

1 Einleitung

1.1 Maligne Erkrankungen bei Kindern

1.1.1 Epidemiologie

In der Bundesrepublik Deutschland erkranken jährlich etwa 1800 Kinder unter 15 Jahren an Krebs. Bei einer relativ konstanten Bevölkerungszahl von ca. 13 Millionen Kindern beträgt die altersstandardisierte jährliche Inzidenz 13,9 pro 100.000. Die kumulative Inzidenz, also die Wahrscheinlichkeit, in den ersten 15 Lebensjahren an einem Malignom zu erkranken, beträgt für den Zeitraum 1992 bis 2001 207,1 pro 100.000.¹ Das bedeutet, dass eines von 483 Kindern bis zu seinem vollendeten 15. Lebensjahr an Krebs erkrankt. Damit rangieren maligne Erkrankungen als Todesursache bei Kindern an zweiter Stelle hinter Unfällen.²

Bezüglich der einzelnen Krebsarten unterscheiden sich Kinder und Erwachsene erheblich voneinander. Während bei Erwachsenen Karzinome mit über 90% dominieren, sind diese bei Kindern mit nur etwa 1% sehr selten. Hier treten vor allem Tumoren mesodermalen Ursprungs auf.³

Seit der Gründung des Kinderkrebsregisters am Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation in Mainz 1980 wurden dort über 30.000 Erkrankungen erfasst. Abbildung 1 gibt einen Überblick über die relative Häufigkeit der gemeldeten Patienten nach den häufigsten Diagnosegruppen für den Zeitraum 1992-2001. Die Gesamtzahl der gemeldeten Patienten betrug für diese Zeit 17.829.¹

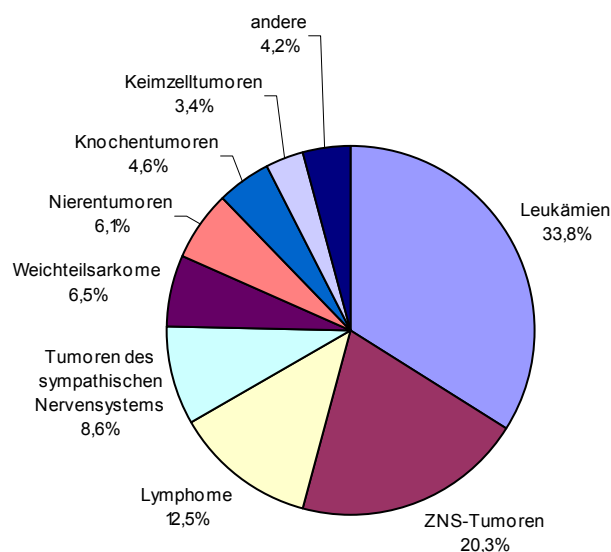


Abb.1: Relative Häufigkeit maligner Erkrankungen bei Kindern nach Diagnosegruppen 1992-2001 ¹

Abbildung 2 zeigt den relativen Anteil der häufigsten Einzeldiagnosen im Zeitraum 1992 bis 2002. (n = 17.829) (nach¹)

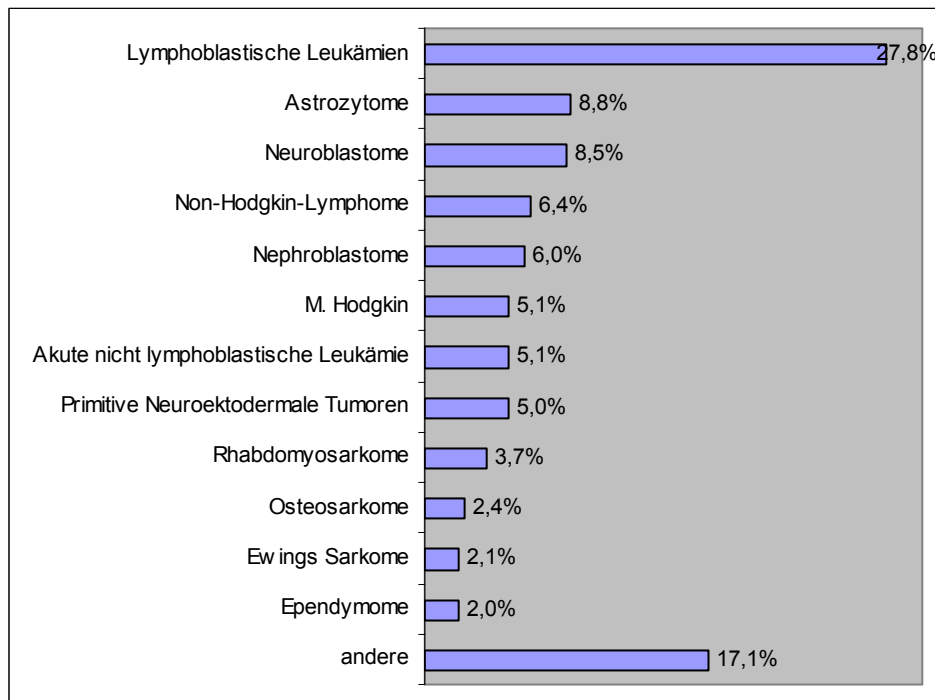


Abb. 2: Relativer Anteil der häufigsten Einzeldiagnosen neoplastischer Erkrankungen bei Kindern 1992-2002 (nach¹)

Mit 33,8% sind Leukämien mit Abstand am häufigsten. Unter den Leukämien dominiert mit ca. 82% die akute lymphoblastische Leukämie (ALL), die damit die häufigste Einzeldiagnose unter den malignen Erkrankungen im Kindesalter darstellt. Auf die akuten nicht-lymphatischen Leukämien entfallen etwa 15%. Hierzu zählt neben der seltenen akuten unklassifizierbaren Leukämie (AUL) vor allem die akute myeloische Leukämie (AML). Die chronische myeloische Leukämie (CML) ist mit etwa 2,0% selten. Die im höheren Lebensalter häufige chronische lymphatische Leukämie (CLL) wurde im Kindesalter nur in Einzelfällen beschrieben. Andere Formen sind ebenfalls selten.^{1, 4}

Rechnet man die malignen Lymphome, die etwa 12,5% der Malignome ausmachen, hinzu, so entfällt auf die Zellen des Immunsystems mit 46,3% fast die Hälfte aller Krebserkrankungen im Kindesalter.

Seit 1980 ist für die Inzidenz von Malignomen bei Kindern insgesamt ein Anstieg zu beobachten, der jedoch zumindest teilweise auf eine vollständigere Meldung von Erkrankungsfällen sowie auf eine verbesserte Diagnostik zurückzuführen ist. Auch für die ALL ist ein Inzidenzanstieg zu beobachten, der jedoch eventuell auf eine veränderte

Abgrenzung zwischen ALL und Non-Hodgkin-Lymphom zurückzuführen ist. Wieweit es sich um einen statistisch relevanten Inzidenzanstieg handelt, bedarf der weiteren Beobachtung.¹

Leukämien betreffen vor allem jüngere Kinder. Während der Altersmedian für Malignome im Kindesalter insgesamt mit 5 7/12 Jahren angegeben wird, liegt er bei Leukämien bei 4 11/12 Jahren. Für die ALL beträgt er 4 9/12 Jahre, während die AML und die chronischen Leukämien etwas ältere Kinder betreffen. Bei den Lymphomen dagegen liegt der Median mit 10 4/12 Jahren deutlich höher. Mit einem Geschlechtsverhältnis von 1,2 zu 1 zeigen ALL und Leukämien insgesamt eine leichte Knabenwendigkeit. Das Verhältnis entspricht dem der Malignome insgesamt.

Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt für alle Krebserkrankungen im Kindesalter für den Diagnosezeitraum 1992 bis 2001 etwa 78% (Kaplan-Meier-Schätzung). Für die ALL liegt sie bei etwa 84%. Für andere Leukämieformen ist die Prognose deutlich ungünstiger.¹

1.1.2 Ursachen der ALL

Leukämie wurde als eigenständige Krankheit erstmals 1845 von Rudolf Virchow anlässlich einer Sektion beschrieben: „Das Verhältnis zwischen den farbigen und farblosen Blutkörperchen stellte sich hier ungefähr umgekehrt, wie im normalen Blute, indem die farblosen die Regel, die farbigen eine Art von Ausnahme zu bilden schienen. Wenn ich daher von *weissem Blut* spreche, so meine ich in der Tat ein Blut, in welchem die Proportion zwischen den rothen und farblosen (in Masse weissen) Blutkörperchen eine umgekehrte ist, ohne dass eine Beimischung fremdartiger chemischer oder morphologischer Elemente zu bemerken wäre.“⁵ Für „weisses Blut“ setzte sich die griechische Bezeichnung „Leukämie“ durch. Virchow erkannte, dass es sich trotz vermeintlicher Eitermassen nicht um eine „allgemeine Pyämie“, sondern um ein eigenständiges Krankheitsbild handelt, dessen Ursachen jedoch lange unbekannt blieben.

Der genaue pathogenetische Mechanismus der Leukämieentstehung ist auch heute erst teilweise bekannt. Sicher ist, dass genetische Faktoren an der Leukämogenese beteiligt sind. So ist das relative Erkrankungsrisiko bei Geschwistern eines leukämiekranken Kindes mit 1,1 im Vergleich zu nichtverwandten Kindern nur geringfügig erhöht, während es bei monozygoten Zwillingen unter 15 Jahren bei 350

liegt. Bei eineiigen Zwillingen unter 5 Jahren liegt es sogar bei 25%.⁴ Bei der ALL kommt es zu einer klonalen Proliferation hämatologischer Vorläuferzellen. Bei 80% der betroffenen Kinder finden sich chromosomale Veränderungen in den Leukämiezellen.⁶ Die mit ca. 28% häufigste genetische Veränderung ist die Hyperdiploidie, die häufig mit einer günstigeren Prognose assoziiert ist. Wie es zur Bildung eines hyperdiploiden Leukämiezellklons kommt und warum diese Zellen besonders chemotherapiesensibel sind, ist bisher unklar.⁷ Ein Beispiel für eine angeborene genetische Veränderung, die mit einem deutlich erhöhten Risiko für akute Leukämien einhergeht, ist die zum Down-Syndrom führende Trisomie 21.^{7, 8}

Wesentlich für die Pathogenese sind hingegen bestimmte somatisch erworbene genetische Aberrationen. Eine Vielzahl solcher Veränderungen sind für die ALL bereits bekannt, darunter vor allem zahlreiche Translokationen, die zu Fusionsgenen und somit zu neuen Fusionsproteinen führen. An den Translokationen sind vor allem solche Gene beteiligt, die auch in der normalen Hämatopoese eine wichtige Rolle spielen. Besonders häufig betroffen sind Gene für Transkriptionsfaktoren (z.B. TEL, AML1), was zu einer veränderten Expression der Zielgene oder zu einer Aktivierung falscher Gene führen kann. Im Allgemeinen reicht eine einzelne Mutation jedoch nicht aus, um zu einer Leukämie zu führen. Wahrscheinlich wirken zwei verschiedene Mutationsarten zusammen, von denen eine zu einer verstärkten Proliferation und/oder einem längeren Überleben der Zellen und die andere zu einem Differenzierungsblock in der Hämatopoese führt.^{9, 10} Die verschiedenen Translokationen kommen bei Kindern und Erwachsenen verschieden häufig vor und sind mit einer unterschiedlichen Prognose assoziiert. So kommt z. B. die Translokation t(12;21) mit dem Hybridgen TEL-AML1 und einer günstigeren Prognose bei Kindern bei ca. 20% der ALL-Erkrankungen vor, bei Erwachsenen nur bei unter 3%. Die mit einer ungünstigeren Prognose verbundene Translokation t(9;22) mit dem Hybridgen BCR-ABL dagegen kommt bei 20-30% der Erwachsenen, aber nur bei 3-5% der Kinder mit ALL vor. Diese Unterschiede zeigen zum einen die unterschiedliche Ätiologie der ALL und erklären zum anderen die im Vergleich zu Erwachsenen bessere Prognose der ALL im Kindesalter.^{7, 9, 11, 12}

Dies macht verständlich, warum bestimmte DNA-schädigende Einflüsse wie z.B. radioaktive Strahlung, aber auch eine gestörte DNA-Reparatur das Risiko einer Leukämieentstehung erhöhen können, da es so leichter zu einer Akkumulation einzelner somatischer Mutationen kommen kann. Zu den Erkrankungen, die aufgrund

gestörter DNA-Reparatur zu einem erhöhten Leukämierisiko führen, zählen die Ataxia telangiectasia und die Fanconi-Anämie.¹³

1.2 DNA-Schäden und DNA-Reparatur

1.2.1 Arten von DNA-Schäden

Eine wesentliche Voraussetzung für das Leben ist, dass die genetische Information jeder Zelle weitestgehend unverändert erhalten und an ihre Tochterzellen weitergegeben wird. Jede Zelle ist jedoch ständig einer Vielzahl DNA-schädigender Einflüsse ausgesetzt, die sich im Wesentlichen in vier Gruppen einteilen lassen:

1. Umwelteinflüsse wie der UV-Anteil des Sonnenlichtes, natürliche und künstliche radioaktive Strahlung sowie zahlreiche chemische Substanzen, wie sie z.B. im Zigarettenrauch enthalten sind.
2. Stoffwechselprodukte der Zelle wie freie Radikale: Es sind allein über 100 oxidative Veränderungen der DNA bekannt.
3. Einige DNA-Schäden treten spontan auf, so z.B. die hydrolytische Abspaltung oder die Desaminierung von Nukleotiden.¹⁴
4. DNA-Doppelstrangbrüche können auch physiologisch auftreten, so z.B. im Rahmen der V(D)J-Rekombination während der B- und T-Zell-Reifung und beim Antikörperklassenwechse¹⁵⁻¹⁷ sowie während der Meiose, um einen Austausch zwischen homologen Chromosomen zu ermöglichen.¹⁸

Abbildung 3 gibt einen Überblick über die ungefähre Häufigkeit einiger DNA-Schäden angegeben pro Zelle und Tag:

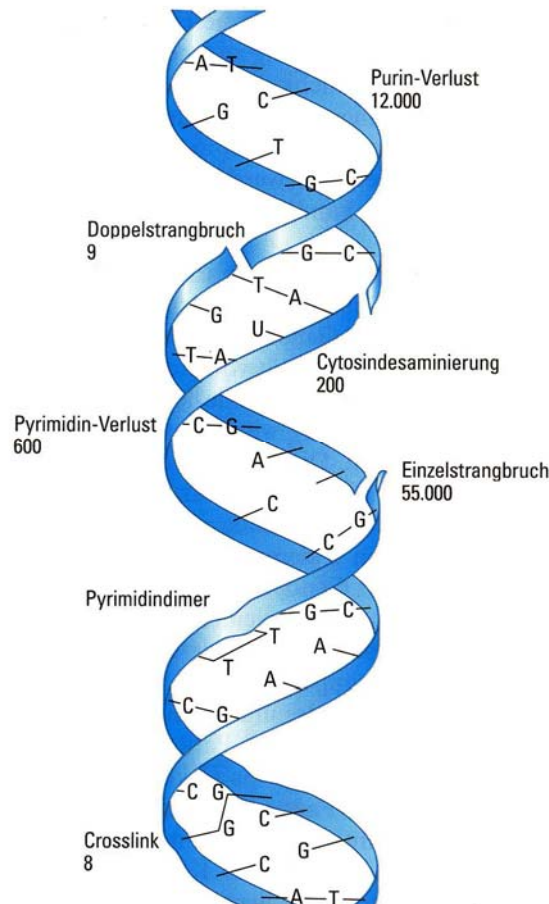


Abb. 3 : Häufigkeit verschiedener DNA-Schäden pro Tag pro Zelle. Abb. nach ¹⁹

Hieraus wird deutlich, dass die Schädigung der DNA ein außerordentlich häufiges Ereignis ist. Durch die große Zahl täglich in jeder Zelle auftretender Schäden kann es zur Akkumulation genetischer Veränderungen kommen, die schließlich auch zur Aktivierung von Protoonkogenen, zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder zur Bildung von Fusionsgenen führen, wie sie auch an der Leukämogenese maßgeblich beteiligt sind.^{9, 14} Dies macht deutlich, dass der Erhalt der genomischen Integrität nur möglich ist, wenn es gelingt, eine Vielzahl verschiedener DNA-Schäden effektiv zu beheben oder zumindest eine Weitergabe an die Tochterzellen zu verhindern.

In der Tat gibt es eine Reihe evolutionär alter und hoch konservierter DNA-Reparatursysteme.¹⁴ Ist ein DNA-Schaden zu schwerwiegend, kann alternativ auch der

programmierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet werden, um zumindest eine Weitergabe des Schadens zu verhindern.^{14, 20}

Grundsätzlich sind zwei Formen von DNA-Schäden zu unterscheiden, da sich hieraus grundlegende Unterschiede für die Reparatur ergeben: Die weitaus meisten Schäden betreffen lediglich einen Strang (s. o.). Hier kann der komplementäre Strang bei der Reparatur als Matrize dienen. Im Falle des selteneren Doppelstrangbruches ist dies nicht ohne weiteres möglich.

1.2.2 Reparatur von DNA-Einzelstrangschäden

Für die Behebung von Einzelstrangschäden sind drei Reparaturmechanismen bekannt:

1. Der wichtigste Reparaturweg ist die *Basen-Exzisions-Reparatur (BER)*. Einzelne geschädigte Basen werden entfernt und ersetzt sowie Einzelstrangbrüche behoben. Die Tatsache, dass beim Menschen kein Defekt in diesem System bekannt ist und dass ein Totalausfall dieses Systems bei Knockout-Mäusen im Embryonalstadium letal ist, unterstreicht die zentrale Bedeutung dieses Mechanismus.
2. Ein bekannteres und klinisch relevantes Beispiel ist die *Nukleotid-Exzisions-Reparatur*. Sie ist unter anderem maßgeblich verantwortlich für die Beseitigung UV-induzierter Pyrimidindimere. Ein Ausfall dieses Systems führt zur Xeroderma pigmentosum, was mit einem über 1000fach erhöhten Risiko für sonnenlichtinduzierte Hauttumoren verbunden ist.
3. Ein weiteres Beispiel ist die *Basen-Fehlpaarungs-Reparatur*, welche postreplikativ Fehler behebt, die u. a. während der Replikation aufgetreten sind. Mutationen in zwei hierbei maßgeblichen Genen (MLH1 u. MSH2) sind für ca. 50% der Fälle des Hereditären-Nichtpolipösen-Kolonkarzinom-Syndroms (HNPCC) verantwortlich.^{14, 20, 21}

1.2.3 Doppelstrangbrüche

Doppelstrangbrüche (DBS) stellen die gefährlichste Form von DNA-Schädigung dar, da es hierbei zu genetischen Rekombinationen kommt, die letztlich zur Tumorgenese oder zur Apoptose führen können.^{22, 23} Sind essentielle Gene betroffen, kann bereits ein einziger DBS zum Zelltod führen.^{18, 24} Ausgelöst werden können DBS z. B. durch radioaktive Strahlung, verschiedene Chemikalien, mechanischen Stress, freie Radikale aus dem Zellstoffwechsel oder durch Wechselwirkung zwischen einem

Einzelstrangbruch und der Replikationsgabel. Physiologisch kommen sie während der Meiose sowie bei der V(D)J-Genrekombination vor.^{16, 18, 25}

Grundsätzlich gibt es bei Eukaryoten zwei Formen der DSB-Reparatur: Während der späten S-Phase und der G2-Phase kommt es zur Homologen Rekombination (HR) vor allem mit dem entsprechenden Schwesterchromatid, während der G0-, G1- und der frühen S-Phase sowie bei der V(D)J-Rekombination hingegen kommt es zum Non-Homologous End Joining (NHEJ).^{16, 17, 23, 25, 26} Zwischen beiden Wegen sowie zwischen DNA-Reparatur und Zellzyklus gibt es jedoch erhebliche Wechselwirkungen.

1.2.4 Zellzyklus

Die Periode zwischen zwei Zellteilungen wird als Zellzyklus bezeichnet. Dieser wird in vier Phasen eingeteilt: Die Phase der Zellteilung wird als M-Phase (Mitose-Phase) bezeichnet, die Phase der DNA-Verdoppelung als S-Phase (Synthese-Phase). Dazwischen liegen zwei als G1- bzw. G2-Phase (engl. gap; Lücke, Pause) bezeichnete Abschnitte. Nichtproliferierende Zellen bleiben in einer als G0-Phase bezeichneten Sonderform der G1-Phase.²⁷ Abb. 4 zeigt die verschiedenen Phasen:

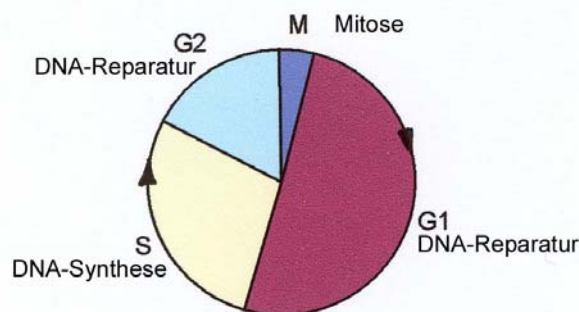


Abb. 4: Zellzyklusphasen

Voraussetzung für eine effiziente DNA-Reparatur ist ein Zellzyklusarrest, der der Zelle Zeit lässt, den entstandenen Schaden zu reparieren, bevor er an die Tochterzellen weitergegeben werden kann. Die Erkennung des DNA-Schadens erfolgt durch die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinasen ATM (ataxia telangiectasia mutated), ATR (ataxia telangiectasia related) sowie die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK). Letztere ist vor allem am NHEJ beteiligt.²⁸⁻³¹

Nach radioaktiver Bestrahlung führt eine Autophosphorylierung von ATM zur Dissoziation der inaktiven Dimere und dadurch zur Aktivierung. Verantwortlich hierfür ist offensichtlich nicht eine direkte Bindung an die DNA-Enden, sondern eine Veränderung der Chromatinstruktur.³²

ATM und ATR können die Induktion und Aktivierung des Proteins p53 bewirken. p53 kann einerseits zur Apoptose, andererseits über p21 zu einem G1-Phase-Arrest führen. Über die Proteinkinase CHK1 kann ATR einen Übergang von der G2- in die M-Phase blockieren. Ein weiteres Substrat von ATM ist das Protein NBS1 (Nijmegen breakage syndrom), das wahrscheinlich an der Ausbildung eines S-Phase-Arrestes beteiligt ist.³¹⁻³⁸ Abb. 5 gibt einen Überblick über die Zusammenhänge zwischen DNA-Schaden und Zellzyklus.

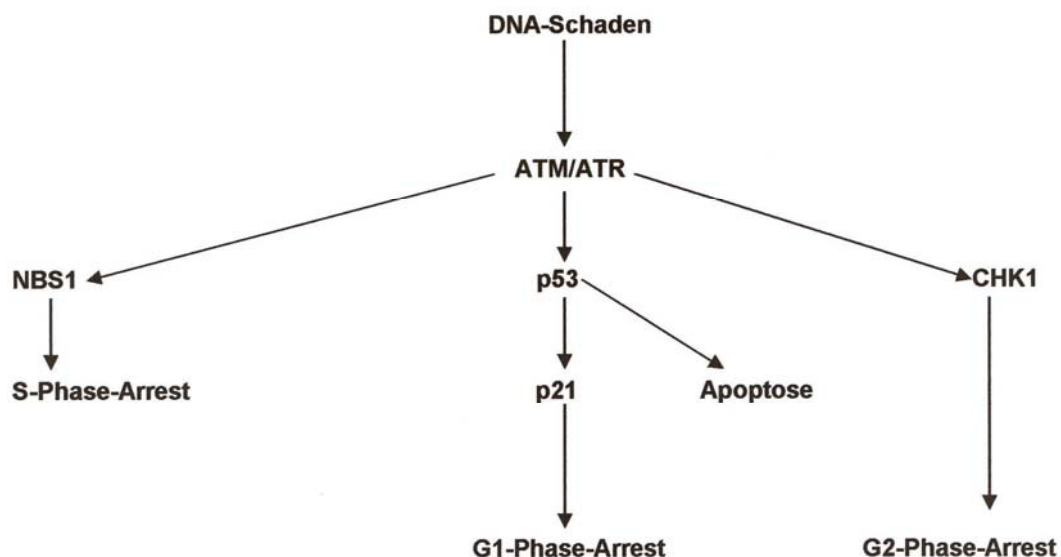


Abb. 5: Zusammenhang zwischen DNA-Schaden und Zellzyklus

1.2.5 Homologe Rekombination (HR)

Nach radioaktiver Bestrahlung phosphoryliert ATM das Protein NBS1.³⁵⁻³⁷ NBS1 bildet einen Komplex mit MRE11 (meiotic recombination) und RAD50. Ob eine ATM-abhängige Phosphorylierung hierzu erforderlich ist, ist noch umstritten.^{35, 37} Der MRE11-RAD50-NBS1-Komplex besitzt eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität und schafft dadurch überhängende 3'-Einzelstrangenden.^{14, 16, 31, 39} Diese freien DNA-Enden

werden durch RAD52 gebunden,⁴⁰⁻⁴² das nun RAD51 und RPA (replication protein A) zu den DNA-Enden rekrutiert.⁴⁰ RAD51 bewirkt in diesem Komplex die Anlagerung des homologen Abschnittes eines intakten DNA-Moleküls und den Strangaustausch zwischen den freien 3'-Enden und dem komplementären Einzelstrang des intakten Moleküls.^{39, 40, 43-45} Hieran sind u. a. auch die Proteine RAD54⁴⁶ und BRCA2 sowie eventuell BRCA1⁴⁷ beteiligt.

Nach dem Strangaustausch kommt es ausgehend vom 3'-Ende des gebrochenen Strangs zur Neusynthese der verlorenen DNA, wobei das intakte DNA-Molekül als Matrize dient. Nachdem die so entstandene „Holiday Junction“ aufgelöst und die Bruchenden ligiert wurden, ist der Schaden vollständig behoben, ohne dass ein DNA-Verlust entstanden ist.^{16, 18, 39} Hierbei kommt es im Allgemeinen nicht zu einem Crossing-over. Der homologe DNA-Abschnitt liefert lediglich die zur Reparatur notwendigen Informationen, bleibt aber selbst unverändert.⁴⁸

Der homologe DNA-Abschnitt stammt überwiegend aus dem Schwesterchromatid, das sich während der späten S- und der G2-Phase in direkter Nachbarschaft befindet. Ein Strangaustausch mit dem homologen Chromosom wäre zwar ebenfalls möglich, aufgrund der räumlichen Entfernung jedoch schwieriger. Außerdem könnte es hierdurch zu einem Verlust der Heterozygotie kommen, was z.B. zur Aktivierung von Tumorsuppressorgenen führen könnte.^{39, 48}

Ein weiterer Reparaturweg, der Homologien nützt, ist das Single-Strand-Annealing (SSA). Es kann als eine besondere Form der HR angesehen werden.⁴⁹ Nach Prozessierung der DNA-Enden kommt es zur Paarung zwischen den Einzelsträngen homologer Abschnitte innerhalb des betroffenen DNA-Moleküls. Dazwischenliegende DNA-Abschnitte gehen verloren, so dass dieser Reparaturweg fehlerhaft ist.^{23, 39, 49}

Teilweise wird das SSA auch als eigenständiger Reparaturweg der HR gegenübergestellt. Dann werden z. T. HR als Gene Conversion (GC) bezeichnet sowie SSA und GC unter der Bezeichnung Homology-directed-repair (HDR) zusammengefasst. Abb. 6 fasst die wesentlichen Schritte der HR zusammen:

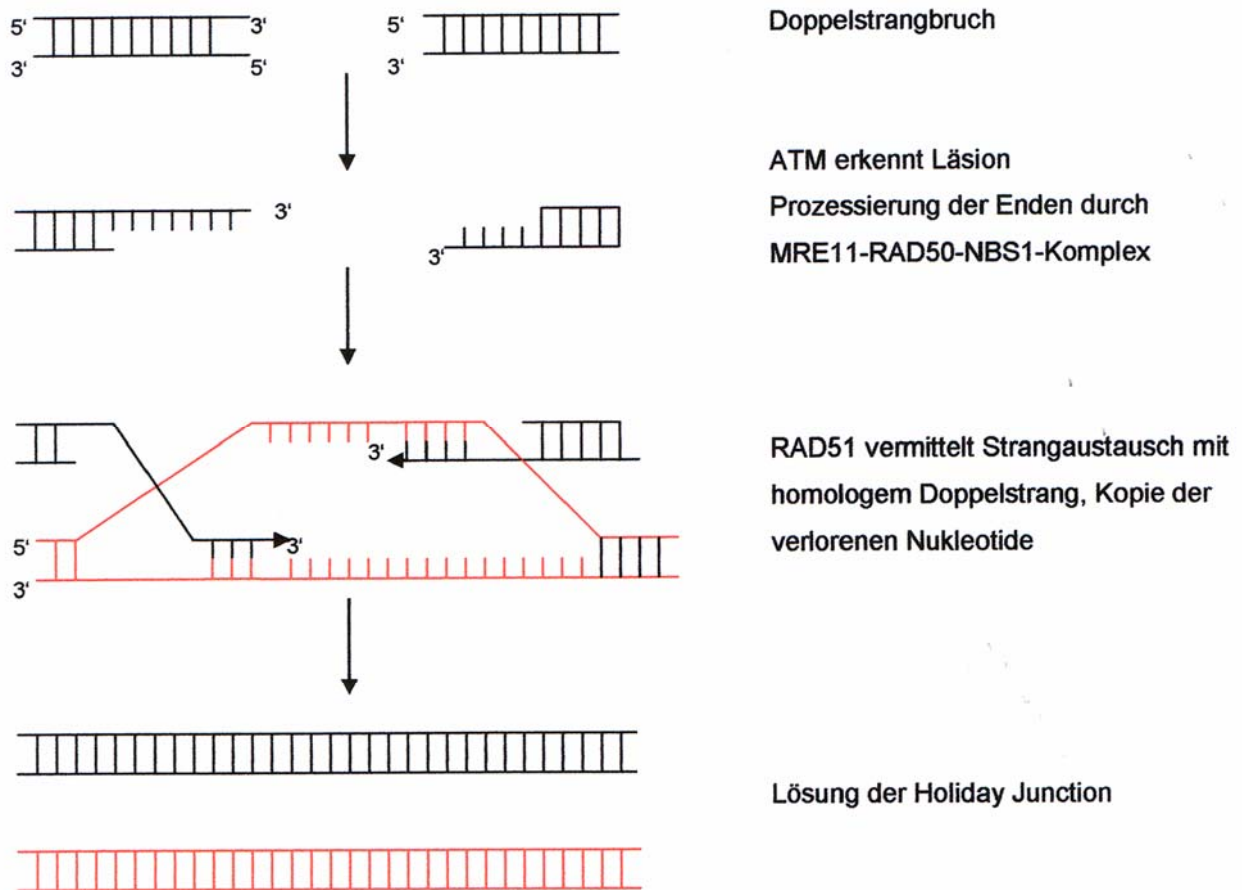


Abb. 6: Homologe Rekombination

1.2.6 Non-Homologous End Joining (NHEJ)

Dieser Reparaturweg beginnt mit der Erkennung des DNA-Schadens durch die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK). Diese besteht aus der katalytischen Untereinheit (DNA-PK_{cs}) und dem Ku-Heterodimer, das sich aus den Untereinheiten KU70 und KU80 zusammensetzt. Letzteres wird teilweise auch als KU86 bezeichnet. Nach einem DSB binden zwei Ku-Heterodimere an die DNA und überbrücken den Spalt zwischen den Bruchenden. Ku rekrutiert nun die DNA-PK_{cs} zu den DNA-Enden. Während diese alleine DNA nur schwach binden kann, wird diese Fähigkeit durch Ku erheblich gesteigert.^{17, 28, 30} Vor allem die gleichzeitige Bindung an zwei DNA-Einzelstrangenden steigert die Kinaseaktivität der DNA-PK_{cs}. Dies könnte erklären, wie die DNA-PK spezifisch durch DSB, nicht aber durch Einzelstrangbrüche aktiviert wird.²⁹

Die DNA-PK_{cs} kann in vitro sich selbst, Ku, XRCC4 (X-ray-cross-complementing), p53 sowie in vivo Artemis phosphorylieren. Ihre genaue Funktion in vivo ist jedoch erst

teilweise bekannt. Eine Autophosphorylierung führt in vitro zu einer Dissoziation von Ku und zu einer Inhibierung der Enzymaktivität. Möglicherweise kommt es hierdurch zu einer Autoregulation.^{16, 28}

Auch beim NHEJ ist im Allgemeinen eine Prozessierung der DNA-Enden erforderlich, bevor diese verbunden werden können, unter anderem weil auch die Umgebung des Bruches Veränderungen aufweisen kann, die eine direkte Reparatur unmöglich machen.^{17, 50} Hierfür ist das erst kürzlich entdeckte Protein Artemis maßgeblich verantwortlich. Artemis wird von der DNA-PK_{cs} phosphoryliert und bildet mit dieser einen Komplex. Während Artemis alleine eine 5'-3'- Exonukleaseaktivität zeigt, wirkt es phosphoryliert und im Komplex mit der DNA-PK_{cs} als Endonuklease an überhängenden 5'- und 3'-Enden.^{17, 50, 51}

Ob Artemis an der Reparatur nur bestimmter komplexer Doppelstrangbrüche beteiligt ist und wieweit auch andere Nukleasen wie FEN-1 oder der MRE11-RAD50-NBS1-Komplex an der Prozessierung der DNA-Enden beim NHEJ beteiligt sind, ist noch nicht eindeutig geklärt.^{17, 31, 51, 52}

Grundsätzlich können die DSB-Enden an jeder Stelle neu verbunden werden. Bevorzugt geschieht dies jedoch an Stellen, an denen beide Enden eine Mikrohomologie von einigen Nukleotiden aufweisen, da hier eine Basenpaarung der komplementären Einzelstränge möglich ist.^{17, 52}

Abb. 7 soll dieses Prinzip verdeutlichen, wobei B und B' homologe Abschnitte repräsentieren. Die Abschnitte C und B' gehen verloren.

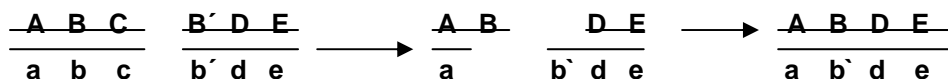


Abb. 7: Ausnutzung von Mikrohomologien beim NHEJ. B und B' sind homolog. Die Abschnitte C und B' gehen verloren. Abb. verändert nach ¹⁷

Schließlich rekrutiert Ku die Polymerase μ sowie einen Komplex aus XRCC4 und der DNA-Ligase IV zu den Bruchenden, wobei XRCC IV die Aktivität der Ligase steigert. In diesem Komplex befinden sich die Proteine XRCC IV und DNA-Ligase IV im Verhältnis 2:1. Die Polymerase μ beteiligt sich möglicherweise an der Schließung entstehender Lücken im Bereich der Bruchenden. Die Ligation der DNA-Enden erfolgt nun durch die DNA-Ligase IV.^{15, 17, 52-55}

Durch die Prozessierung der DNA-Enden und die fehlende Möglichkeit, verlorene Sequenzen an einem intakten DNA-Molekül neu zu synthetisieren, kommt es beim NHEJ zu einem DNA-Verlust.^{14, 18, 31} Neuere Erkenntnisse legen jedoch nahe, dass bei Säugetierzellen die Reparatur glatter, nicht überhängender DNA-Enden ohne Nukleotidverlust möglich ist.⁵⁶ Es ist jedoch noch unklar, wieweit dies den tatsächlichen Gegebenheiten in der Zelle entspricht. Weiter gibt es Hinweise auf einen KU-unabhängigen Backup-Mechanismus des NHEJ, der jedoch evtl. fehlerhafter ist.⁵⁷

Abb. 8 gibt einen Überblick über die wichtigsten Schritte des NHEJ:

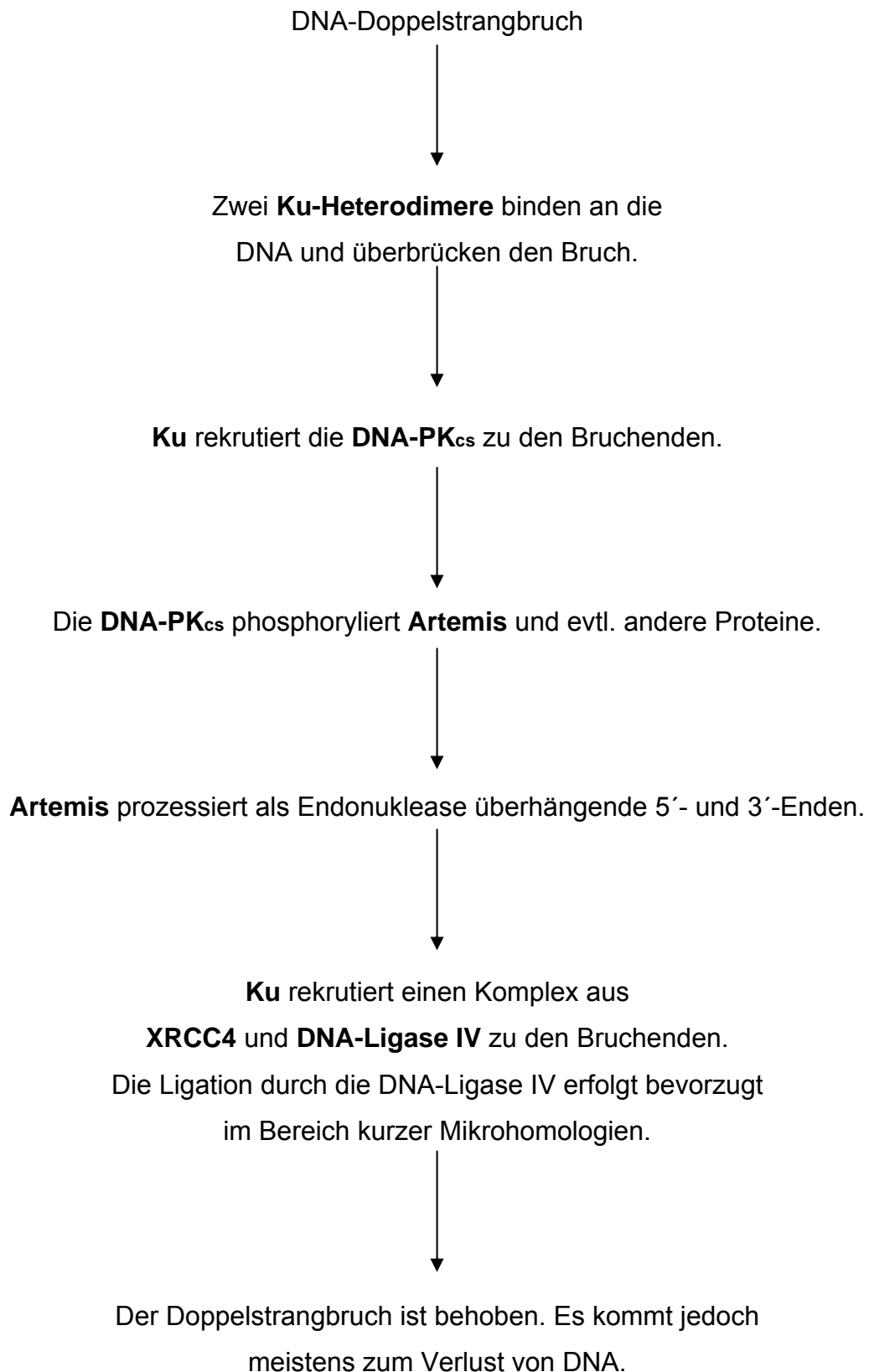


Abb. 8: Wesentliche Schritte des NHEJ

1.2.7 Defekte der Doppelstrangbruchreparatur

Wie bei den meisten anderen Reparaturwegen kann es auch bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen zu Defekten kommen. Bekannte Beispiele sind die Ataxia telangiectasia (AT) und das Nijmegen Breakage Syndrom (NBS). Beide Erkrankungen werden autosomal rezessiv vererbt. Bei beiden Syndromen kommt es v. a. nach ionisierender Strahlung verstärkt zu Chromosomenbrüchen.¹³

Ataxia telangiectasia

Bei der AT sind Mutationen im Gen für ATM vorhanden, das, wie beschrieben, an der Zellzykluskontrolle und der HR beteiligt ist. Die Betroffenen zeigen u. a. eine zunehmende zerebelläre Ataxie, konjunktivale Teleangiectasien, Immundefizienz und ein deutlich erhöhtes Risiko, bereits bis zum frühen Erwachsenenalter an Krebs, vor allem an Leukämien oder Lymphomen, zu erkranken. Außerdem kommt es zu einem gestörten S-Phase-Arrest mit sog. radioresistenter DNA-Synthese.^{13, 58, 59}

Verschiedene Mutationen im MRE11-Gen führen zu einer AT-ähnlichen Erkrankung mit leichter Symptomatik.^{13, 60}

Nijmegen Breakage Syndrom

Bei Mutationen im NBS1-Gen kommt es zum Nijmegen Breakage Syndrom (NBS). Bei NBS-Patienten kommt es u. a. zu Mikrozephalie, zunehmender geistiger Retardierung, Minderwuchs und Immundefizienz. Auch bei ihnen ist der S-Phase-Arrest gestört, und das Malignomrisiko ist noch stärker erhöht als bei AT-Patienten. Es treten v. a. B- und T-Zell-Lymphome auf.^{13, 24, 61}

Ligase-IV-Syndrom

1990 wurde über einen 14jährigen Patienten berichtet, der auf die Chemo- und v. a. die Strahlentherapie, die er aufgrund einer ALL erhielt, extrem heftig reagierte und an den Folgen der Bestrahlung verstarb. Andere klinische Auffälligkeiten bestanden nicht. Eine von diesem Patienten etablierte Zelllinie zeigte eine an AT erinnernde Strahlensensibilität, der S-Phase-Arrest war jedoch normal.⁶² 1999 wurde in dieser Zelllinie eine homozygote Mutation im Gen für die DNA-Ligase IV gefunden (R278H). Das veränderte Protein zeigte eine verringerte Fähigkeit, einen Enzym-Adenylat-Komplex zu bilden sowie eine verminderte enzymatische Aktivität. Dies war der erste

beschriebene Defekt in einem Gen, das am NHEJ des Menschen beteiligt ist.^{63, 64} Damit rückte die DNA-Ligase IV, ein Protein mit 911 Aminosäuren, verstärkt in das Interesse der Forschung. Der kodierende Abschnitt dieses intronlosen Gens, das auf Chromosom 13q33-q34 liegt, umfasst 2733 Basenpaare.^{65, 66}

Inzwischen wurden vier weitere Patienten identifiziert, deren klinisches Erscheinungsbild an NBS und teilweise an das Seckel-Syndrom erinnerte, die jedoch bei normalem Nibrin Mutationen im DNA-Ligase IV-Gen zeigten. Zu den Symptomen zählen Mikrozephalie, Gesichtsauffälligkeiten, Immundefizienz, Panzytopenie, Hautauffälligkeiten sowie Wachstums- und Entwicklungsstörungen. Die Zelllinien, die von drei dieser Patienten etabliert werden konnten, zeigten ebenfalls eine erhöhte Strahlensensibilität bei normaler Zellzyklusfunktion. Für dieses neue Krankheitsbild wurde der Begriff Ligase-IV-Syndrom geprägt. Daneben wurden jedoch auch Polymorphismen gefunden, die auch bei Gesunden vorkommen und deren Bedeutung noch unklar ist.⁶⁷

1.2.8 Struktur und Funktion der DNA-Ligasen

Bei Wirbeltieren und Menschen sind bisher drei DNA-Ligasen bekannt und näher charakterisiert, was Vergleiche bezüglich Aufbau und Funktion ermöglicht: Ligase I wird erstens für die Ligation der Okazaki-Fragmente bei der Synthese des Lagging Strand im Rahmen der DNA-Replikation benötigt und ist zweitens an der BER beteiligt. Ligase III kommt in mindestens zwei verschiedenen Spleißvarianten vor: Ligase III α ist ebenfalls an der BER beteiligt, während Ligase III β , die bisher nur im Hoden nachgewiesen wurde, möglicherweise eine Rolle bei der Homologen Rekombination während der Meiose spielt. Eventuell gibt es eine dritte Variante der Ligase III, die an der Reparatur mitochondrialer DNA mitwirkt. Ligase II ist wahrscheinlich ein Fragment von Ligase III. Ob ihr eine eigene physiologische Bedeutung zukommt, ist noch unbekannt. Die Existenz einer Ligase V ist zweifelhaft.^{68, 69} Die Rolle der Ligase IV im Rahmen des NHEJ wurde in Kapitel 1.2.6 dargestellt.

Die verschiedenen eukaryotischen DNA-Ligasen sind in ihrem Aufbau und in ihrer Funktionsweise grundsätzlich verwandt.⁶⁹ Am Anfang der Reaktion kommt es zu einer kovalenten Bindung eines ATP-Moleküls an einen Lysinrest in einem hochkonservierten KxDG-Motiv im aktiven Zentrum des Enzyms. Hierbei wird ein ATP-Molekül in AMP und Pyrophosphat gespalten. Das AMP wird danach an den 5'-Phosphatrest des einen

Bruchendes übertragen, bevor unter Abspaltung von AMP die beiden Bruchenden durch Ausbildung einer Phosphordiesterbindung ligiert werden.^{68, 69}

In der DNA-Ligase IV lassen sich einige Domänen identifizieren, die bereits aus anderen Ligasen bekannt sind. Die genauen Funktionen dieser Domänen und anderer Bereiche in der Ligase IV sind erst teilweise bekannt. Abb. 9 zeigt die bisher bekannten Domänen:

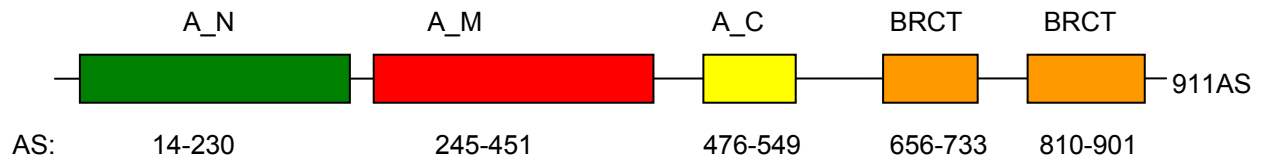


Abb. 9: In der DNA-Ligase IV identifizierte Proteindomänen: Im N-terminalen Teil des Enzyms (in der Abb. links) befindet sich das katalytische Zentrum. Die mit A_N und A_C bezeichneten Domänen sind eventuell, die mit A_M bezeichnete Domäne ist mit Sicherheit an der Katalyse beteiligt. Ganz am N-terminalen Ende befindet sich der 67 AS lange Abschnitt, in dem sich die Polymorphismen A3V und T9I befinden. Im C-terminalen Teil befinden sich zwei BRCT-Domänen. Dazwischen bindet XRCC4.^{65, 68-70} (AS = Aminosäure)

Im N-terminalen Bereich des Proteins befindet sich der katalytisch aktive Teil des Enzyms. Hier wurden drei bekannte Domänen gefunden: Die mit A_N bezeichnete Domäne kommt in den meisten aber nicht in allen ATP-abhängigen DNA-Ligasen vor. In der Ligase I des Menschen und der Bierhefe, nicht aber aller Spezies, ist sie für die Katalyse erforderlich. Domäne A_M bildet die als „adenylation domain“ bezeichnete Region. Sie enthält das für die Katalyse zentrale konservierte KxDG-Motiv, an dessen Lysinrest das ATP zu Beginn der Reaktion bindet. Domäne A_C wird in vielen ATP-abhängigen DNA-Ligasen gefunden und ist wahrscheinlich ebenfalls Teil der katalytischen Region.⁷⁰ Im C-terminalen Teil des Proteins befinden sich zwei BRCT-Domänen (BRCA carboxy-terminal-related domain). Die Funktion dieser Domäne in der Ligase IV ist jedoch nicht bekannt. XRCC4, das mit der Ligase IV einen Komplex bildet, bindet nicht, wie zunächst angenommen, an einer dieser Domänen, sondern in einer dazwischen liegenden Region.^{66, 68-70}

Abb. 10 zeigt diese Bindung, wobei die Ligase in Grün dargestellt ist. Abb. aus Quelle.⁶⁹

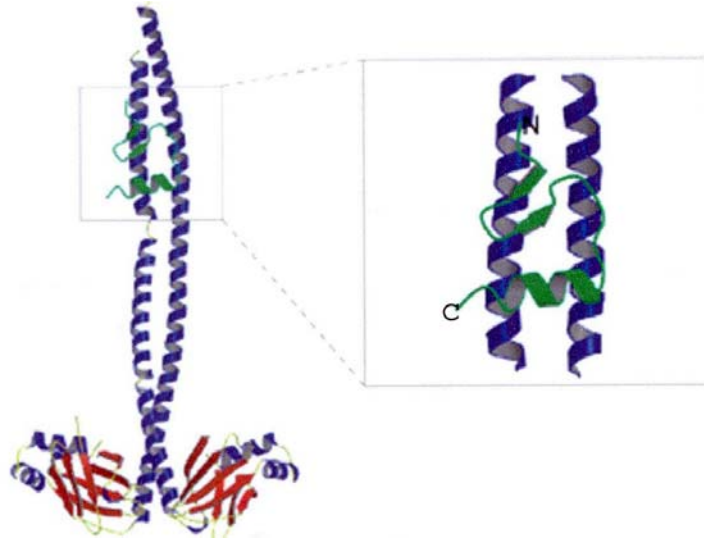


Abb. 10: Bindung der DNA-Ligase IV (grün) an ein XRCC 4-Homodimer⁶⁹

Die Größe der DNA-Ligase IV wurde zunächst mit 844 Aminosäuren (AS) angegeben.⁷¹ Funktionelle Untersuchungen zeigten jedoch, dass diese Version des Proteins biologisch nicht aktiv ist. Eine am N-Terminus um 67 AS längere Variante hingegen ist in DNA-Reparaturassays aktiv, so dass heute eine Länge von 911 AS als sicher angenommen wird.⁶⁶ Dennoch ist die Zählweise der Basen und Aminosäuren bis heute uneinheitlich. Sie folgt in dieser Arbeit grundsätzlich der Annahme eines 911 AS langen Proteins.

Die Funktion dieses N-terminalen Abschnittes, der vor der bekannten zentralen katalytischen Domäne liegt und dessen Sequenz nicht hoch konserviert ist,⁷² ist nicht sicher bekannt. Es wird angenommen, dass die nichtkatalytischen Regionen menschlicher DNA-Ligasen charakteristische Bereiche enthalten, die die Wechselwirkung mit anderen Proteinen vermitteln und damit die spezifischen zellulären Funktionen des Enzyms steuern.⁷²

Rückschlüsse auf die Funktion anhand von Patienten mit Ligase IV-Syndrom

Die Patienten mit Ligase-IV-Syndrom unterscheiden sich sowohl genotypisch als auch phänotypisch voneinander. Anhand der jeweils vorliegenden Veränderungen der DNA-Sequenz lassen sich weitere Funktionen einzelner Proteinabschnitte bestimmen: So führt die trunkierende Mutation R580X, für die zwei Patienten heterozygot sind, in Abwesenheit von XRCC4 zu einer fehlenden Lokalisation der Ligase im Nukleus. Dies

fürhte zur Identifizierung der AS 623-638 als „Nuclear Localisation Signal“ (NLS), das in der Lage ist, das Protein in den Kern einzuschleusen. Diese Funktion kann jedoch auch durch XRCC4 wahrgenommen werden, mit der die Ligase einen Komplex bildet.⁷³

Bei drei der fünf Ligase IV-Patienten führt die Mutation R814X zum Verlust des größten Teils der zweiten BRCT-Domäne. Obwohl nach bisherigem Kenntnisstand XRCC4 zwischen den beiden BRCT-Domänen bindet, war die XRCC4-Bindung des trunkierten Proteins deutlich verringert.⁷³ Die Tatsache, dass ein Wegfall der AS 801 bis 911 die Bindung an XRCC4 offensichtlich nicht behindert,⁶⁶ legt nahe, dass eine nur teilweise vorhandene zweite BRCT-Domäne die Wechselwirkung zwischen der Ligase und XRCC4 beeinträchtigt.⁷³ Auch die Adenylierung des Proteins wurde durch die Mutation R814X erheblich herabgesetzt. Die enzymatische Aktivität wird auf etwa 10-15% verringert.⁷³

Einer der drei Patienten, die den Austausch R814X haben, weist zusätzlich die Mutation G469E auf. Obwohl dieser Austausch außerhalb der Adenylierungsdomäne liegt, zeigt das veränderte Protein keine nachweisbare Adenylierung und eine erheblich verminderte enzymatische Aktivität. Die Funktion dieser Region ist nicht bekannt, sie ist jedoch zwischen eukaryotischen Domänen hochkonserviert.⁷³