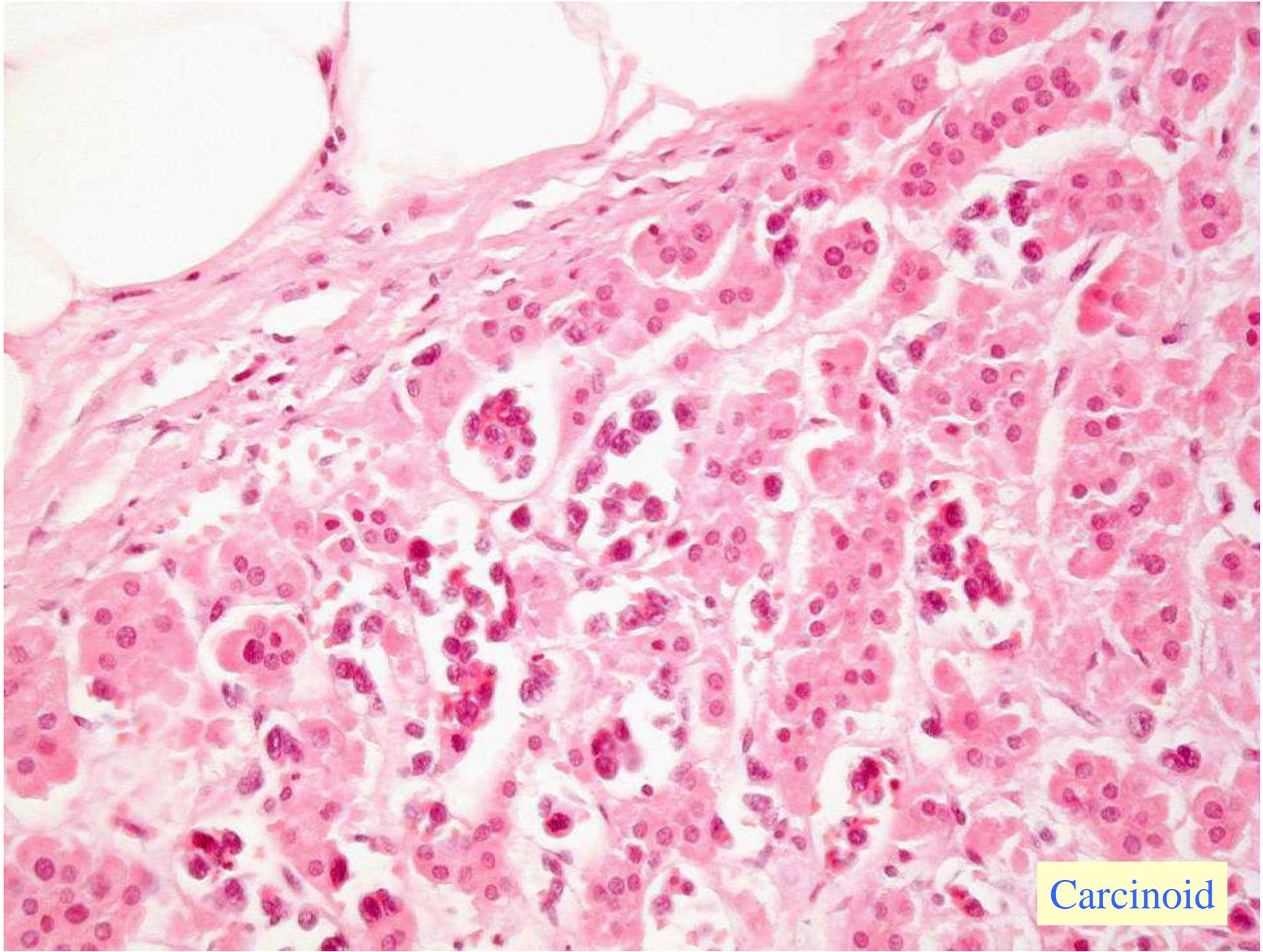
● Vermehrte zytoplasmatische Basophilie

- Vermehrte RNA – Proliferation

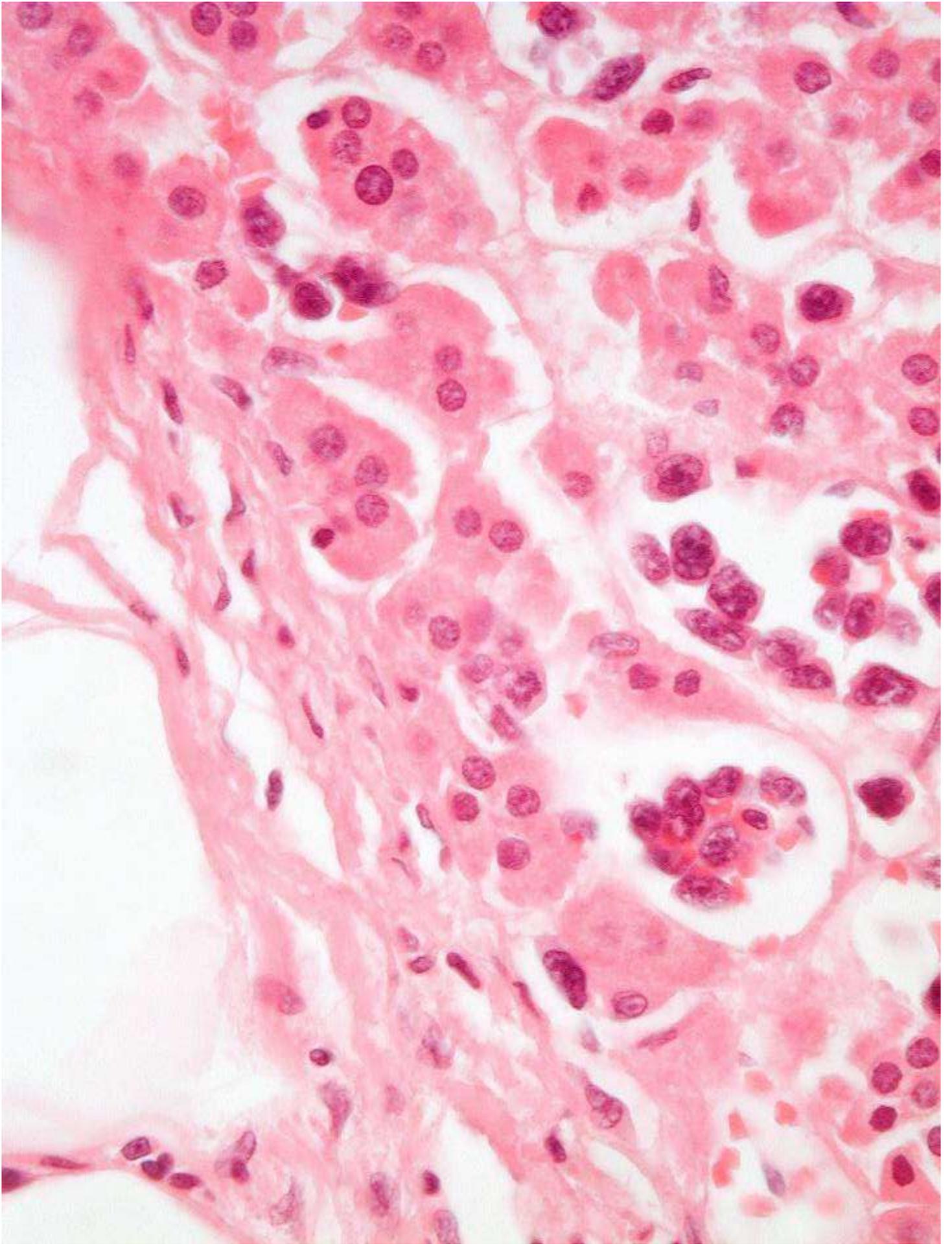
● Polyploidie: [4N], [8N]

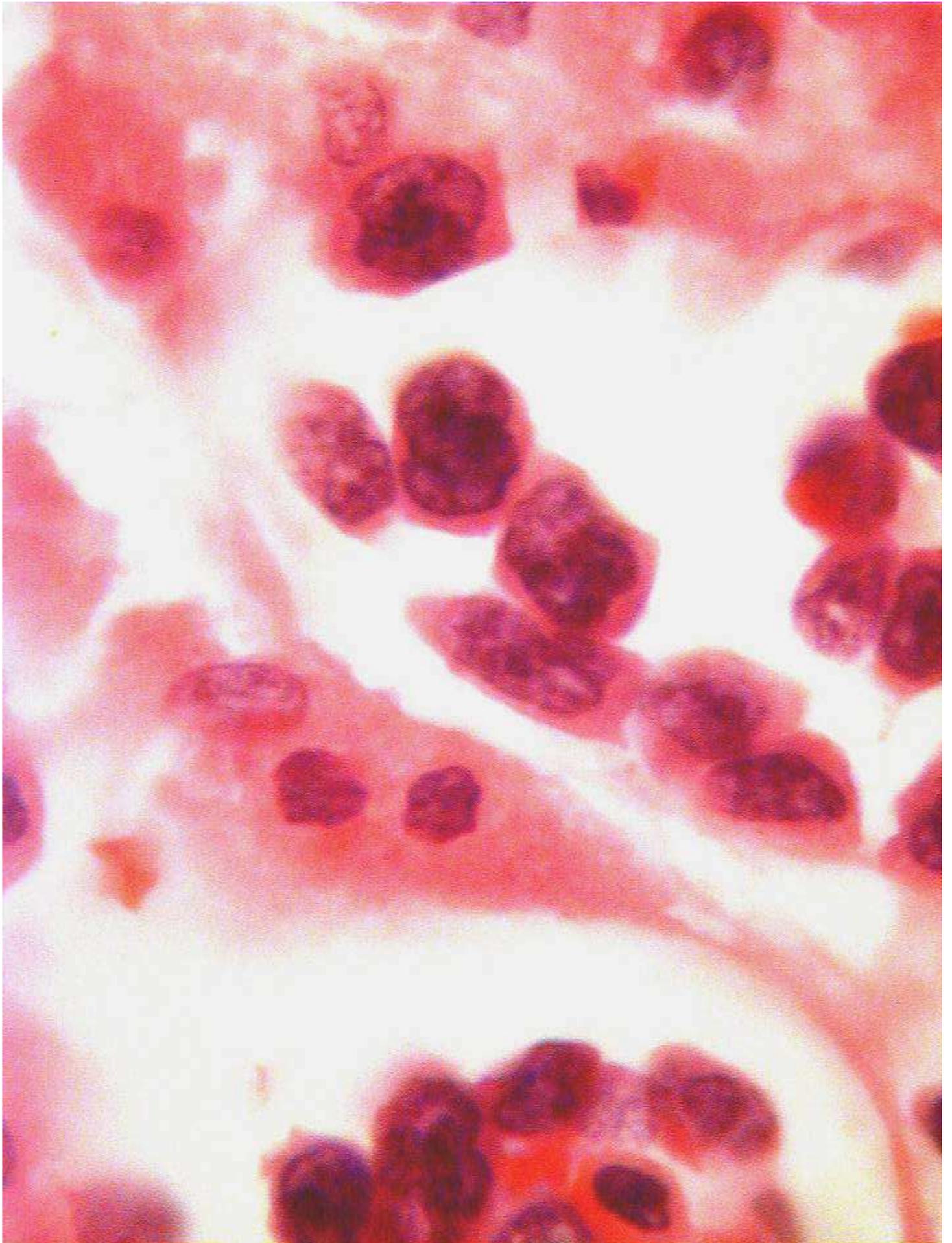
● Aneuploidie:

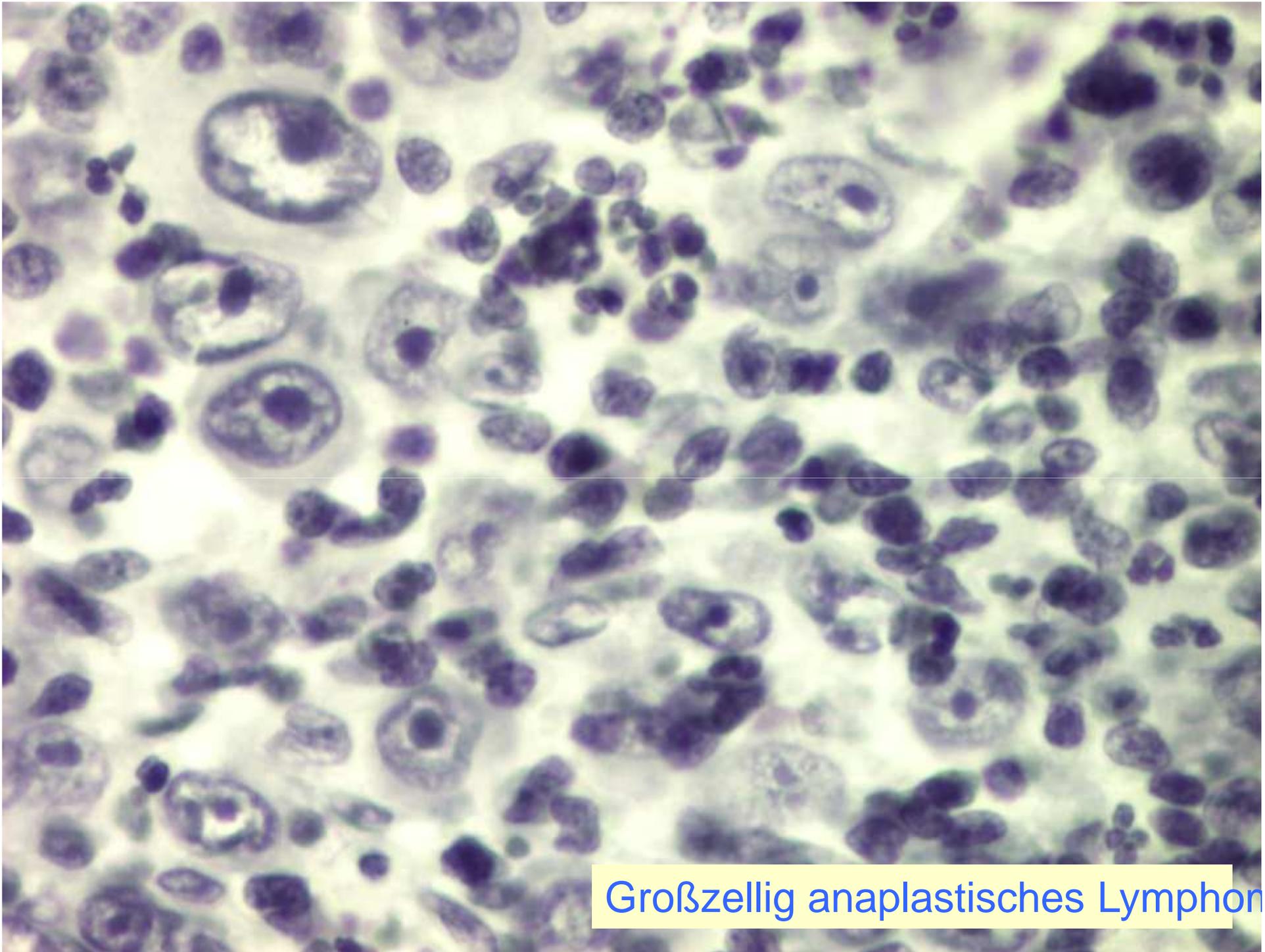
- Hyperdiploid [2,5N], triploid [3N]



Carcinoid







Großzellig anaplastisches Lymphom

Intraepitheliale Neoplasie (*in-situ* Karzinom)

- Präinvasives Karzinom
 - Proliferation atypischer, neoplastischer Zellen innerhalb des ursprünglichen Epithelverbandes
- Entwicklung in (mikro-) invasives Karzinom
- Entfernung verhindert Entstehung eines metastasierungsfähigen Tumors



Krebsrisikofaktoren: Umwelt

● Chemische Verbindungen

- Zigarettenrauch: Lungenkarzinom
- Asbest: Pleuramesotheliom
- Aflatoxin (Schimmelpilz): Leberkarzinom

● Ernährung: Colonkarzinom

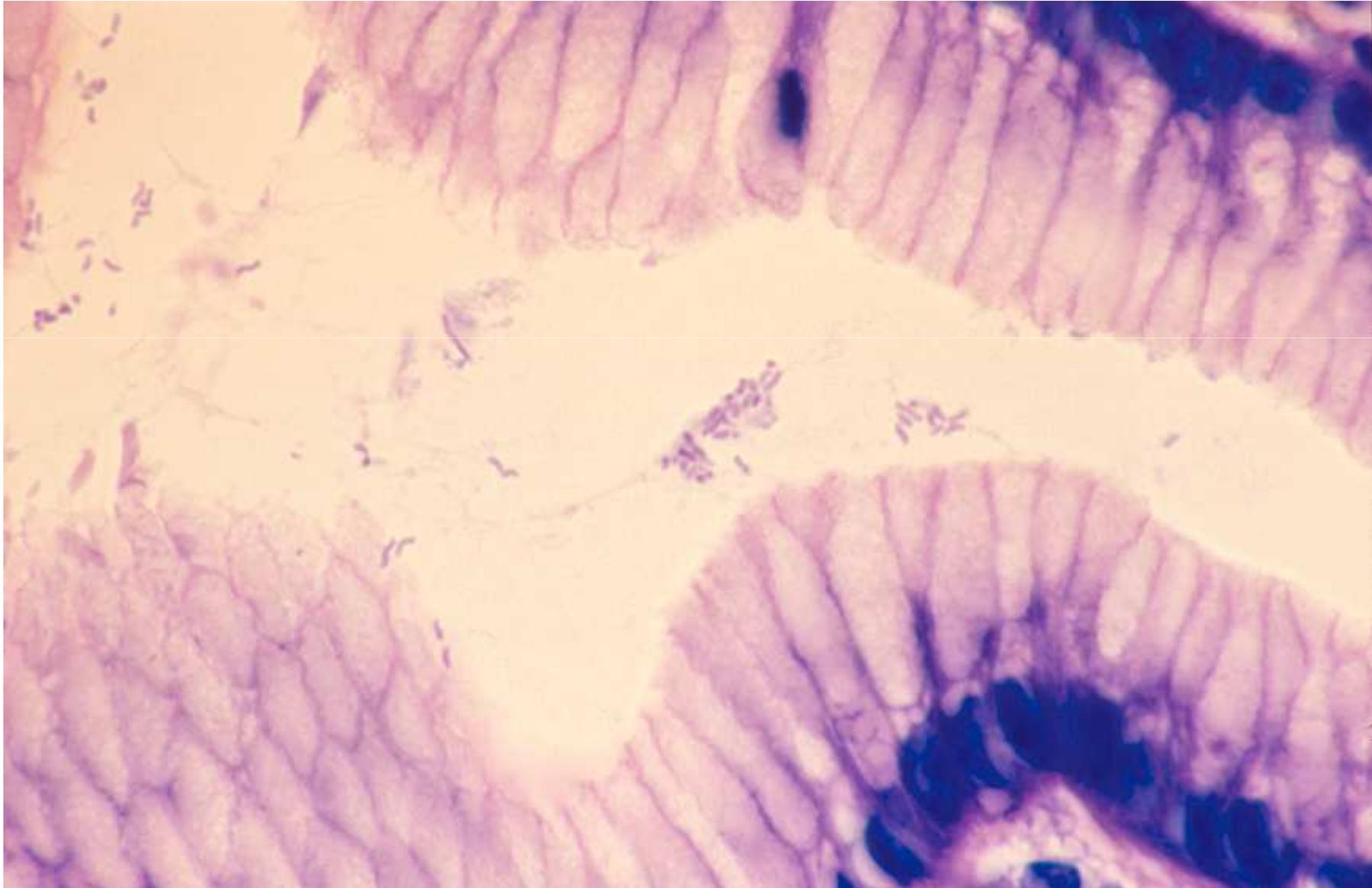
● Chronische Infektionen

- Helicobacter pylori: Magenkarzinom
- Hepatitis B, C: Leberkarzinom
- HPV: Cervixkarzinom

● Strahlen:

- UV: Basaliom, Plattenepithelkarzinom
- Ionisierende Strahlen: Schilddrüsenkarzinom

Helicobacter pylori



Krebsrisiko: Genetische Faktoren



Medizinische Universität Graz

- Angeboren: Keimbahnmutationen
- Erworben: Somatische Mutationen
 - Onkogene
 - Tumorsuppressorgene
 - Apoptosegene
 - Telomerasegene
 - DNA-Reparaturgene

Onkogene (Proto-Onkogene)



Medizinische Universität Graz

- Normale zelluläre Gene
- Genprodukte regeln
 - Proliferation
 - Differenzierung
 - Mobilität
- Mutationen führen zu konstitutiver Aktivierung, „gain of function“, „dominante“ Mutation
 - z.B.: Aktivierung eines Wachstumsfaktor-Rezeptors

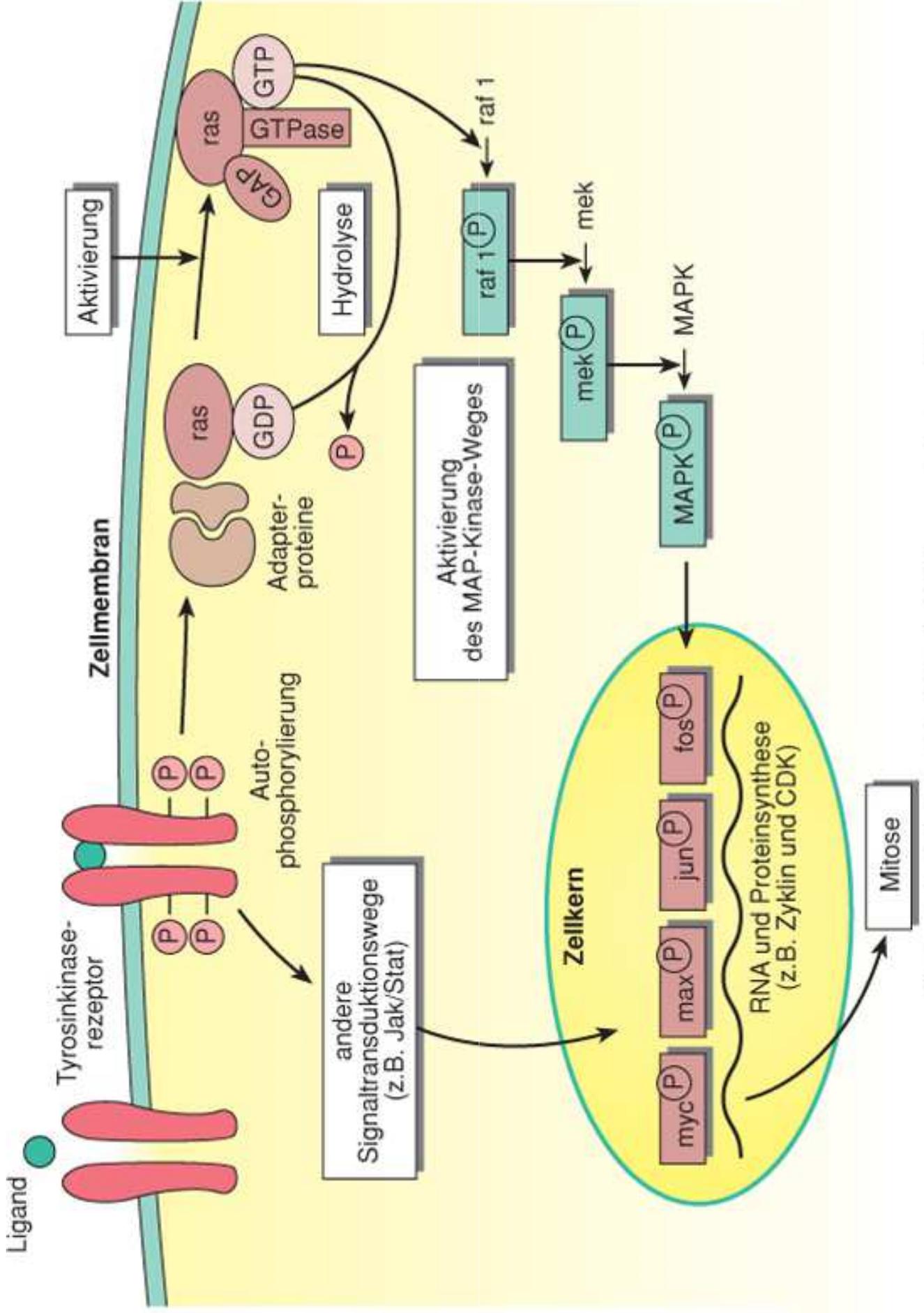
Onkogenengruppen (I)

Autokrine Wachstumsfaktoren



Medizinische Universität Graz

- Wenn Rezeptoren vorhanden – autokrine stimulation
 - SIS: 92% Homologie zu PDGF β -Kette
 - Astrozytom
 - FGF3, FGF4: Homologe des Fibroblasten-wachstumsfaktors
 - Magen, Blasenkarzinom, Melanom
 - Bombesin/GRP (gastrin releasing peptide)
 - Bronchialkarzinom
- Für maligne Transformation allein nicht ausreichend



Onkogengruppen (II)

Wachstumsfaktorrezeptoren

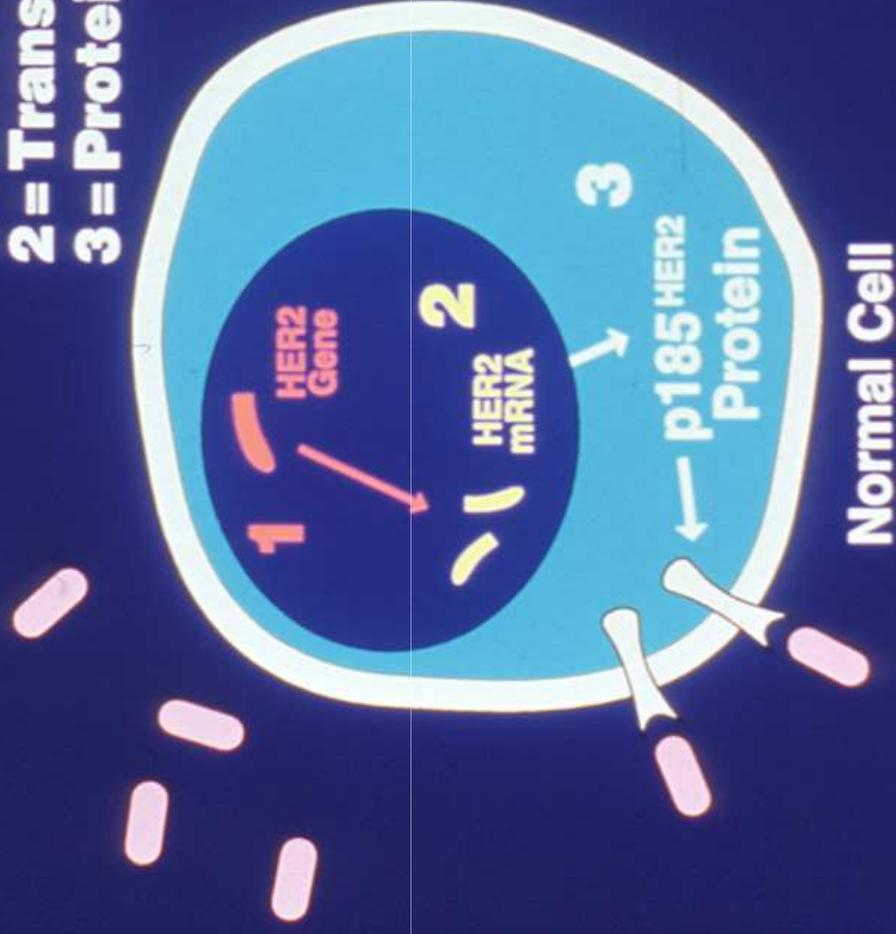


Medizinische Universität Graz

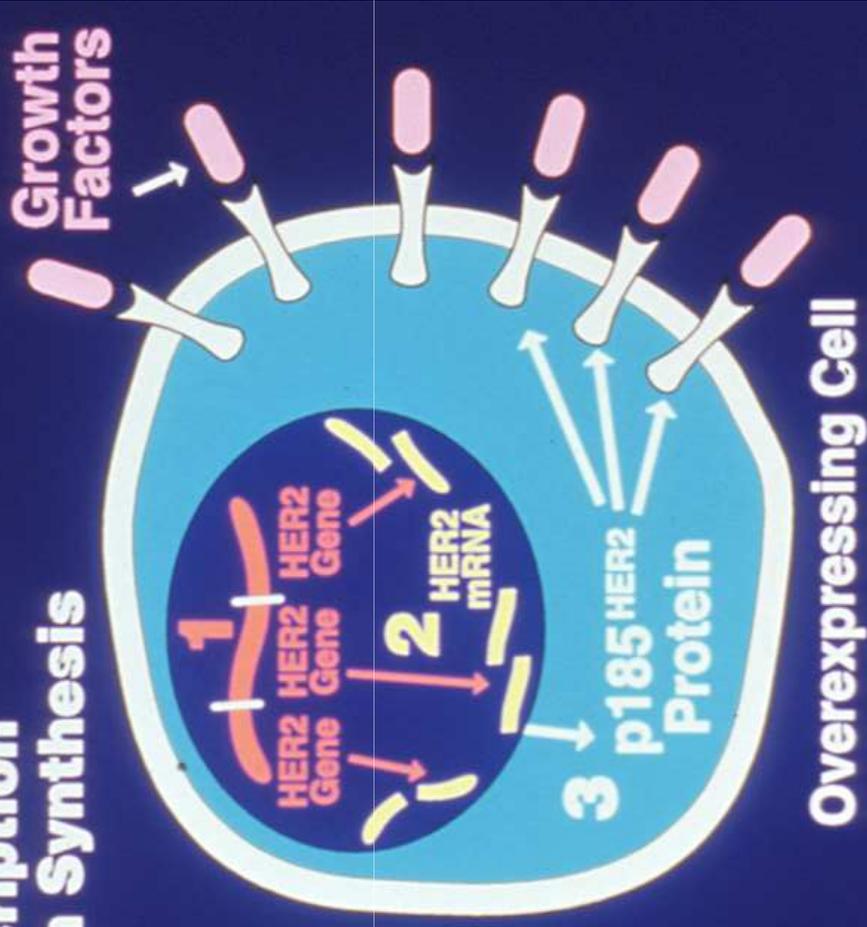
- Extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne
- Transmembranöse Region
- Intrazelluläre katalytische Domäne, meist mit Protein (Tyrosin-) Kinaseaktivität
 - erbB2(Her-2/neu): Amplifikation
 - Mammakarzinom, Ovar, Magen
 - RET: Tyrosinkinaserzeptor
 - dominante Keimbahnmutation: MEN (multiple endokrine Neoplasie):
 - Somatische Mutation: papilläres Schilddrüsenkarzinom

Mechanisms of HER2 Overexpression

- 1 = Gene Copy Number
- 2 = Transcription
- 3 = Protein Synthesis



Normal Cell



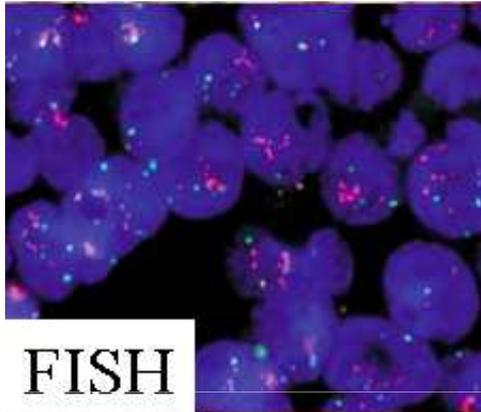
Overexpressing Cell

↑ p185HER2 receptors = ↑ cell proliferation

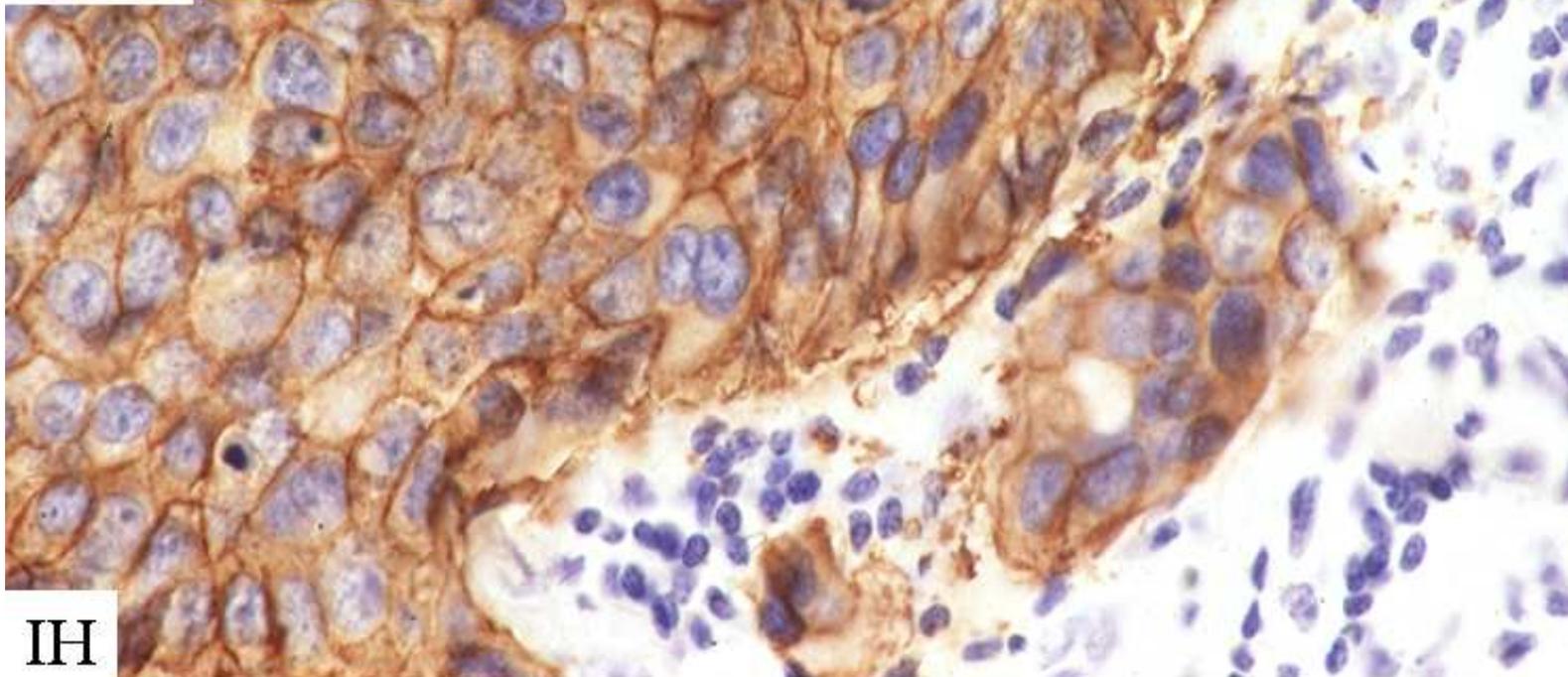
Mammakarzinom: HER2 +++



Medizinische Universität Graz

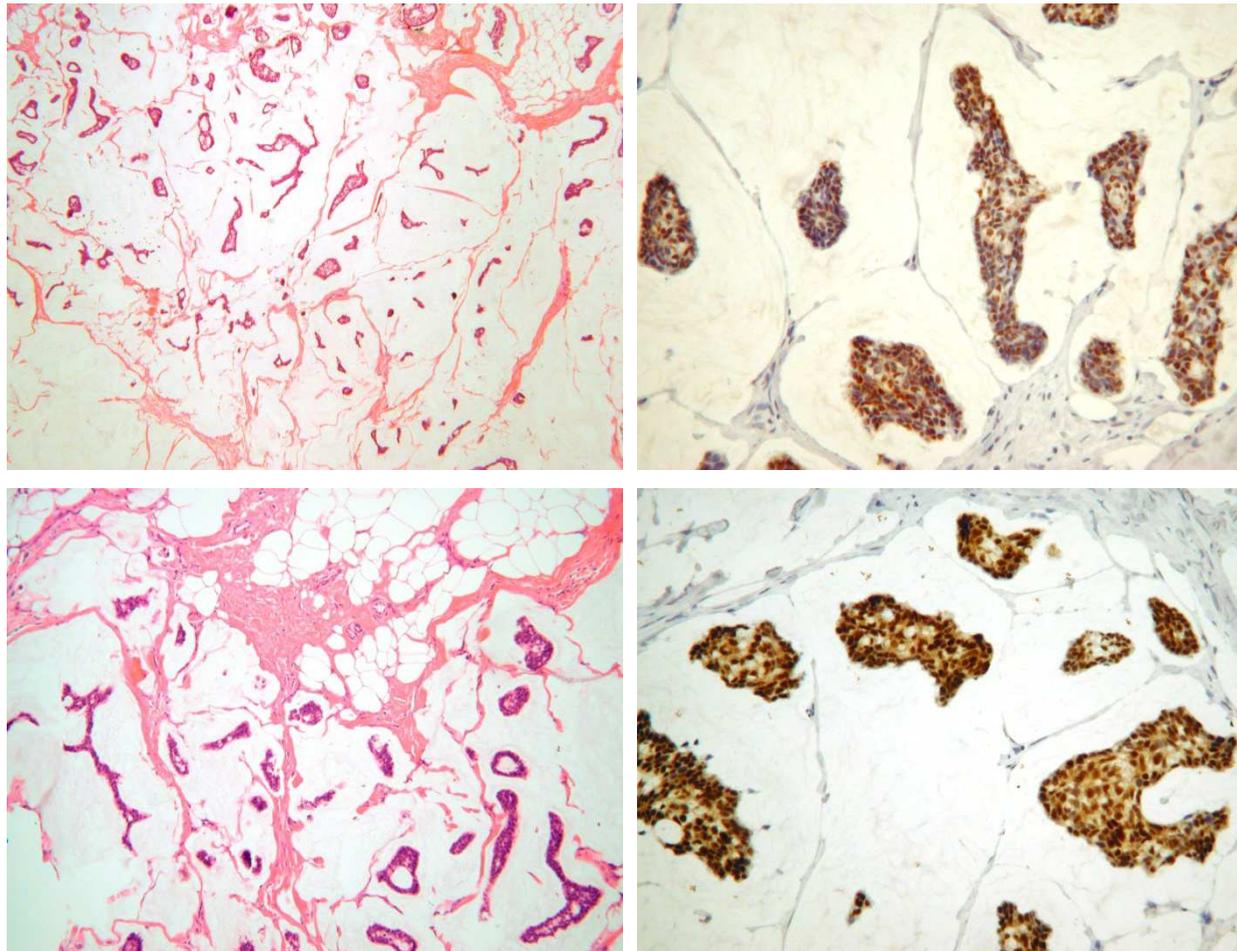


FISH



IH

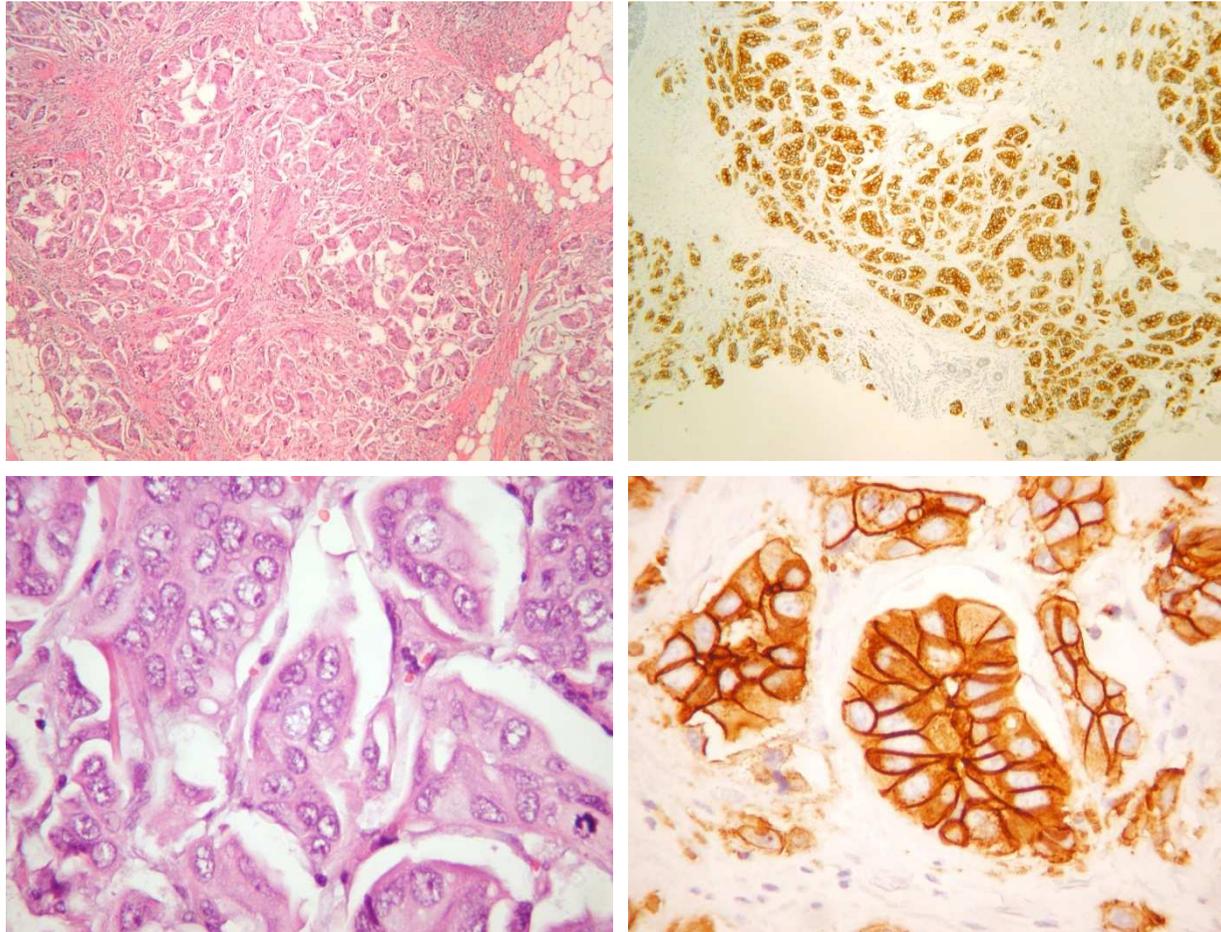
G3



Positivity for estrogen & progesterone receptors [score: low, medium, high]

Therapy: Tamoxifen (binds to and inhibits estrogen receptors and its proliferation promoting actions)

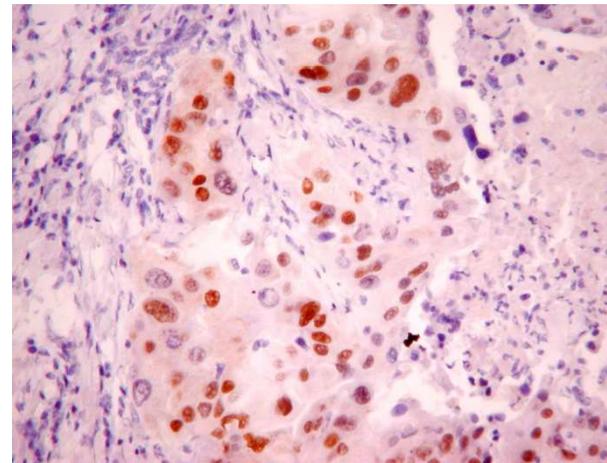
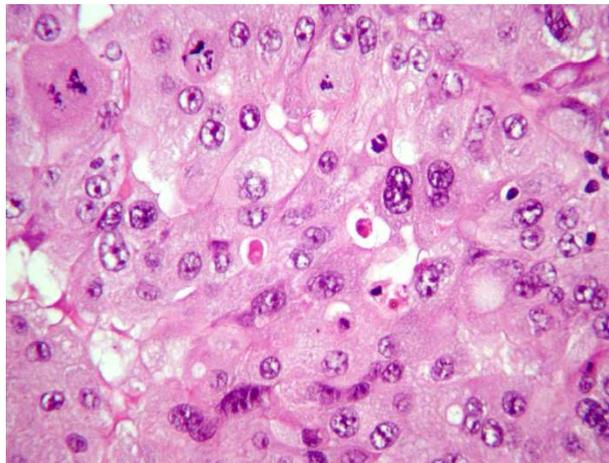
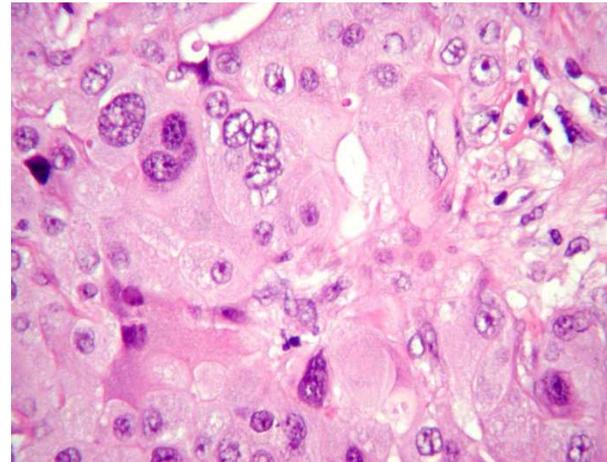
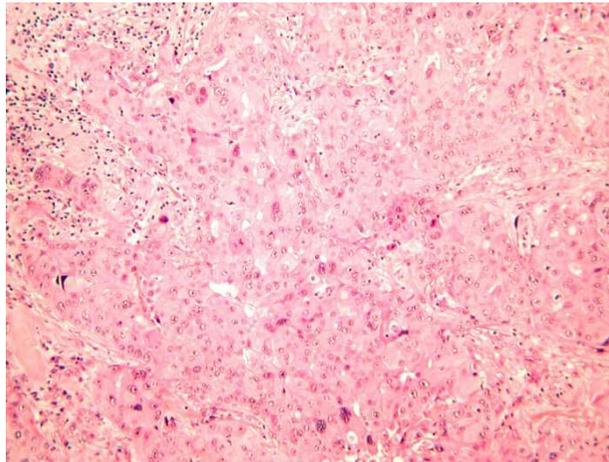
G3



Overexpression of ERBB2 (epidermal-growth factor receptor 2; HER2/NEU)
[score: low, medium, high]

Therapy: Trastuzumab (Herceptin) (Antibody directed against ERB2)

G4



Loss of expression of predictive markers (only the “primitive” marker – androgen receptor is present)

Therapy: Polychemotherapy

Onkogengruppen (III)

Signaltransduktionskette



Medizinische Universität Graz

- Molekulare Schalter, Signalverstärkung
- Rezeptor-Tyrosinkinasen
 - RAS: zentrale Position
 - in zahlreichen Neoplasien durch Mutation permanent aktiviert
 - Ras-GTP – aktiv
 - 20% aller Tumoren zeigen Mutationen
 - Oft Inaktivierung zu RAS-GDP defekt

Signaltransduktionskette

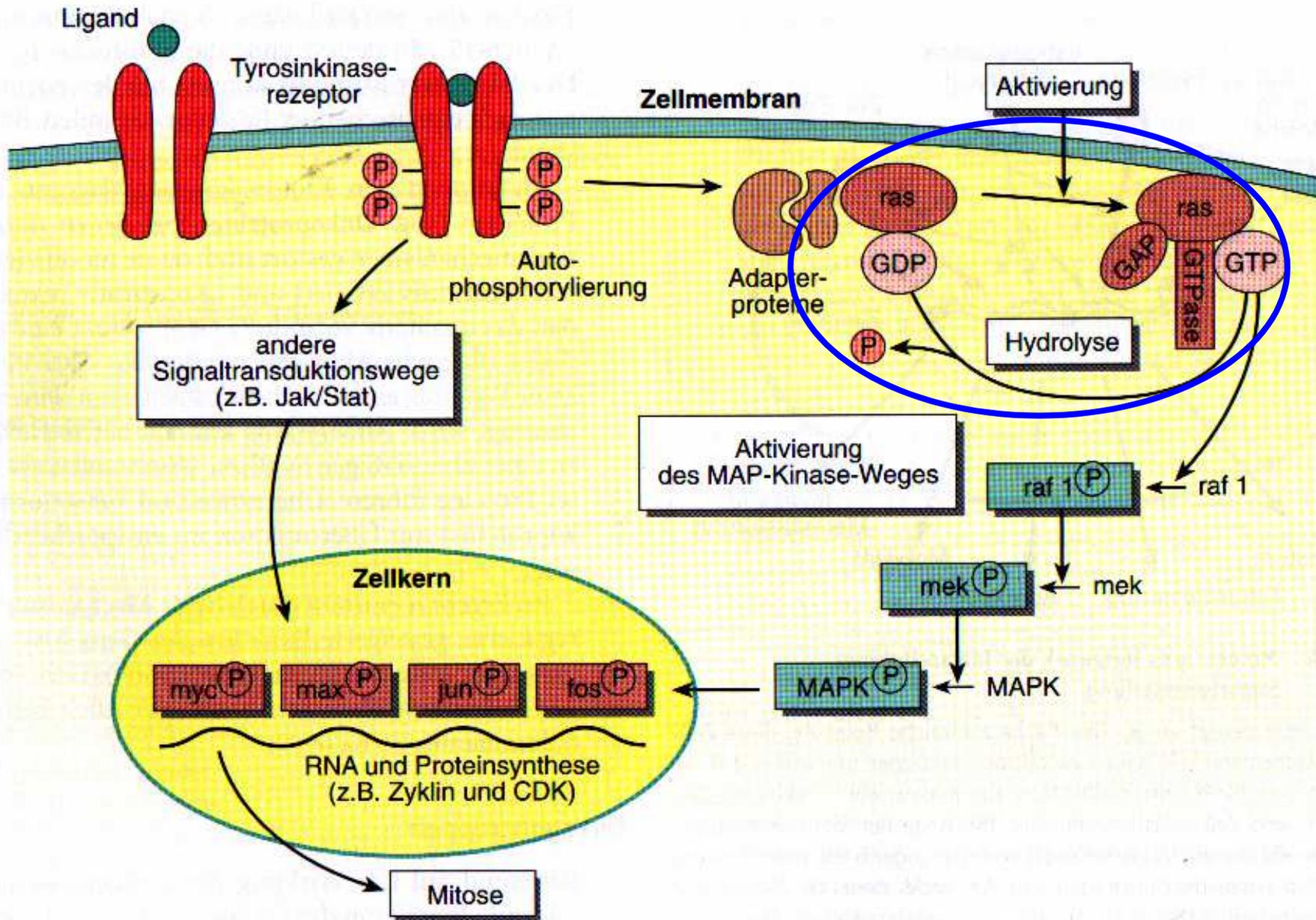


Table 2 | *HRAS*, *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* mutations in human cancer

Cancer type	<i>HRAS</i>	<i>KRAS</i>	<i>NRAS</i>	<i>BRAF</i>
Biliary tract	0%	33%	1%	14%
Bladder	11%	4%	3%	0%
Breast	0%	4%	0%	2%
Cervix	9%	9%	1%	0%
Colon	0%	32%	3%	14%
Endometrial	1%	15%	0%	1%
Kidney	0%	1%	0%	0%
Liver	0%	8%	10%	3%
Lung	1%	19%	1%	2%
Melanoma	6%	2%	18%	43%
Myeloid leukaemia	0%	5%	14%	1%
Ovarian	0%	17%	4%	15%
Pancreas	0%	60%	2%	3%
Thyroid	5%	4%	7%	27%

The mutation data was obtained from the [Sanger Institute Catalogue of Somatic Mutations in Cancer](#) web site¹⁴⁴.

Totals:
51264

Positive:
10841

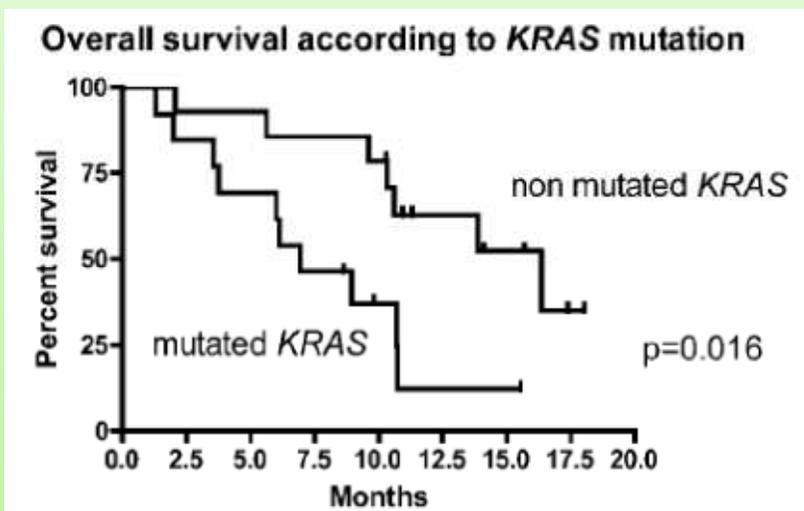
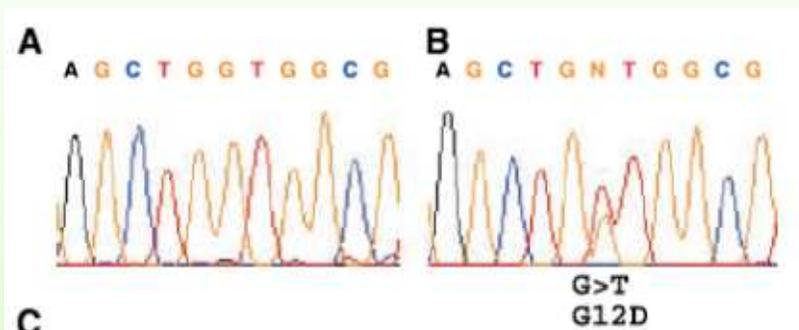
21%

Nature Rev Cancer 2007; 7: 295-308

KRAS Mutation Status Is Predictive of Response to Cetuximab Therapy in Colorectal Cancer

Cancer Res. 2006
66(8):3992-5.

Astrid Lièvre,^{1,3} Jean-Baptiste Bachet,³ Delphine Le Corre,¹ Valérie Boige,⁴ Bruno Landi,² Jean-François Emile,³ Jean-François Côté,^{1,2} Gorana Tomasic,⁴ Christophe Penna,³ Michel Ducreux,⁴ Philippe Rougier,³ Frédérique Penault-Llorca,⁵ and Pierre Laurent-Puig^{1,2}



Tumor response		KRAS mutation
Best response	Duration (wk)	
SD	20.0	G12S
SD	19.3	G12D
SD	16.0	G13D
SD	20.0	G12A
SD	20.0	WT
CR	58.1	WT
PR	34.1	WT
PR	33.9	WT
PR	20.9	WT
PR	46.0	WT
PR	62.9	WT
PR	44.0	WT
PR	17.1	WT
PR	23.7	WT
PR	17.1	WT
PR	32.0	WT
SD	14.7	WT
PD		WT
PD		G12D
PD		G12D
PD		G12C
PD		WT
PD		G12C
PD		G13D

Tumorsuppressorgene



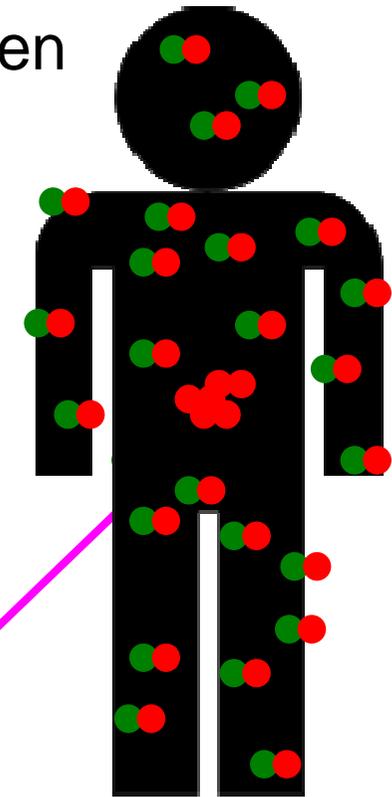
Medizinische Universität Graz

- Normale zelluläre Gene
- Negative Regulation von wachstumsassoziierten Funktionen
- „rezessives“ Verhalten bei Mutation
 - Retinoblastomgen
 - p53

„First Hit“



„Second Hit“



Tumor

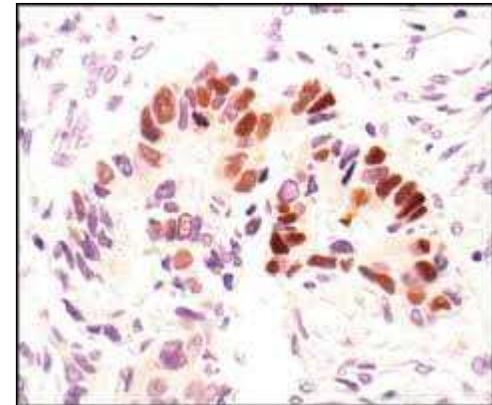


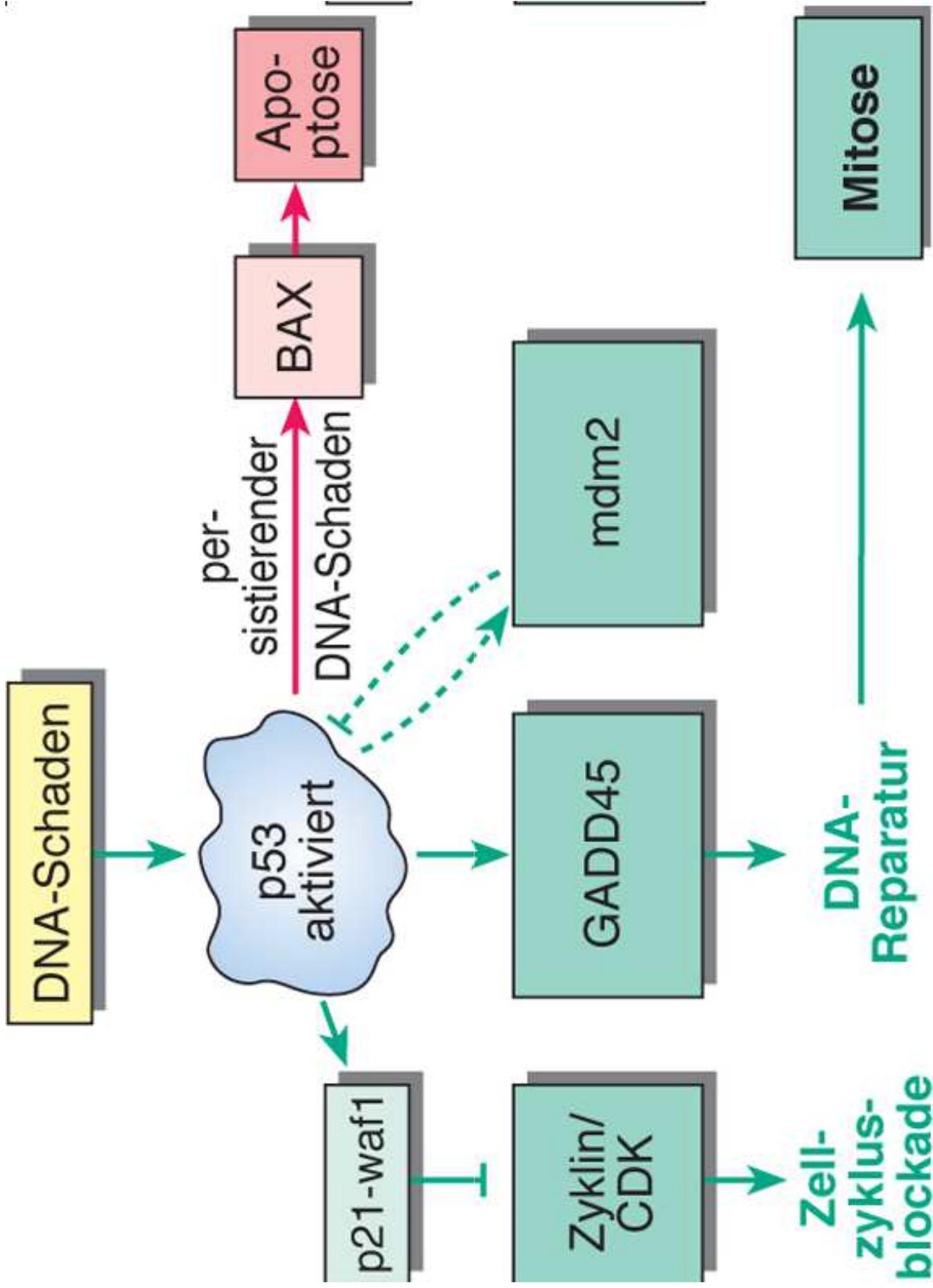
P53 – „Guardian of the Genome“



Medizinische Universität Graz

- Nukleärer Transkriptionsfaktor
- Bei Auftreten eines genetischen Schadens hochreguliert, Aktivierung von Zielgenen:
 - Arretierung in G1
 - Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen
 - Behebung des DNA-Schadens
 - Wenn „irreparabel“ → Apoptose
- Dickdarm-, Lungen-, Magen-, Mammakarzinom
 - Verlängerte Halbwertszeit, IH nachweisbar
 - Funktionsverlust
 - Akkumulation genetischer Schäden
 - Wachstumsvorteil
 - Blockade der Apoptose (u.a. Resistenz gegen Chemotherapie)





Für die Praxis – ein Beispiel



Medizinische Universität Graz

- Lynch Syndrom
- *Henry T. Lynch (geb. 1928) amerikanischer Chirurg*
- Häufigster erblicher Dickdarmkrebs: 2-3 % aller CRC
- Autosomal dominant vererbt
 - Häufig Tumorenstehung vor dem 50 Lebensjahr
 - Charakteristische Histologie und Lokalisation
 - Synonym: **H**ereditary **N**on **P**olyposis **C**olorectal **C**ancer **S**yndrom
 - > **HNPCC Syndrom**

DNA Reparaturgene



Medizinische Universität Graz

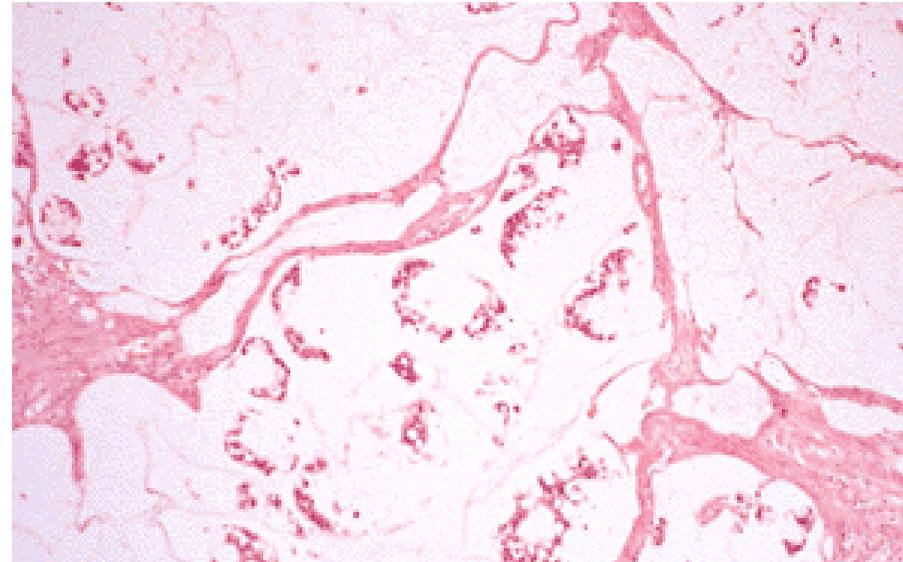
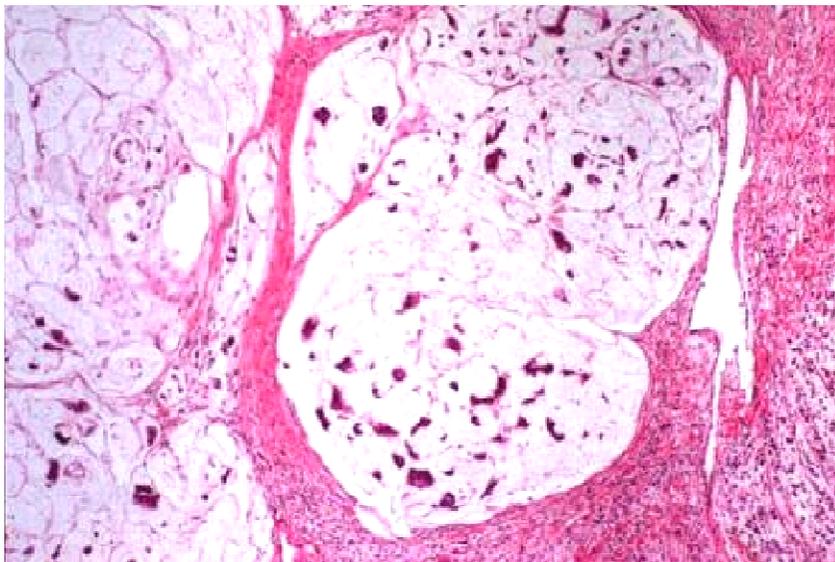
- Reparatur von Basenfehlpaarungen, entstanden bei
 - DNA-Replikation
 - Mutagene Einflüsse
- Störung: genetische Instabilität
 - „Mutatorphänotyp“
- MutHLS-System (E.coli):
- Humane Gene:
 - hMSH2, hMSH6, hMLH1, hPMS1, hPMS2
- Angeborene Defekte: Xeroderma pigmentosum, HNPCC

HNPCC Tumore



Medizinische Universität Graz

- Pathologische Charakteristika
 - Rechtsseitiges Kolon (Coecum, colon ascendens)
 - Mucinöses Adenokarcinom
 - Niedrig differenziert



Lifetime Cancer Risk bei Lynch Syndrom

25% ohne
Tumor aber
Überträger !

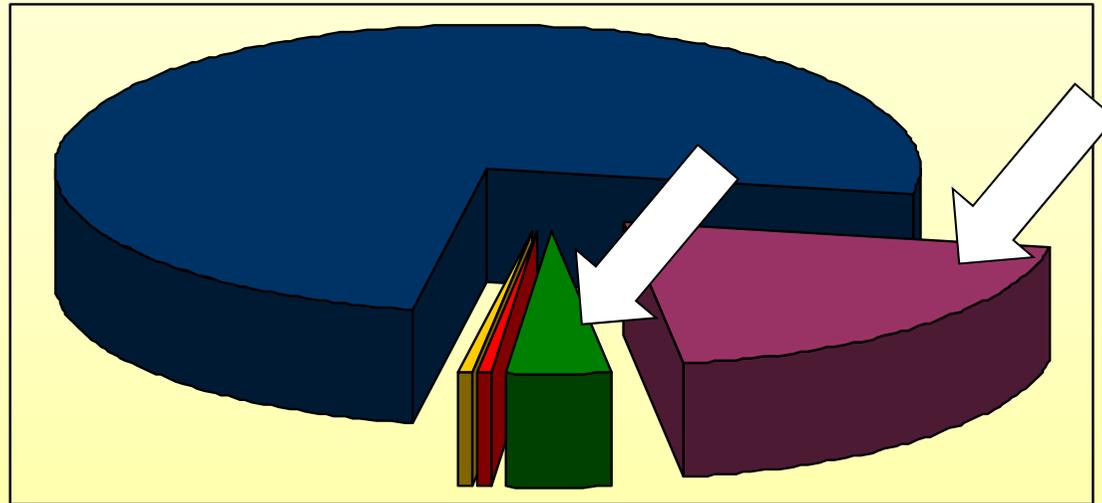
Colorectal cancer (men)	28-75%
Colorectal cancer (women)	24-52%
Endometrial cancer	27-71%
Ovarian cancer	3-13%
Gastric cancer	2-13%
Urinary tract cancer	1-12%
Brain tumor	1-4%
Bile duct/gallbladder cancer	2%
Small bowel cancer	4-7%

Bei 30 000 Personen....



werden 40 an Colonkarzinom
durch Lynch S. erkranken

CRC - genetic disposition



- Sporadic CRC (65-85%)
- Familial; gene defect not known (10-30%)
- Hereditary non polyposis colorectal cancer (3-5%)
- Familial adenomatous polyposis coli (<1%)
- Rare hereditary CRC syndromes

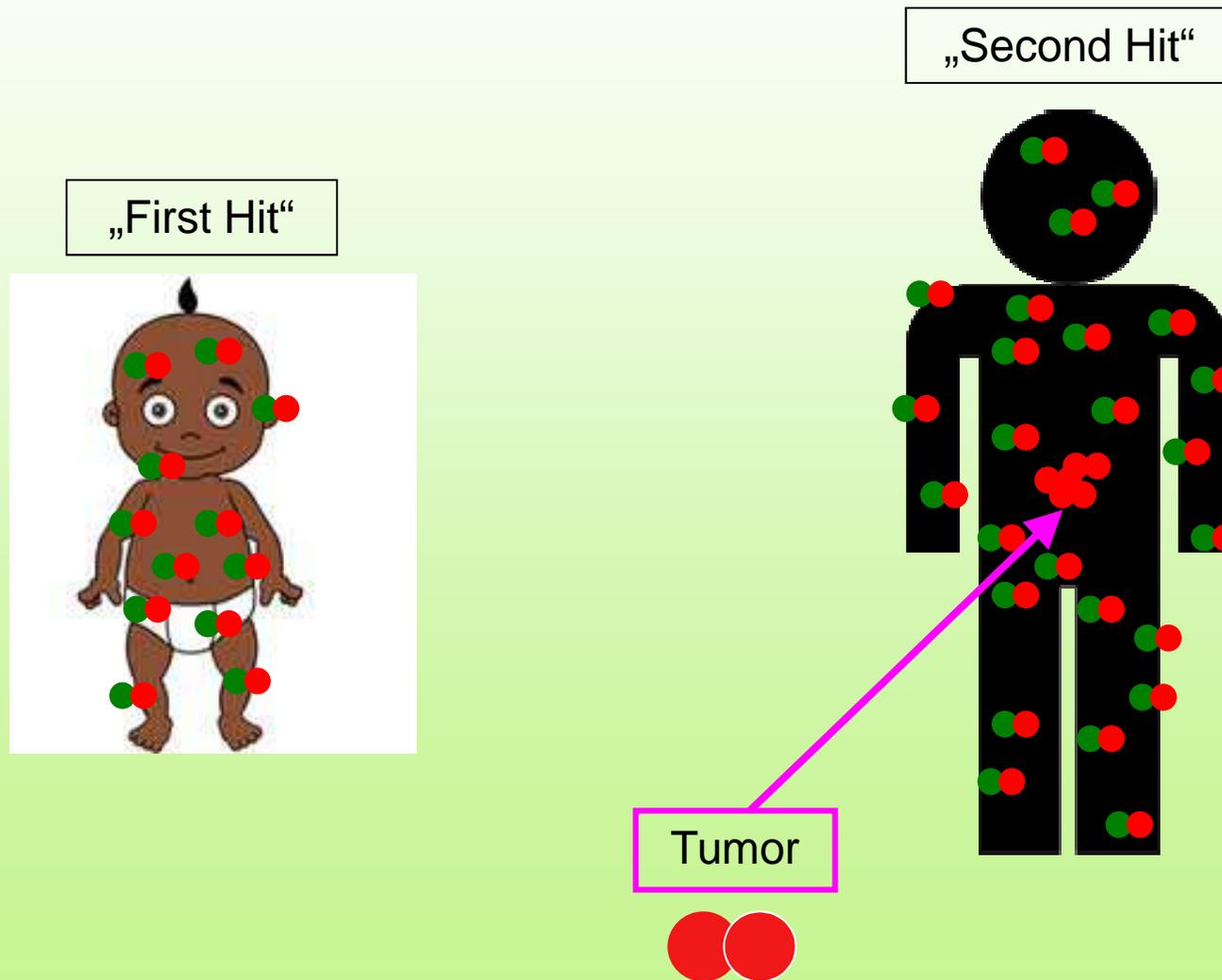
Das Grundproblem

- Gesamte Erbinformation in jeder Zelle
- Wieviele Zellen hat ein Erwachsener ?
- **100 Billionen** (10^{14})
- **Jede Sekunde sterben 50 Millionen** und werden zum Gutteil ersetzt (turnover)
- Fehlerfreie DNA Verdoppelung der Zellteilung ist überlebenswichtig !

Das Mismatch Repair System



2 Ereignisse sind für Reparaturenzymverlust notwendig



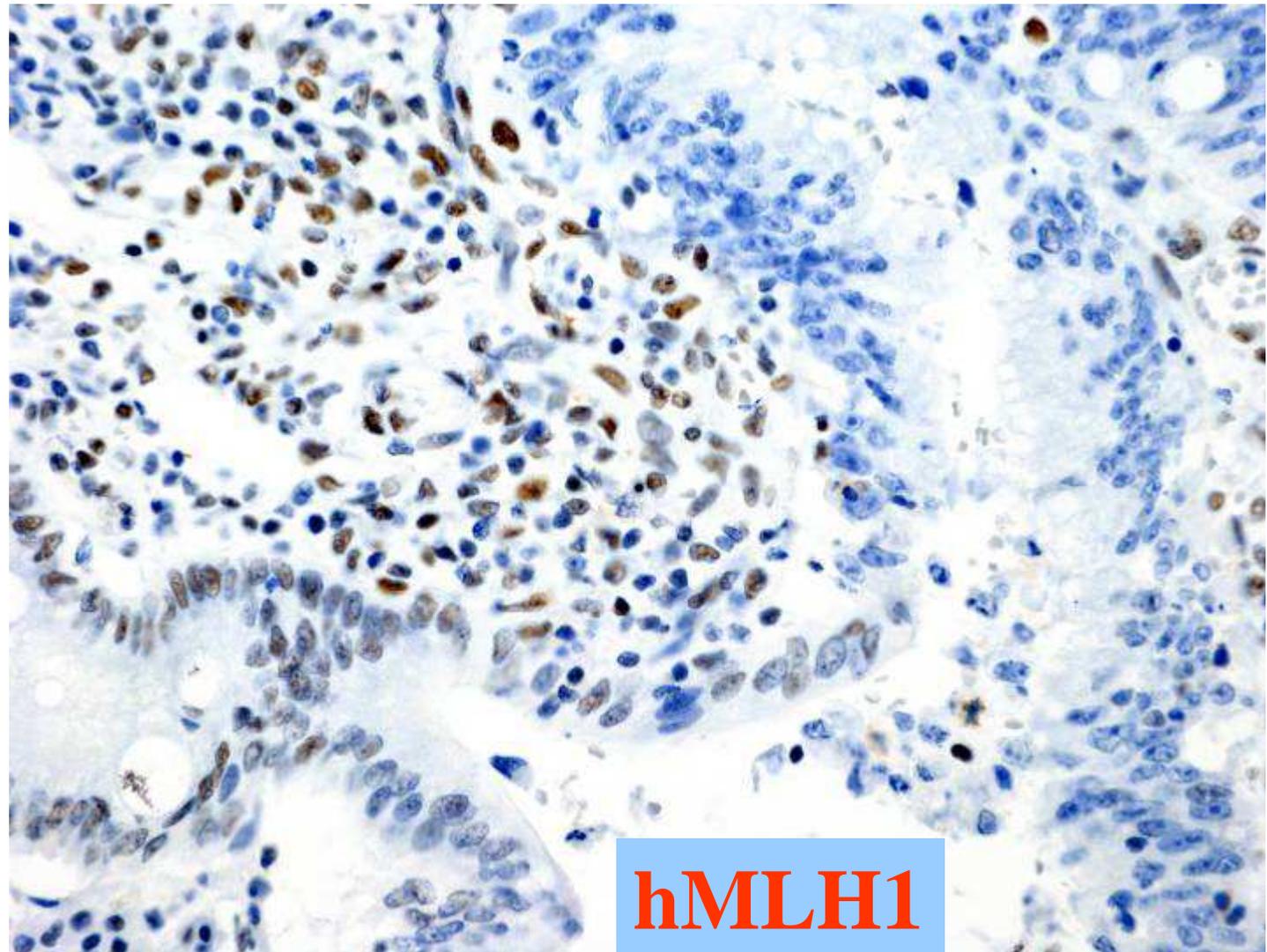
DNA „mismatch-repair“ Proteine - Immunhistochemie



Medizinische Universität Graz

hMLH1
hMSH2
hMSH6
hPMS2

Fehlen =
Funktions-
verlust



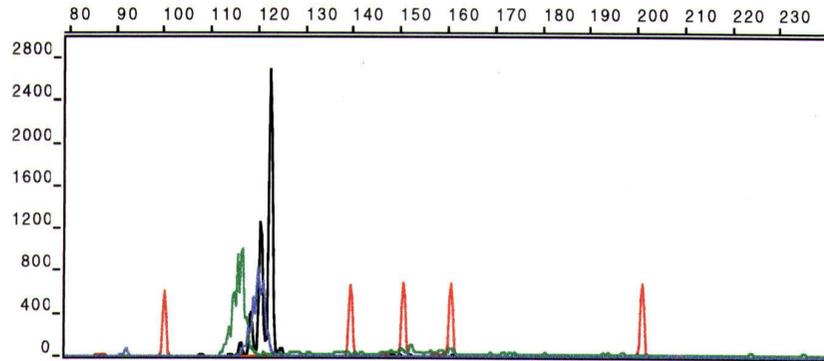
hMLH1

Microsatelliteninstabilität

- PCR Reaktion aus TumorDNA mit normiertem Panel von 5 Mikrosatelliten
 1. **Alle** Marker **unverändert**:
Mikrosatellitenstabilität: **MSS**
 2. **1/5** Markern verändert: **MSI-low**
 3. **2-5/5** Marker verändert: **MSI-high**

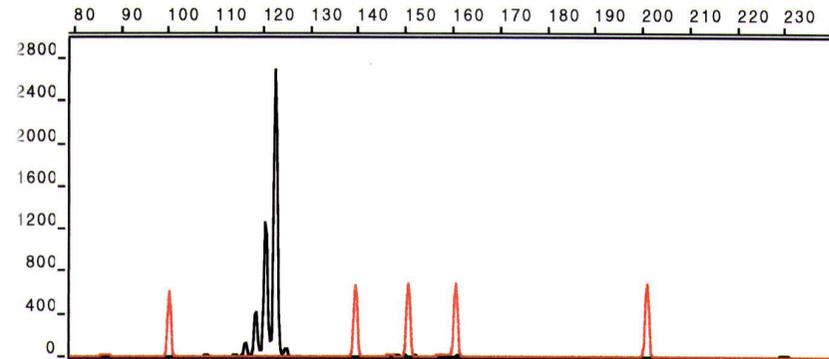
HNPCC MSI-Analyse

BAT 25
BAT26 D5 S346 (APC)

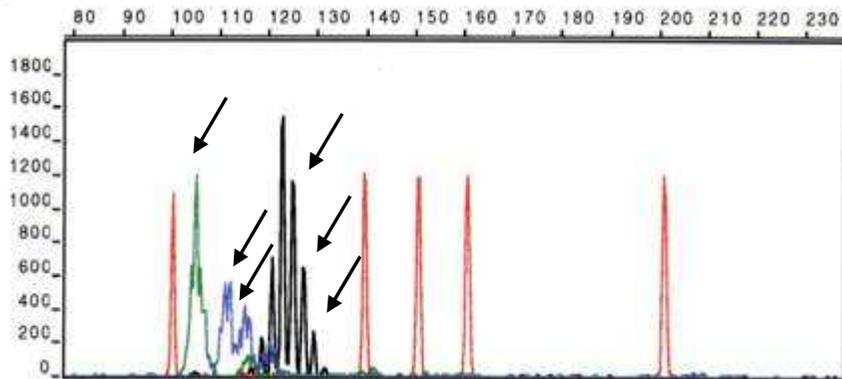


NORMALGEWEBE

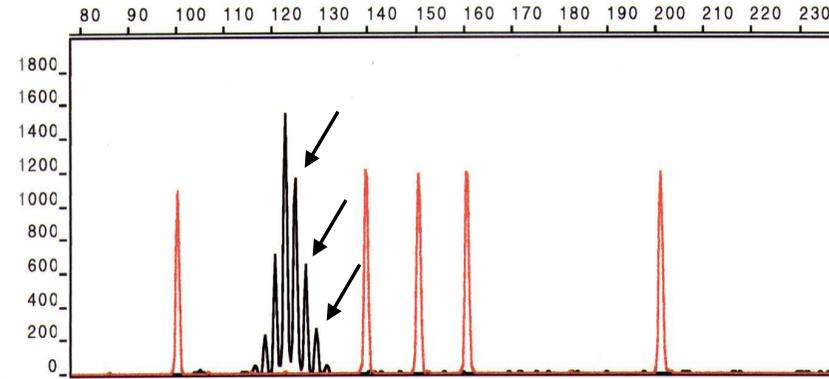
D5 S346 (APC) Interner Standard



NORMALGEWEBE



TUMORGEWEBE: MSI-H



TUMORGEWEBE: MSI-H

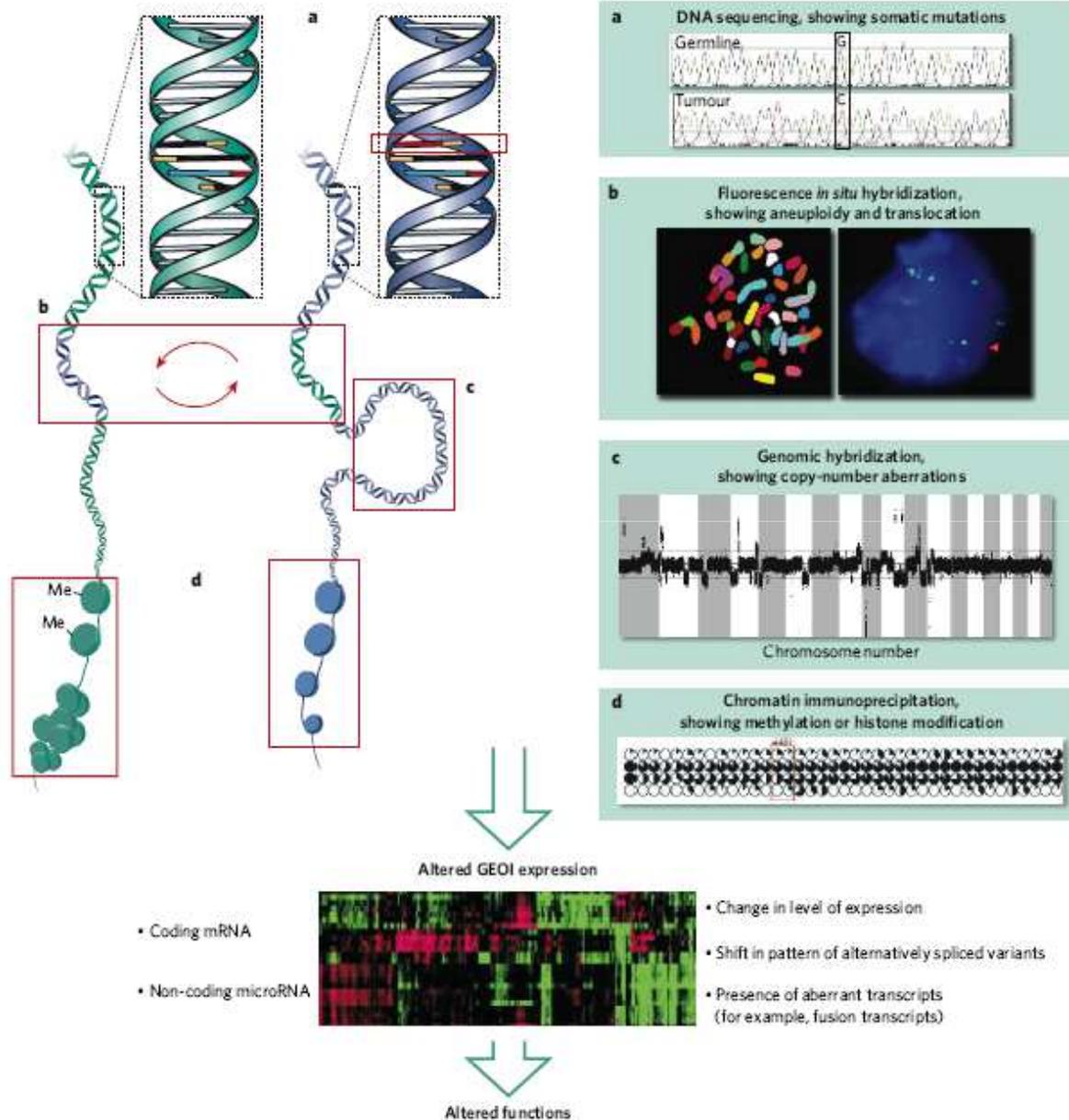
Was passiert nun ?

- Hochgradiger Verdacht auf Lynch Syndrom
- Patient wird beraten und aufgeklärt
- Einverständniserklärung
- Blutabnahme -> DNA Isolation
- Sequenzierung der DNA-Reparaturgene aus Blut -> Beweis der Erblichkeit
- PCR für Familie „gestrickt“-> Screening

Konsequenzen für Patient und Angehörige nach kompletter Abklärung

- 5 FU-haltige Chemotherapie bei MSI-high nicht sinnvoll, da wenig wirksam bis wirkungslos
- Engere postoperative Kontrolle: Colonoskopie und Ultraschall
- Verwandte (Geschwister, Kinder) untersuchen
 - Träger früh erkannt Karzinomentstehung durch Vorsorge verhindern / rechtzeitig erfassen
 - Keine Mutation – psychische Entlastung

Molecular cancer profiling



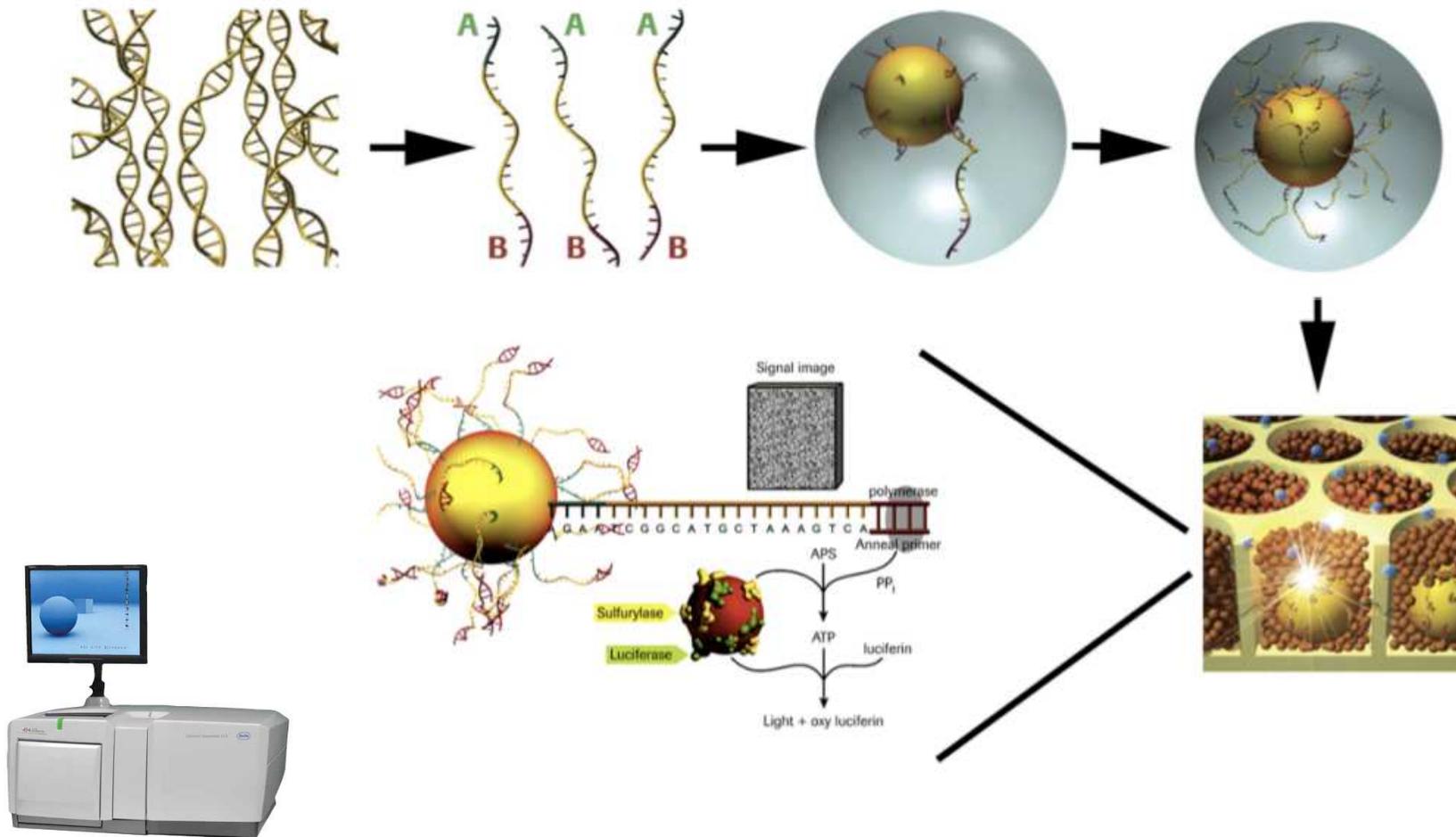
Cancer associated genomic changes:

- DNA sequence abnormalities
- Copy-number aberrations
- Structural aberrations
- Epigenomic alterations

Die Zukunft – ist schon hier

Next Generation Sequencing (NGS) Technology

Example ROCHE/454



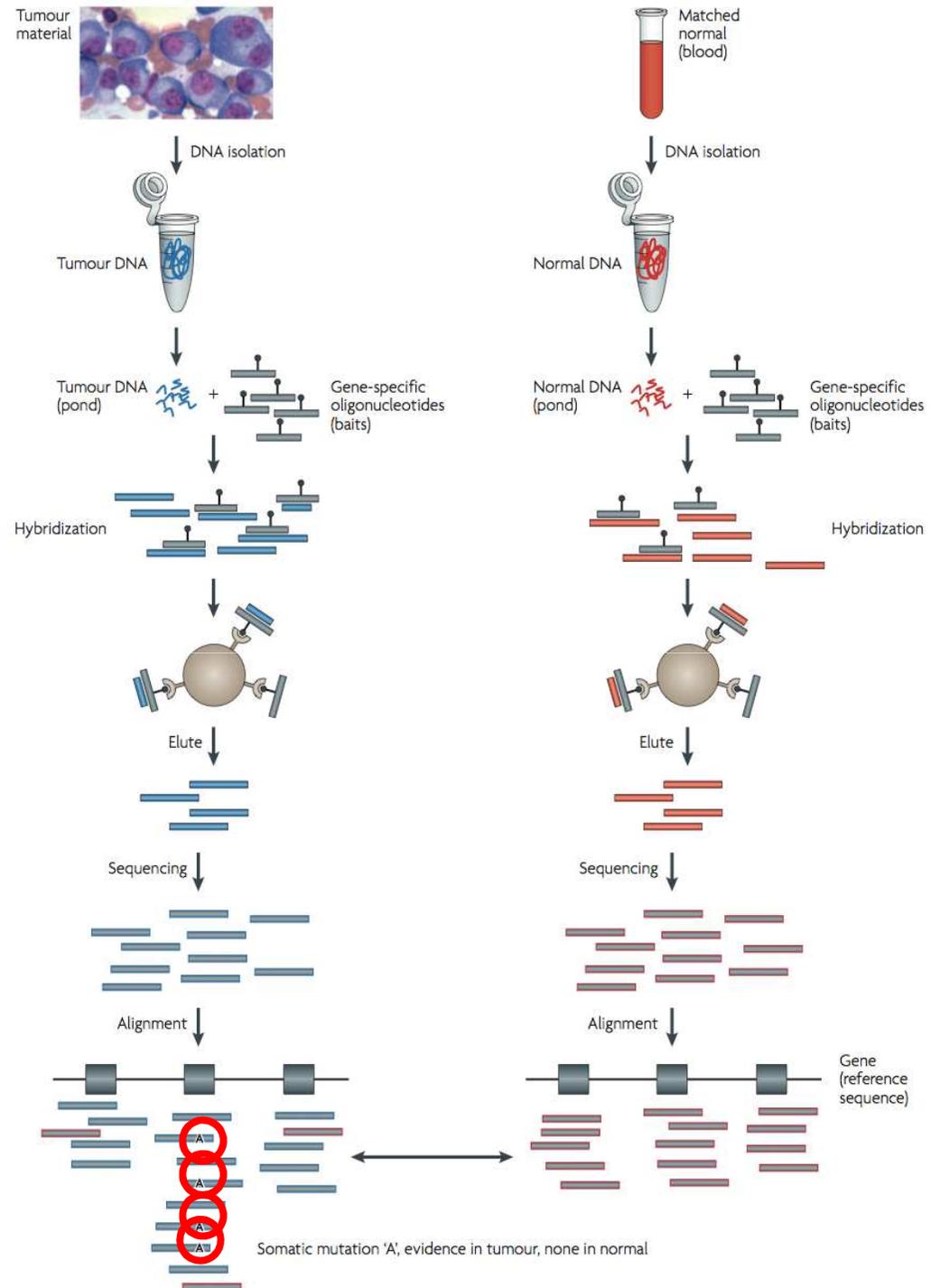
Generates 400,000 reads per run with 500-base reads at 99.5% accuracy 200 million high-quality filtered bases per 7.5 hour run

Application of NGS in molecular oncology:
Sequence capture technology:
„Finding new mutations in oncogenes“

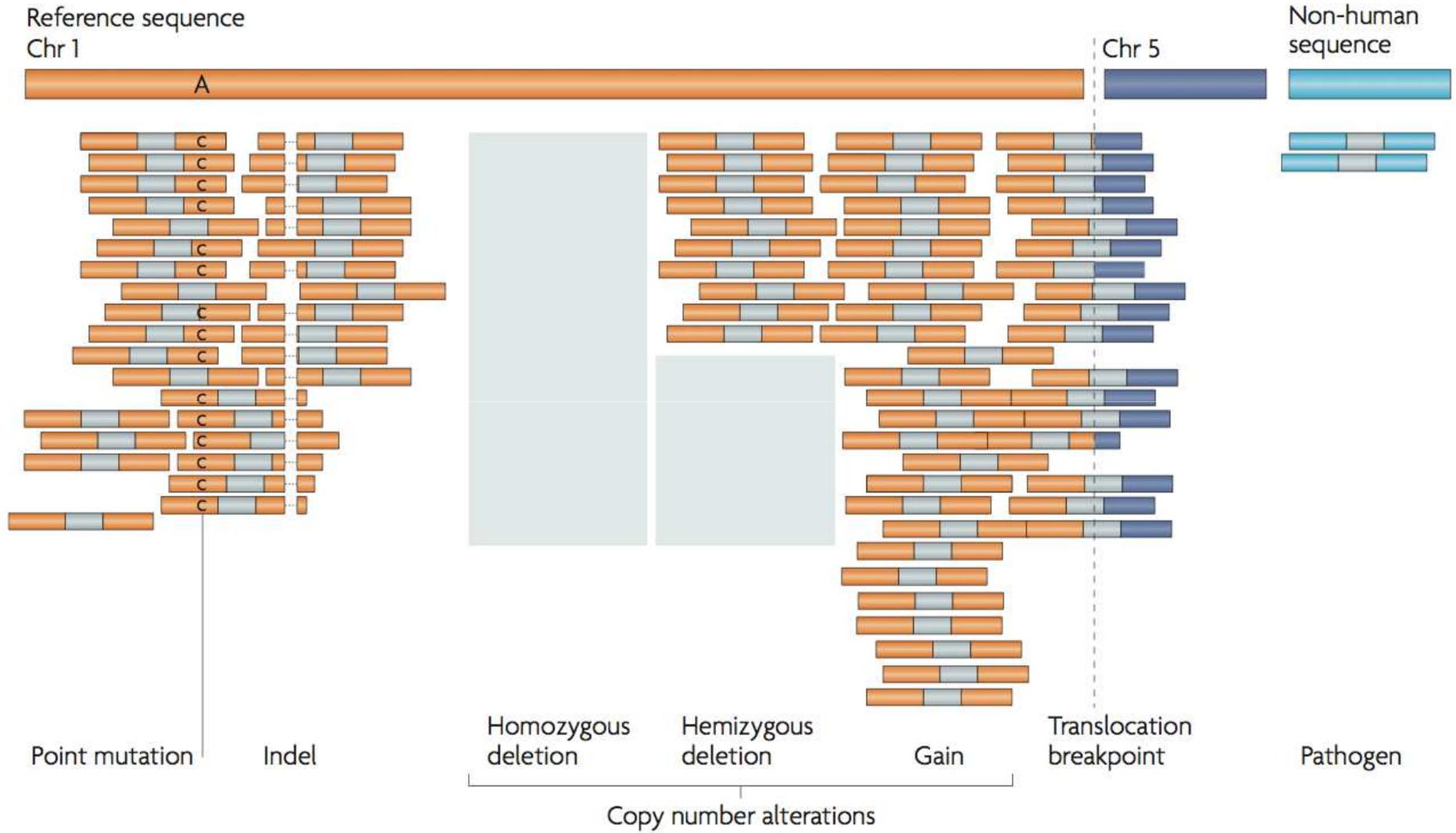
Enrichment of genes of interest

Next Generation Sequencing

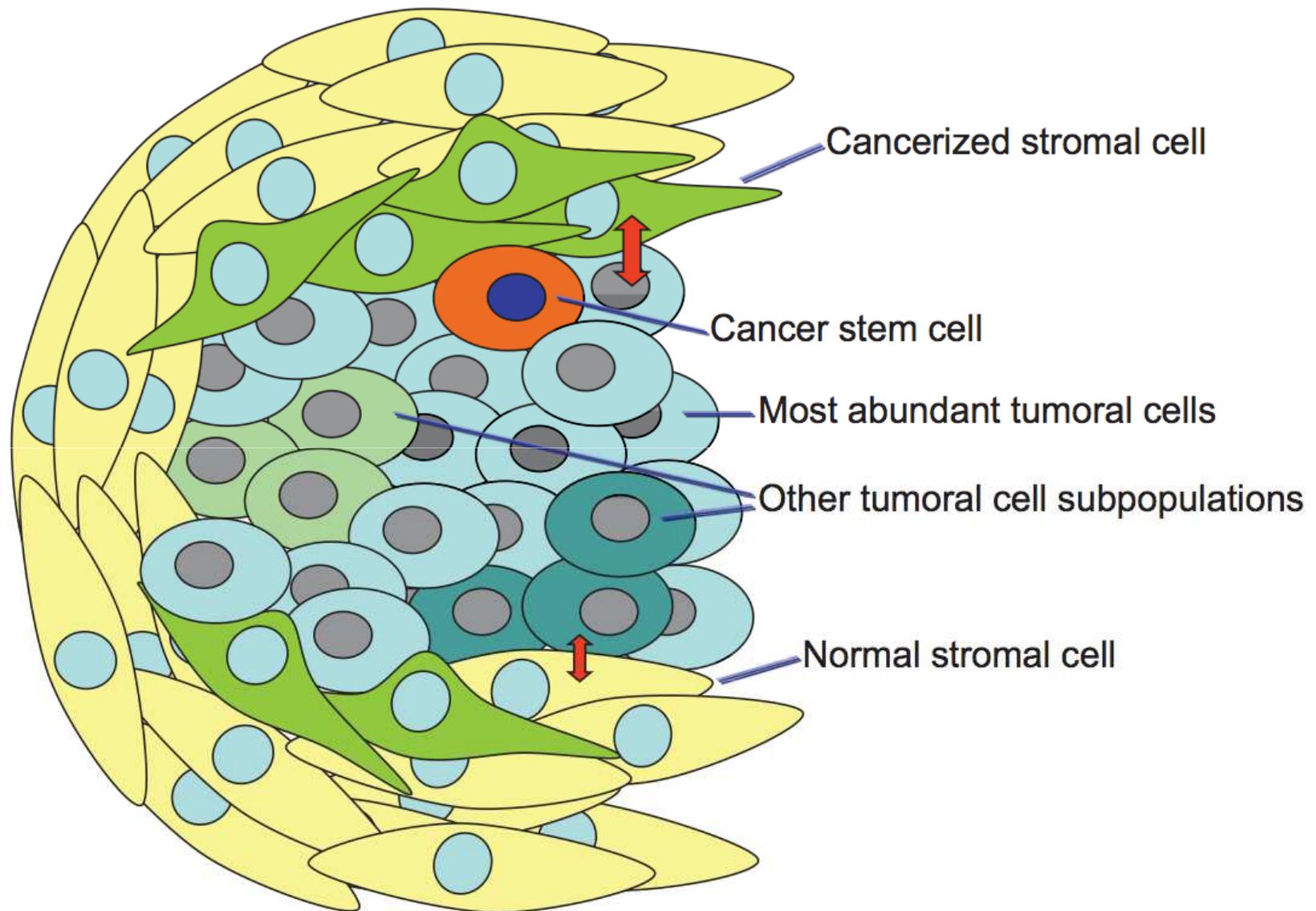
Bioinformatics analysis



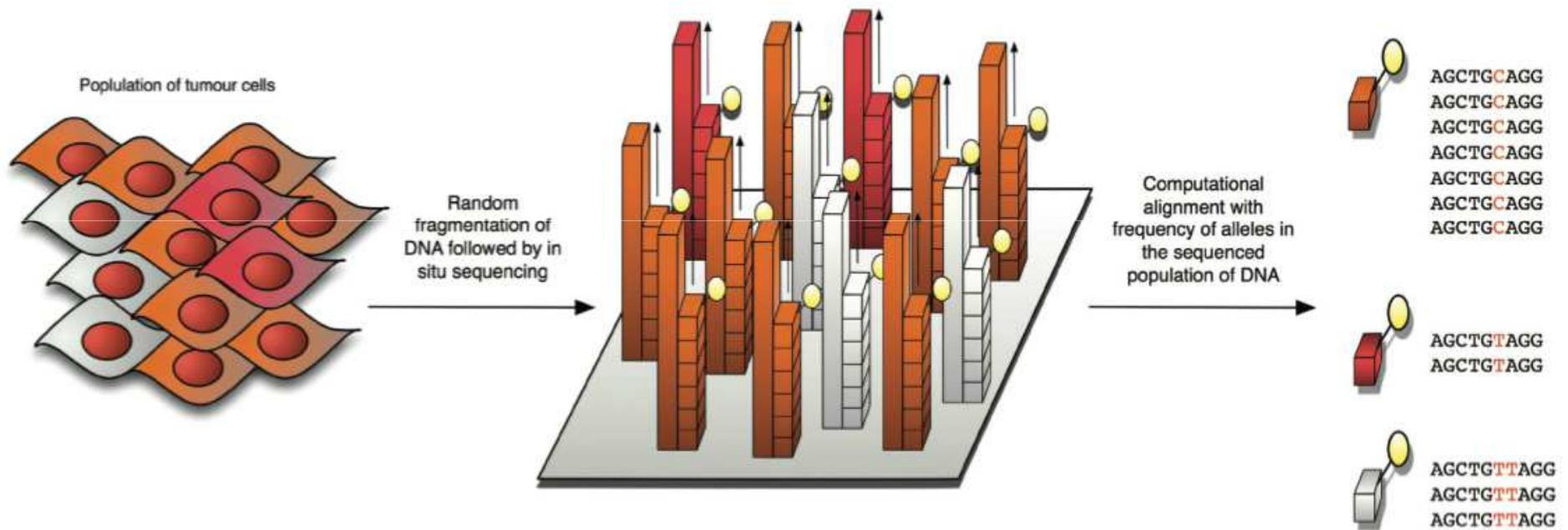
Types of genetic alterations which can be detected by NGS



A tumor is heterogeneous – different malignant cells with different mutations



A tumor is heterogeneous – different malignant cells with different mutations resolved by NGS





"Wenn wir in der einfachen Box nicht so gut gewesen wären, hätten sie uns nie die komplizierte Box gegeben..."