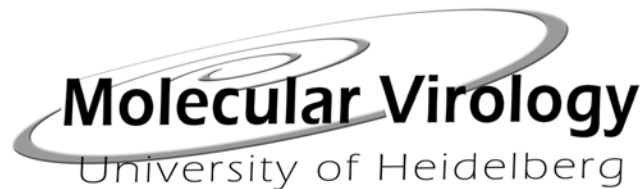


Transformation und Onkogenese



Ralf Bartenschlager

Abteilung Molekulare Virologie, Hygiene Institut

INF 345, 1.OG

<http://molecular-virology.uni-hd.de>

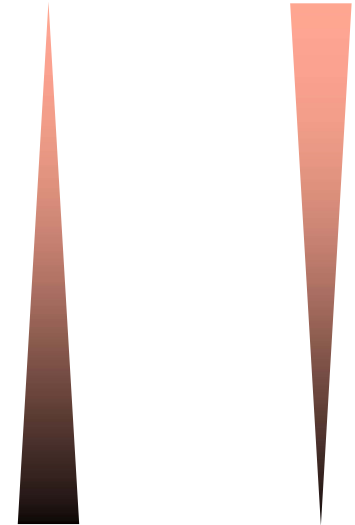
Transformation und Onkogenese

- Tumore eine der Haupttodesursachen weltweit; z.B. 500.000 Erkrankungen/a in den USA
- Bei ca. 20% aller menschl. Tumoren sind Viren wichtiger Kofaktor (80% der Zervixkarzinome)
- Entstehung ist Mehrstufenprozess
 - unbegrenzte Zellteilung (Immortalisierung)
 - begrenzte Zellansammlung (benigner Tumor)
 - unbegrenzte Zellansammlung (maligner Tumor)
 - Invasion des umliegenden Gewebes
 - Dissemination

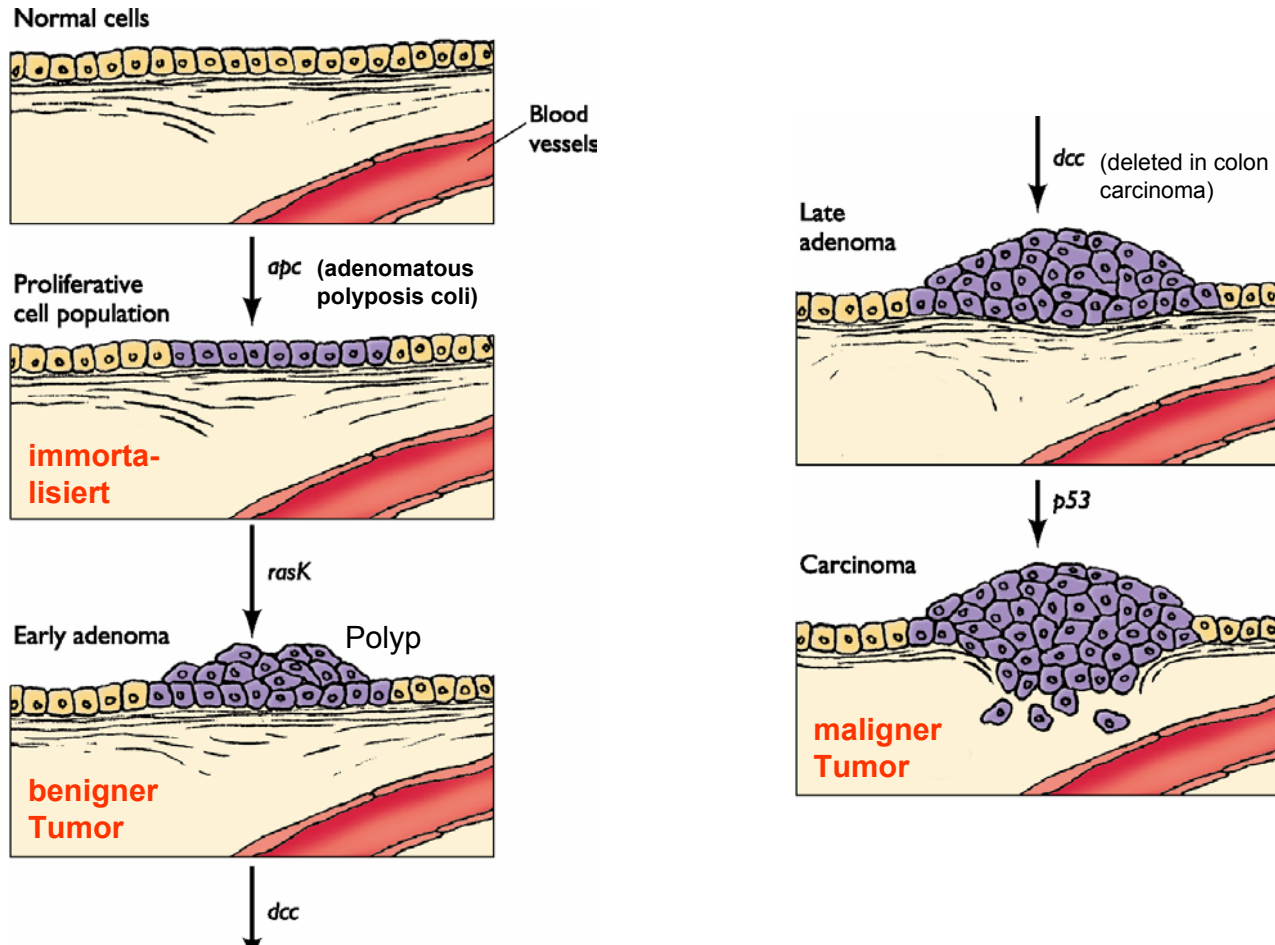
Metastasierung

**Mutationen
in zellulären
Genen**

**Virale
Infektionen**



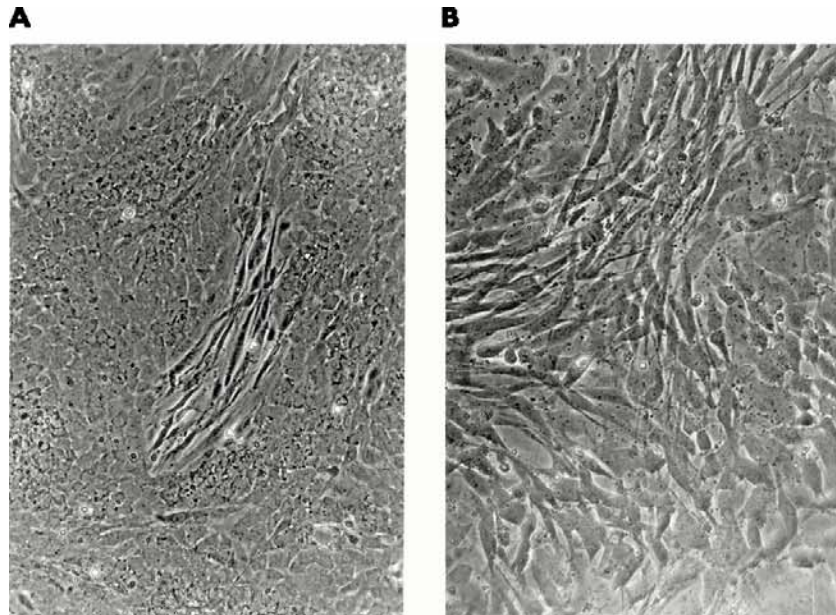
Entstehung eines Kolonkarzinoms



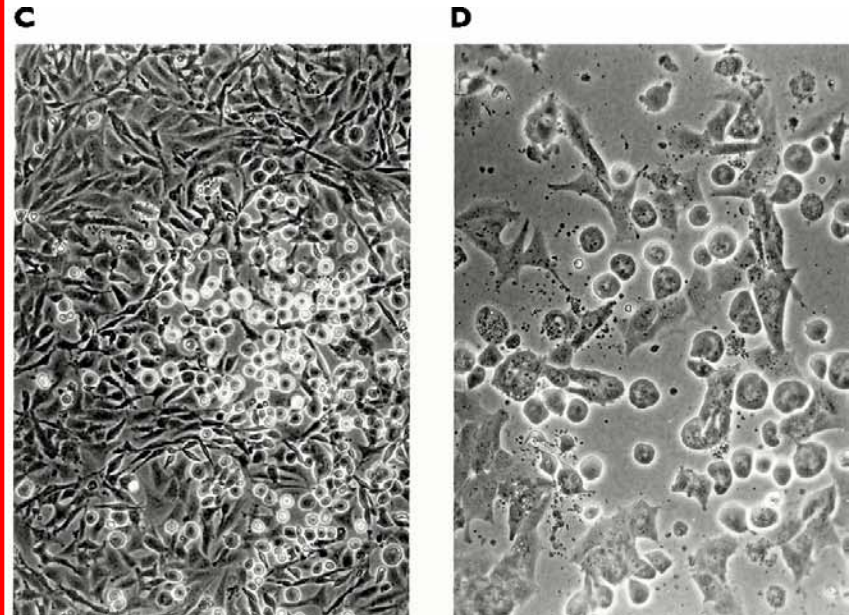
Unterschied normale vs. transformierte Zelle

Normale Zelle	Transformierte Zelle
begrenzte Anzahl von Zellteilungen (ca. 50)	unbegrenztes Zellwachstum (Immortalisierung)
Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren	reduzierte Abhängigkeit/Verlust der Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren
Kontakthemmung	Verlust der Kontakthemmung (Foci)
Wachstum auf festen Oberflächen	Wachstum in Weichagar
keine Tumorbildung im Versuchstier	tumorigen im Versuchstier
keine morpholog. und physiolog. Änderungen	morpholog. u. physiolog. Veränderungen (z.B. Abrundung, Streßfasern, Metabolismus)

Entstehung von Foci nach Infektion aviärer Zellen mit zwei verschiedenen Stämmen des Rous Sarcoma Virus

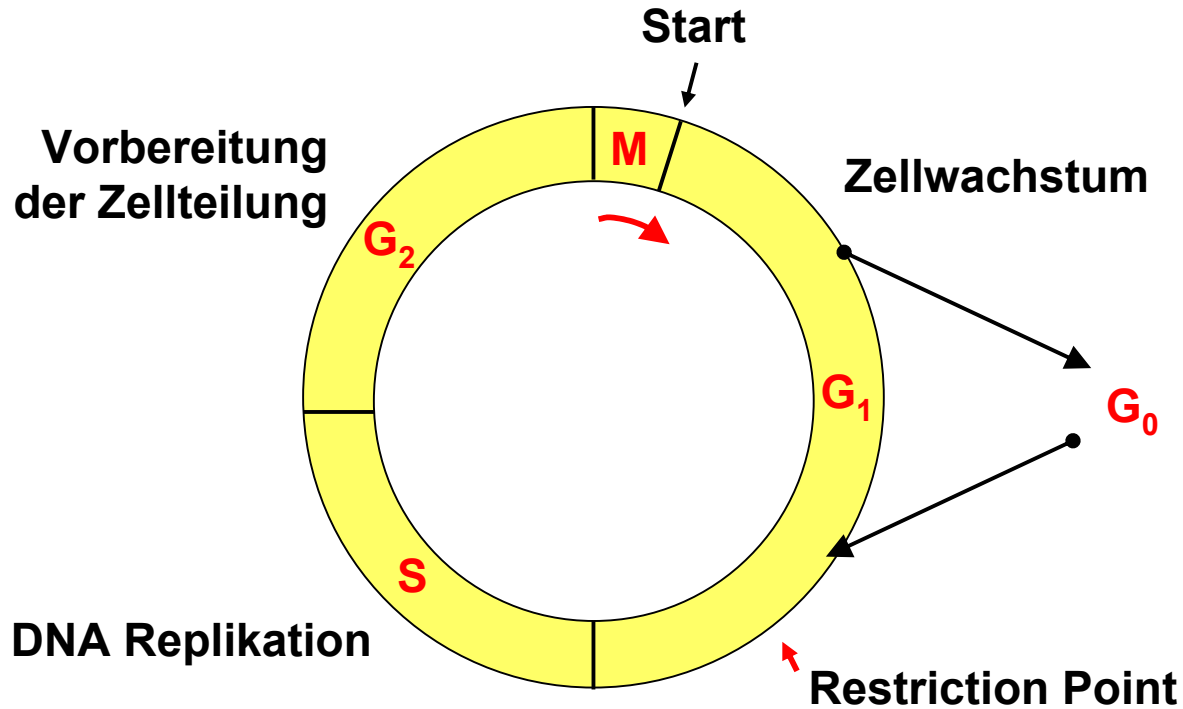


Stamm 1



Stamm 2

Phasen des Zellzyklus



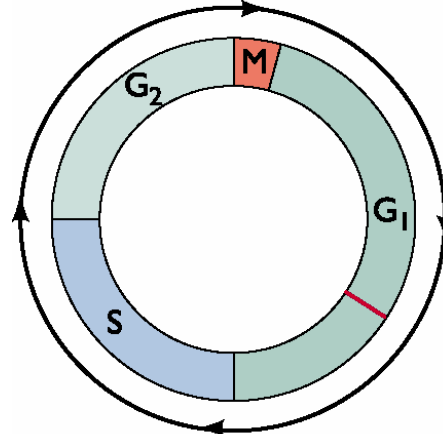
Dauer: Ca. 24 h (Zellkultur)
10 - 60 Min (X. laevis Embryonen)
Jahre (Zellen in G₀)

Positive und negative Regulation des Zellzyklus

Retroviren → (c-src, c-myc, c-ras)

Proto-oncogenes

Go



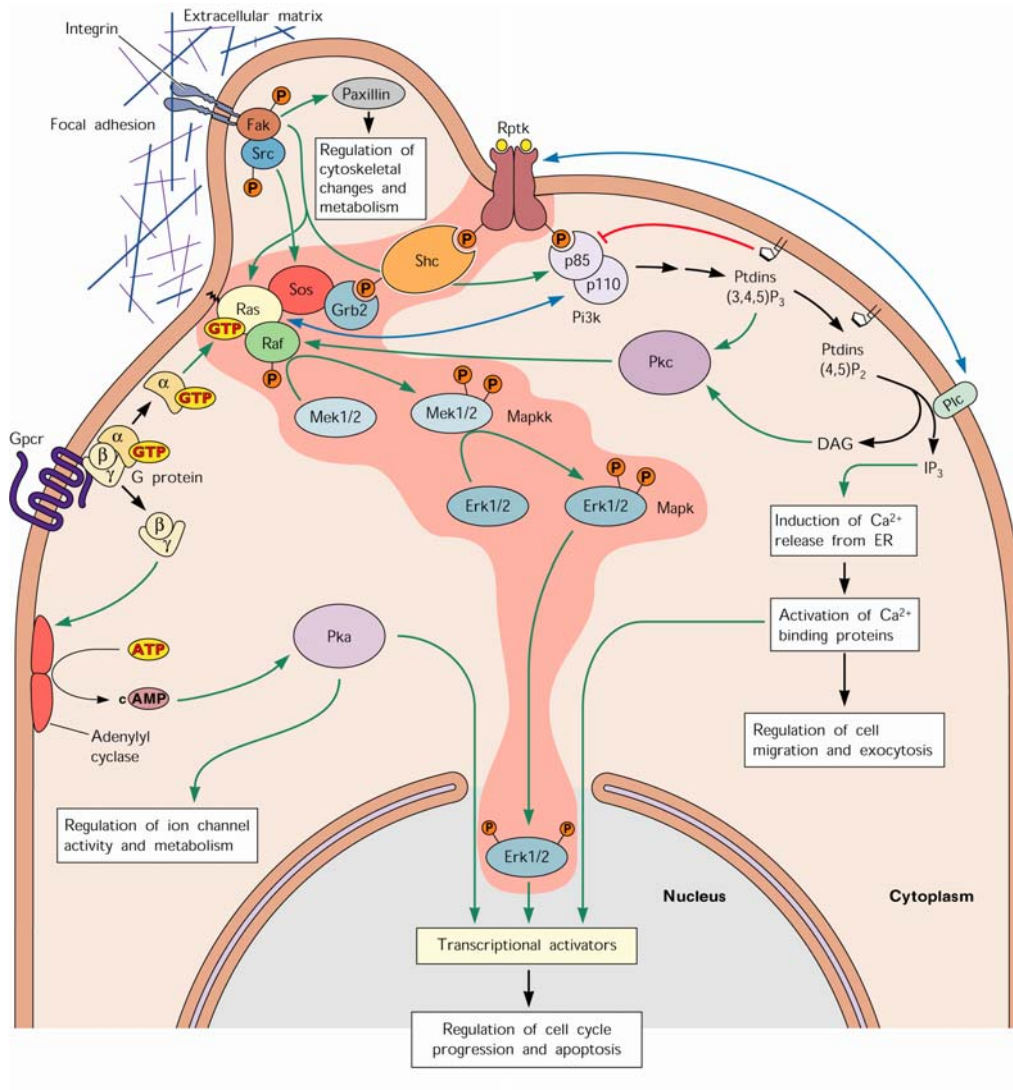
Stop



Tumor suppressor genes

DNA Tumoviren → (Rb, p53)

Wichtige zelluläre Signaltransduktionswege: Aktivierung der Map-Kinase Kaskade



Tyr-Kinase Rezeptoren
z.B. EGF, PDGF

Kinasen

- Src
- Raf
- Fak (focal adhesion)

G-Proteine

- Ras

Entdeckung onkogener Viren

Ellermann und Bang (1908): Leukämie bei Vögeln übertragbar durch filtriertes Serum

P. Rous (1911): Übertragung von Sarkomen auf Hühner durch zellfreie Extrakte (Rous Sarkoma Virus)

R. Shope (1933): Entdeckung der Papillomaviren

Epstein, Achong & Barr (1964): Entdeckung des Epstein-Barr-Virus in Zellen des Burkitt Lymphoms

Gallo, Miyoshi & Hinuma (1980/82): Entdeckung des Erregers der adulten T-Zell Leukämie (HTLV-1)

Chang u. Mitarbeiter (1994): Entdeckung des humanen Herpesvirus Typ 8 in Zellen des Kaposi Sarkoms

Eigenschaften virus-assoziiierter Tumore

- Transformation ist zumeist Ergebnis der Virusinfektion
- Integration von zumindest Teilen des Virusgenoms ins Wirtszellgenom
- Transformation ist das Ergebnis der Expression von Virusgenprodukten oder der Integration
- Zumeist keine infektiösen Nachkommenviren von der Tumorzelle
- Mechanismen der Transformation durch virale Proteine oft ähnlich

Viren, die Tumore erzeugen können

Table 16.2 Oncogenic viruses and cancer

Families	Associated cancers
RNA viruses	
→	
→	
DNA viruses	
→	
→	
→	

ca. 20% aller menschlichen Tumoren sind mit einem von 6 Viren assoziiert

Onkogene Retroviren

Eigenschaft Charakteristik	Transduzierende Viren	Nichttransduzierende Viren	Nichttransduzierende Viren mit langer Latenzzeit
Effizienz der Tumorinduktion	hoch (ca. 100%)	hoch bis mittel	sehr gering (< 5%)
Latenzzeit	kurz (Tage)	intermediär (Wochen, Monate)	lang (Monate, Jahre)
Erreger	Rekombinantes Viren, zumeist defekt	intaktes Virus, replikationskompetent	intaktes Virus, replikationskompetent
Onkogenes Element	zell-abgeleitetes Onkogen, transduziert in Zielzelle	Aktivierung eines zellulären Onkogens durch Provirus	virus-kodiertes, regulatorisches Protein, das die virale Transkription kontrolliert
Mechanismus	onkogene Transduktion	cis-aktives Provirus	viraler Transaktivator?
Transformation in Zellkultur	ja	nein	nein

Genomkarten transduzierender Retroviren von Vögeln und Säugetieren

Avian transducing retroviruses



Avian leukosis virus

The diagram shows a horizontal bar representing the genome of the Avian leukosis virus. The bar is divided into five colored segments: a small light blue segment on the left, followed by a light orange segment, a medium blue segment, a medium brown segment, and a small light blue segment on the right that ends in a pointed arrowhead. The entire bar is enclosed in a red rectangular box.

Mammalian transducing retroviruses

Table 16.7 Functional classes of oncogenes transduced by retrovirus^a

Transduced oncogene	Viral oncoprotein ^b	Function of cellular homolog
Growth factor		
<i>sis</i>	p28 ^{env-sis}	Platelet-derived growth factor (Pdgf)
Tyrosine kinase growth factor receptors		
<i>erbB</i>	gp65 ^{erbB}	Epithelial growth factor (Egf) receptor
<i>fms</i>	gp180 ^{gag-fms}	Colony-stimulating factor 1 (Csf-1) receptor
<i>sea</i>	gp160 ^{env-sea}	Receptor; ligand unknown
<i>kit</i>	gp80 ^{gag-kit}	Hematopoietic receptor; product of the mouse W locus
<i>ros</i>	p68 ^{gag-ros}	Receptor, ligand unknown
<i>mpl</i>	p31 ^{env-mpl}	Member of the hematopoietin receptor family
<i>eyk</i>	gp37 ^{eyk}	Receptor, ligand unknown
Hormone receptor		
<i>erbA</i>	p75 ^{gag-erbA}	Thyroid hormone receptor
G proteins		
H- <i>ras</i>	p21 ^{ras}	GTPase
K- <i>ras</i>	p21 ^{ras}	GTPase
Adapter protein		
<i>crk</i>	p47 ^{gag-crk}	Signal transduction
Nonreceptor tyrosine kinases		
<i>src</i>	pp60 ^{src}	Signal transduction
<i>abl</i>	p460 ^{gag-abl}	Signal transduction
<i>fps^c</i>	p130 ^{gag-fps} , p105 ^{gag-fps}	Signal transduction
<i>fes^c</i>	p85 ^{gag-fes}	Signal transduction
<i>fgr</i>	p70 ^{gag-actin-fgr}	Signal transduction
<i>yes</i>	p90 ^{gag-yes} , p80 ^{gag-yes}	Signal transduction
Serine/threonine kinases		
<i>mos</i>	p37 ^{env-mos}	Required for germ cell maturation
<i>raf^d</i>	p75 ^{gag-raf}	Signal transduction
<i>mil^d</i>	p100 ^{gag-mil}	Signal transduction
<i>akt</i>	p86 ^{gag-akt}	Signal transduction
Nuclear proteins		
<i>jun</i>	p65 ^{gag-jun}	Transcriptional regulator (Ap-1 complex)
<i>fos</i>	p55 ^{fos}	Transcriptional regulator (Ap-1 complex)
<i>myc</i>	p100 ^{gag-myc} , p90 ^{gag-myc} , p200 ^{gag-pol-myc} , p59 ^{gag-myc}	Unknown; possibly transcriptional regulator
<i>myb</i>	p45 ^{myb} , p135 ^{gag-myb-ets}	Transcriptional regulator
<i>ets</i>	p135 ^{gag-myb-ets}	Transcriptional regulator
<i>rel</i>	p64 ^{rel}	Transcriptional regulator
<i>maf</i>	p100 ^{gag-maf}	Transcriptional regulator
<i>ski</i>	p110 ^{gag-ski-pol}	Transcriptional regulator
<i>qin</i>	p90 ^{gag-qin}	Transcriptional regulator of the forkhead/Hnk-3 family

Prinzipien der retroviral transduzierten Onkogene

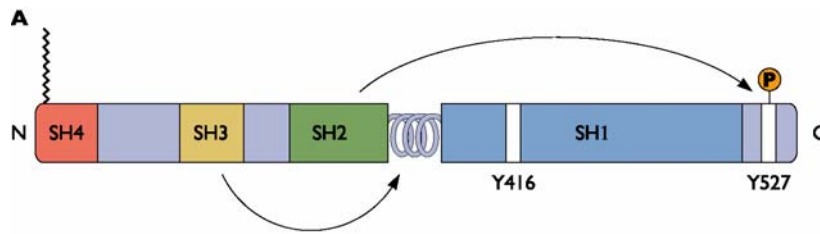
- konstitutive Aktivierung, bedingt durch spez. Mutationen (häufig)
- zeitlich deregulierte Expression der Onkogene (selten)
- Überexpression der Onkogene (selten)

Die src-Kinase

- v-src: erstes retrovirales Protein mit transformierender Eigenschaft

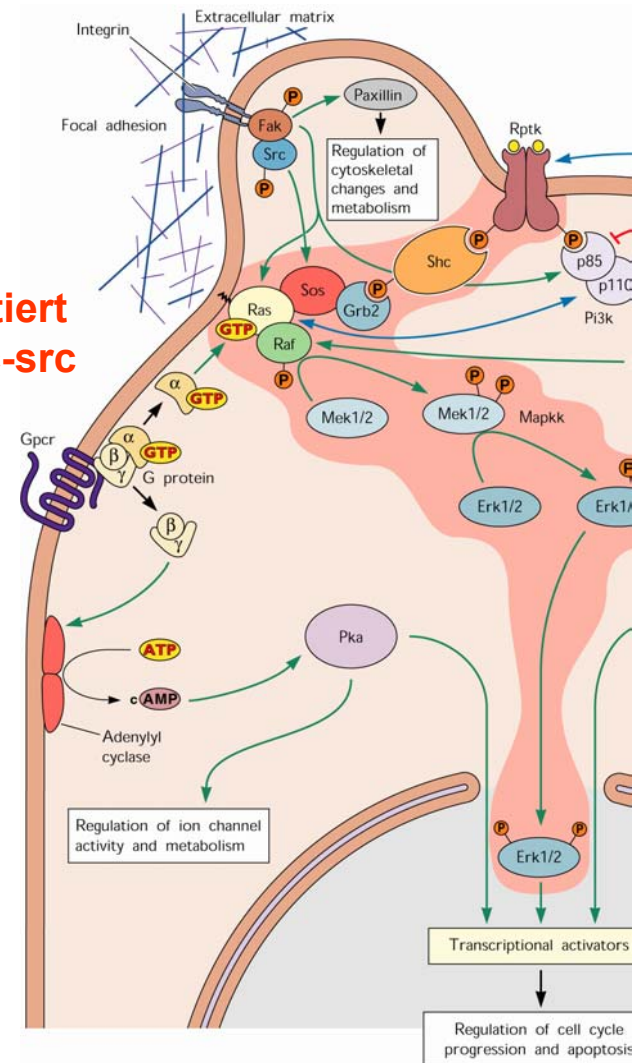
→ pp60^{v-src}

- zytoplasmatische Tyrosinkinase (keine Rezeptorfunktion)
- Reguliert mittelbar die Aktivität von raf und Fa-Kinase (Zytoskelett)
- 4 funktionale Domänen, die notwendig für Transformation
- Regulation der Aktivität durch Phosphorylierung
- Deletion am C-terminus führt zu Verlust der Autoinhibition



c-src und v-src

deletiert
bei c-src

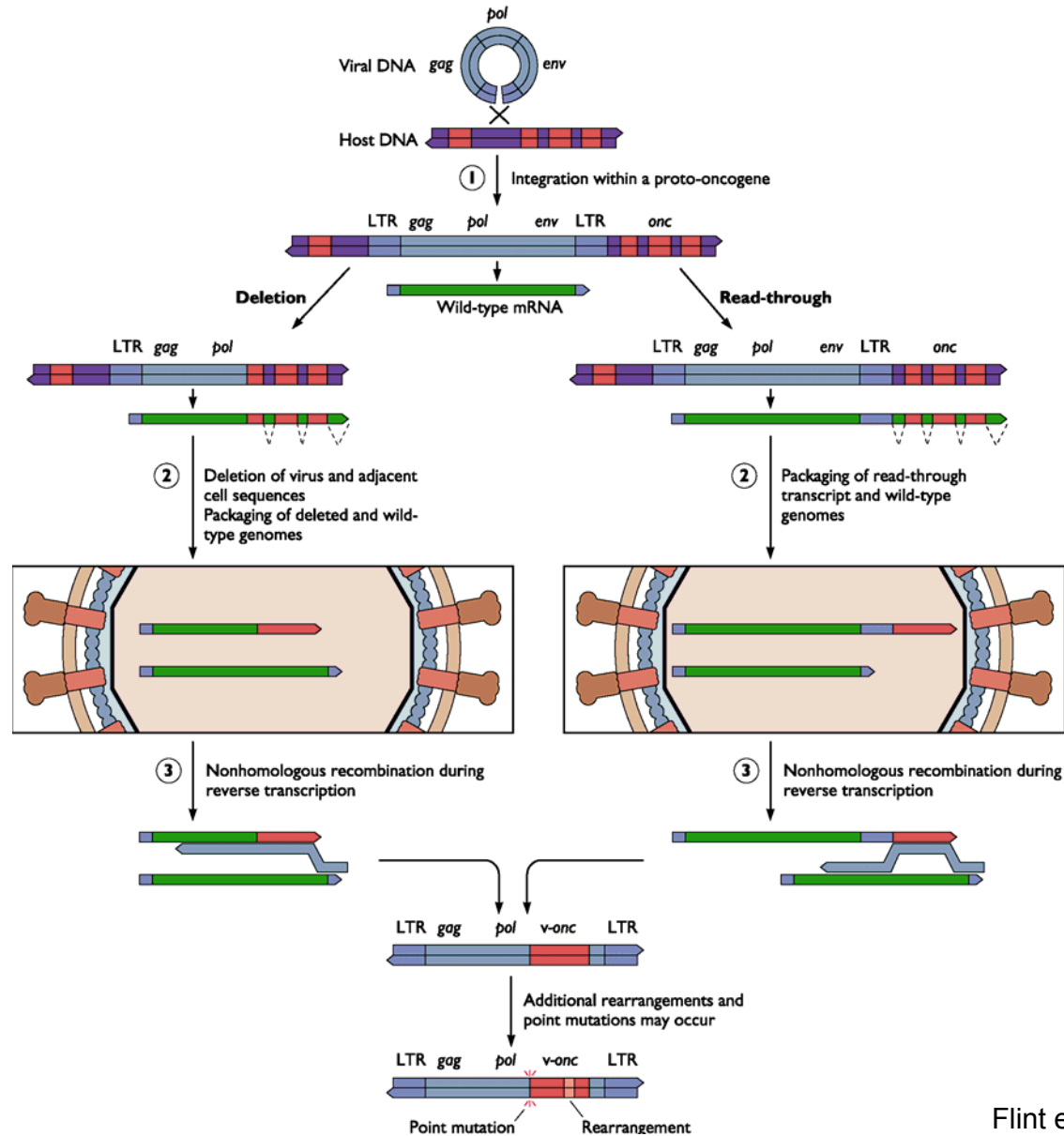


V-myc: zeitlich deregulierte Expression



- Strikte Expressionskontrolle, nur in kurzer Phase von G_1
- Keine Synthese in G_0 (Map-Kinase-abhängige Expression)
- *myc* steigert Transkription vieler zellulärer Gene, u.a. CyclinD (G_1 -CdK), E2f
 - ↳ Eintritt in Zellzyklus
- Transformation durch zeitlich unkontrollierte Expression (z.B. AMV MH2)

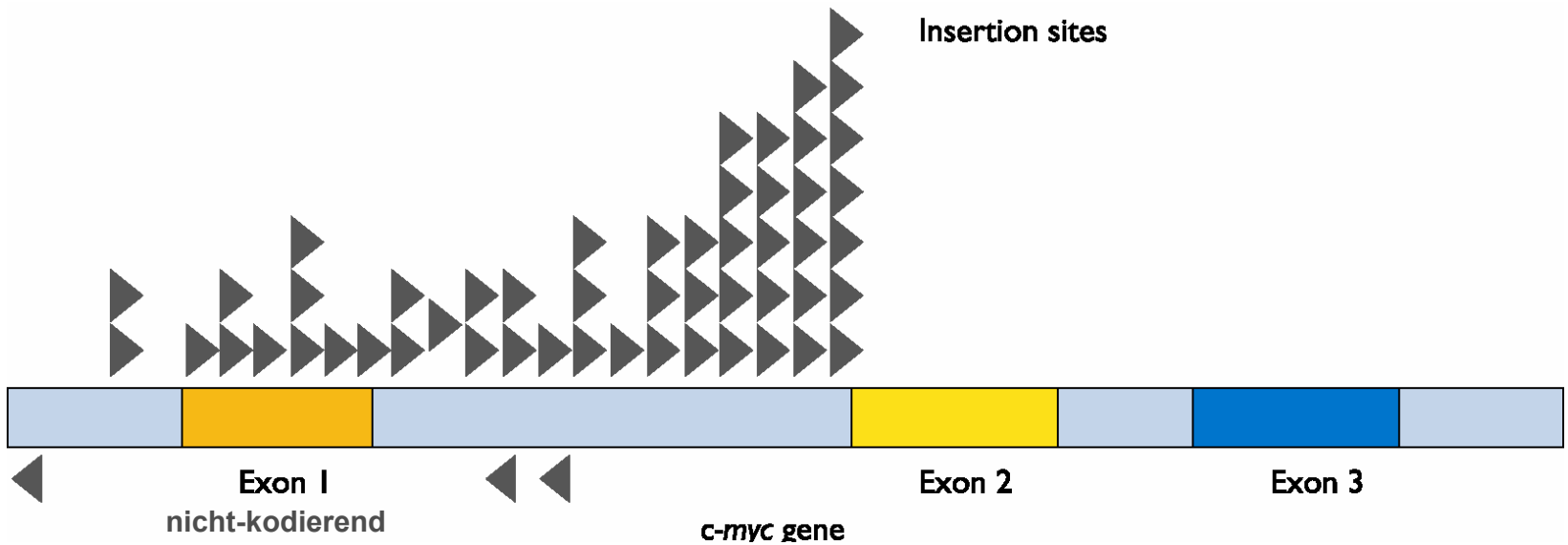
Entstehung transduzierender Retroviren



Insertionsbedingte Aktivierung von c-onc durch Retroviren

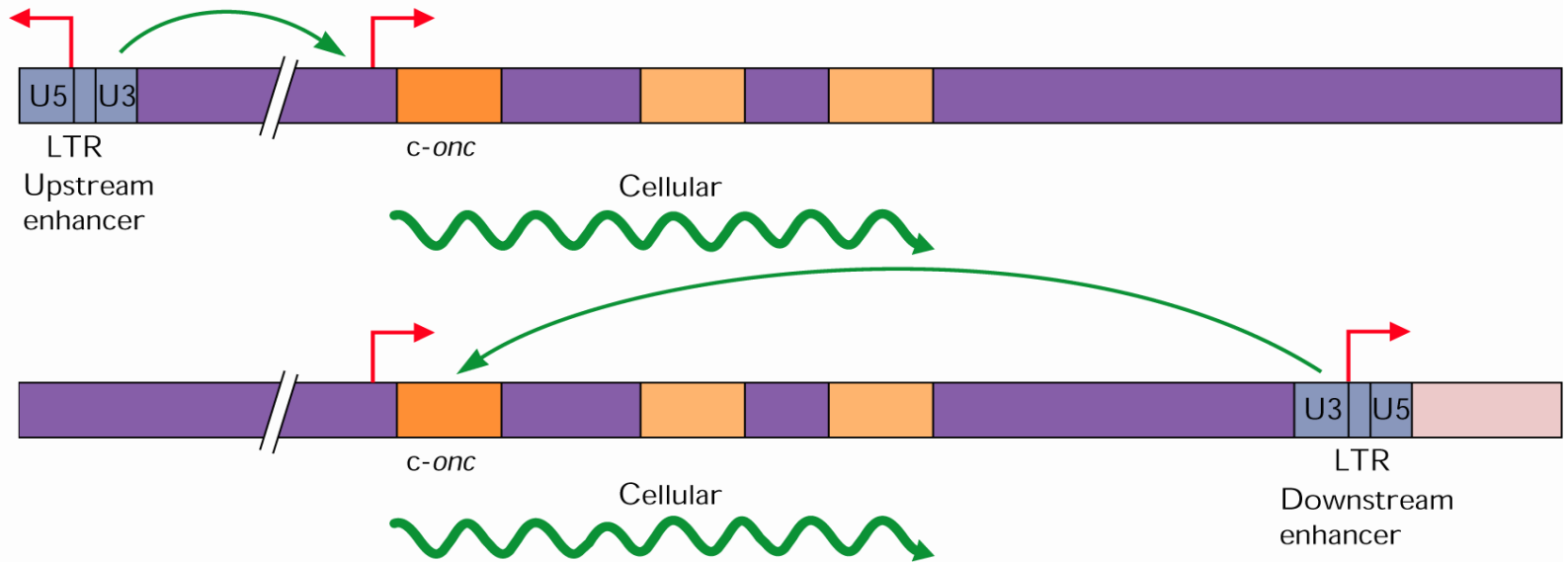
- **keine Transduktion von v-onc**
- **Insertion von Promotor oder Enhancer Element**
- **Inaktivierung eines zellulären Gens**
- **monoklonaler Tumor**

Insertionsvermittelte Aktivierung von c-myc bei ALVs

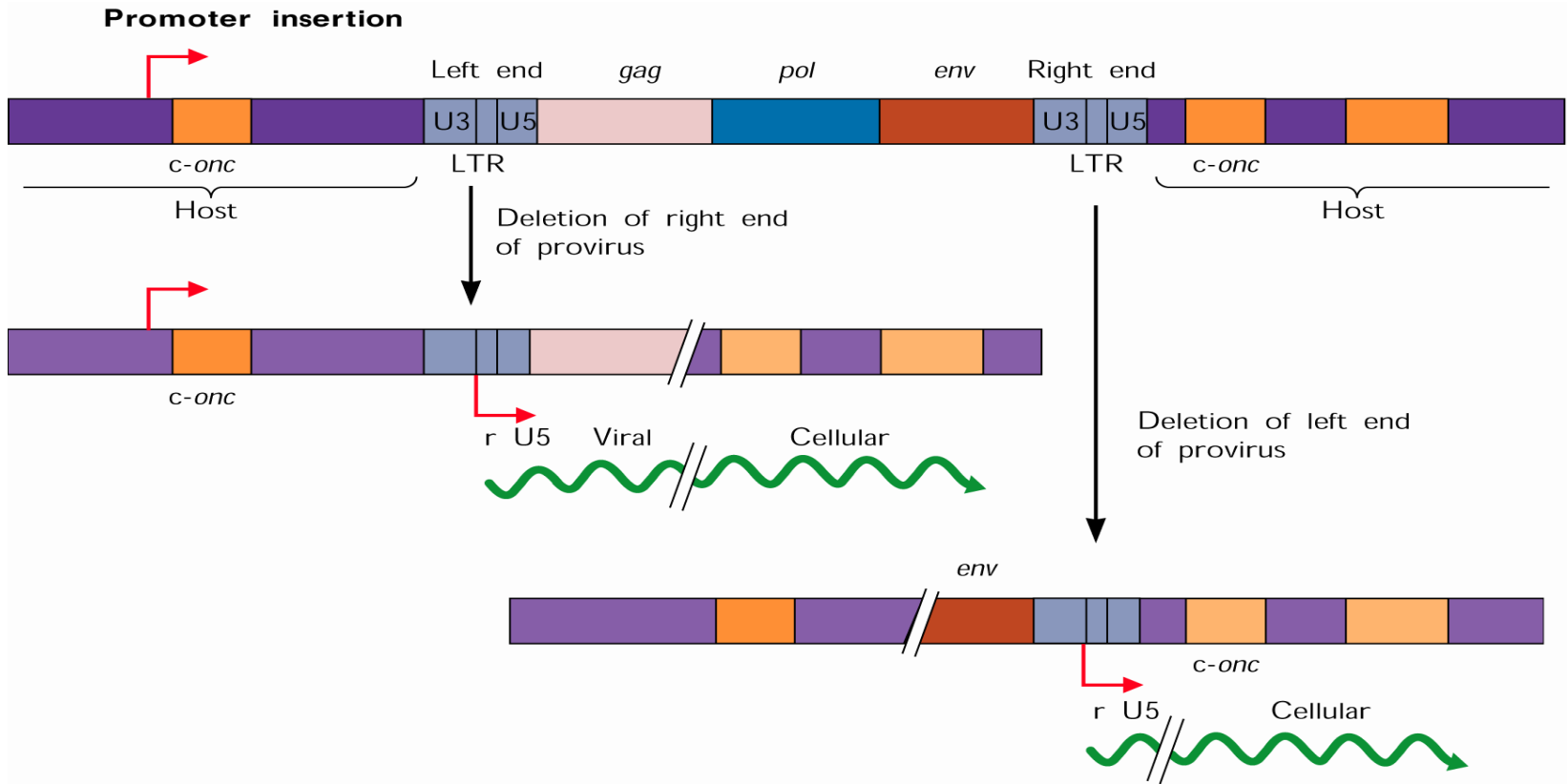


Insertionsbedingte Aktivierung von c-onc durch Retroviren

Enhancer insertion

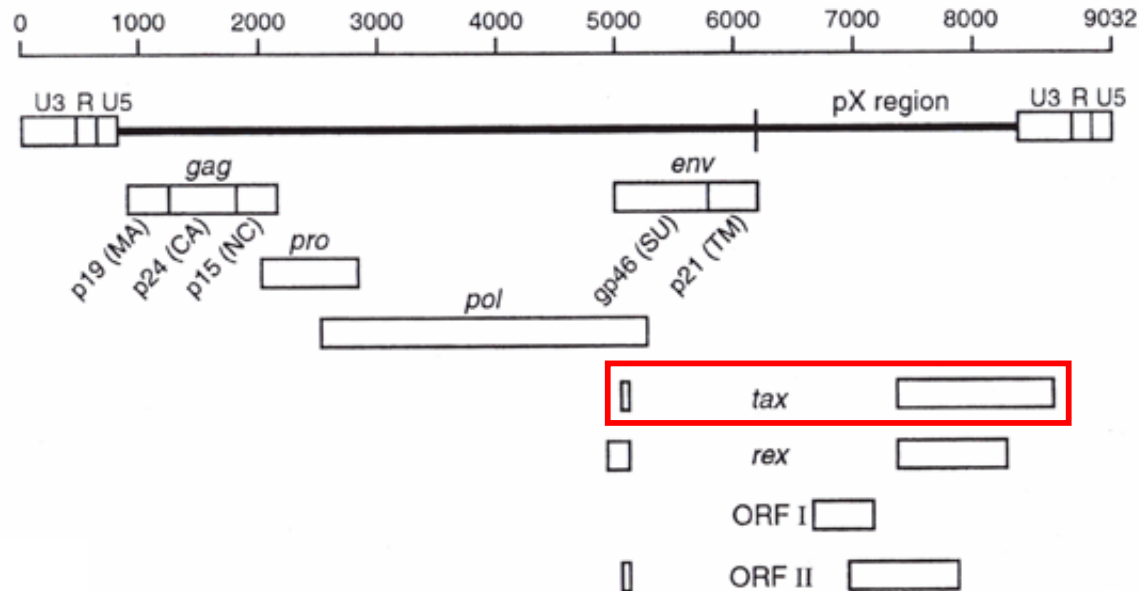


Insertionsbedingte Aktivierung von c-onc durch Retroviren



Nicht-transduzierende Retroviren mit langer Latenzzeit

- Bsp.: HTLV-1 → adulte T-Zellleukämie (ATL)
- erstmals 1977 in Japan beschrieben
- Virusisolation aus Leukämiezellen 1980
- komplexes Retrovirus mit viralen, regulatorischen Proteinen



ATL und HTLV-1

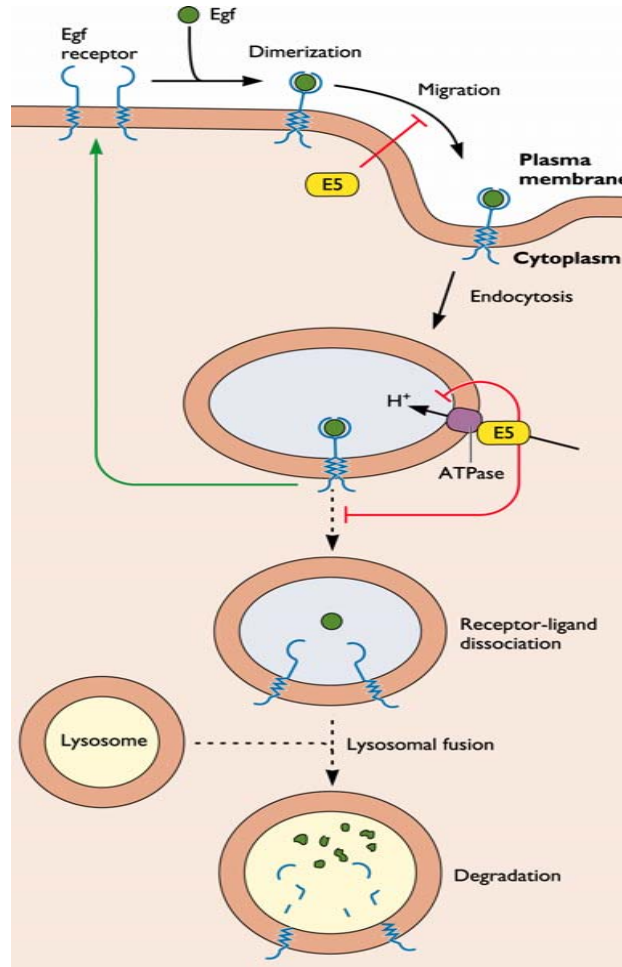
- bei allen ATL-Patienten Integrat, aber kein spez. Integrationsort
- monoklonaler Tumor
- kein v-onc
- Tax: Transkriptionsaktivator; steigert Transkription vom 5' LTR Promotor
→ aktiviert auch versch. zelluläre Gene
- lange Latenz
- kausal nicht ausreichend, aber wichtiger Kofaktor

Transformation bei DNA Viren

- Transformation und produktive Replikation schließen sich gegenseitig aus
 - ↳ Zelle in S-Phase bei abortiver Replikation
- Selten Integration in das Genom der Wirtszelle (Polyomav., Adenov.)
 - ↳ Häufig nur Teile des viralen Genoms erhalten (early Gene)
- Z.T. episomale Persistenz des viralen Genoms (EBV, Papillomav.)
- Transformation durch:
 - ⇒ Beeinflussung der Signaltransduktion
 - ⇒ zelluläre Homologe (bes. große DNA-Viren; keine v-onc)
 - ⇒ direkten Eingriff in Zellzyklus

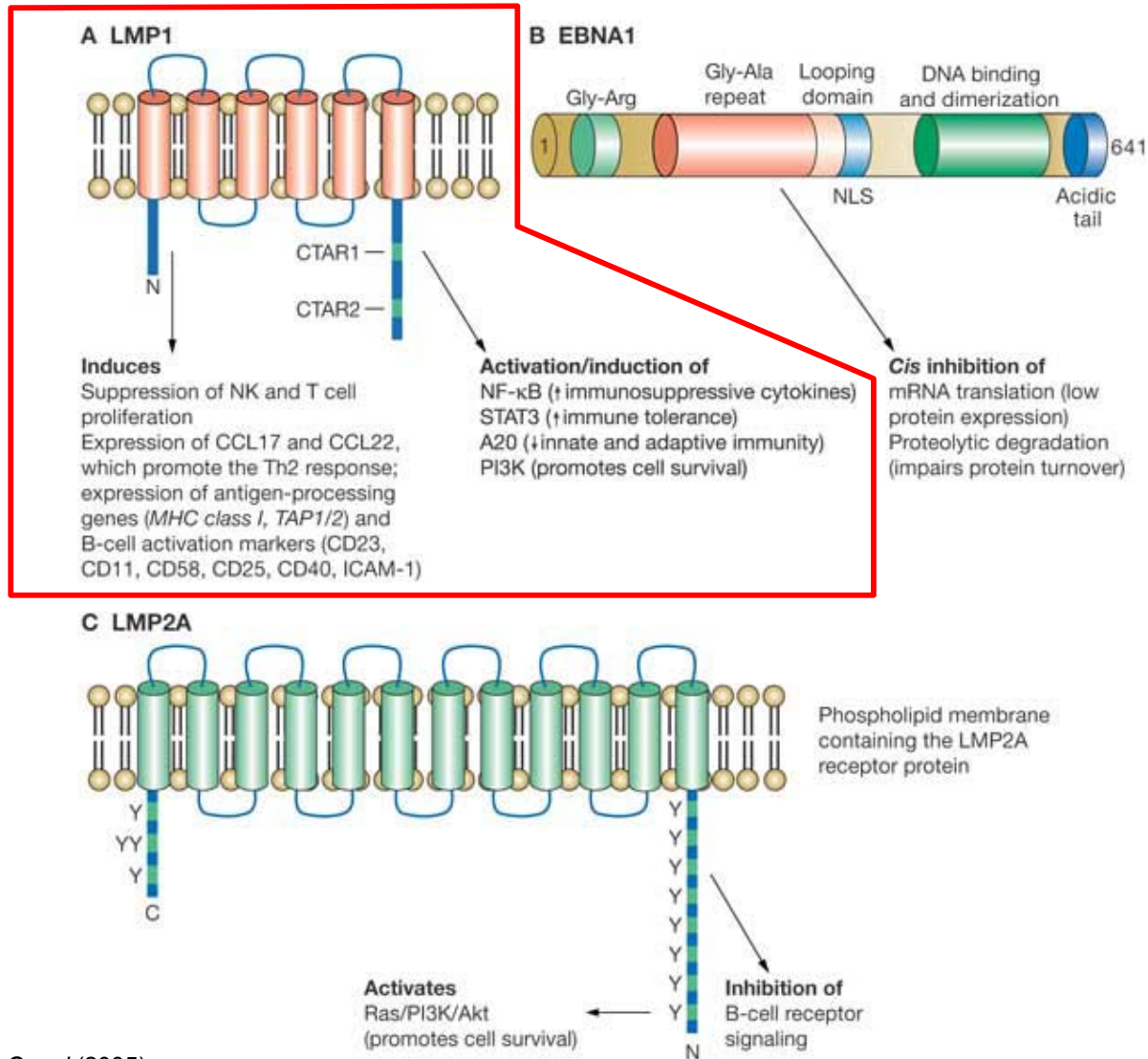
Beeinflussung der Signaltransduktion:

Steigerung der Oberflächenexpression von EGF-Rezeptor durch HPV E5



Komplexität der Tumorentstehung am Beispiel von EBV:

Virale Proteine in EBV-assoziierten Tumoren



Beeinflussung der Signaltransduktion:

Konstitutive Zellaktivierung durch LMP-1 Protein von EBV

LMP-1 = EBV-latent membrane protein-1

CTAR = C-terminale Aktivierungsregion

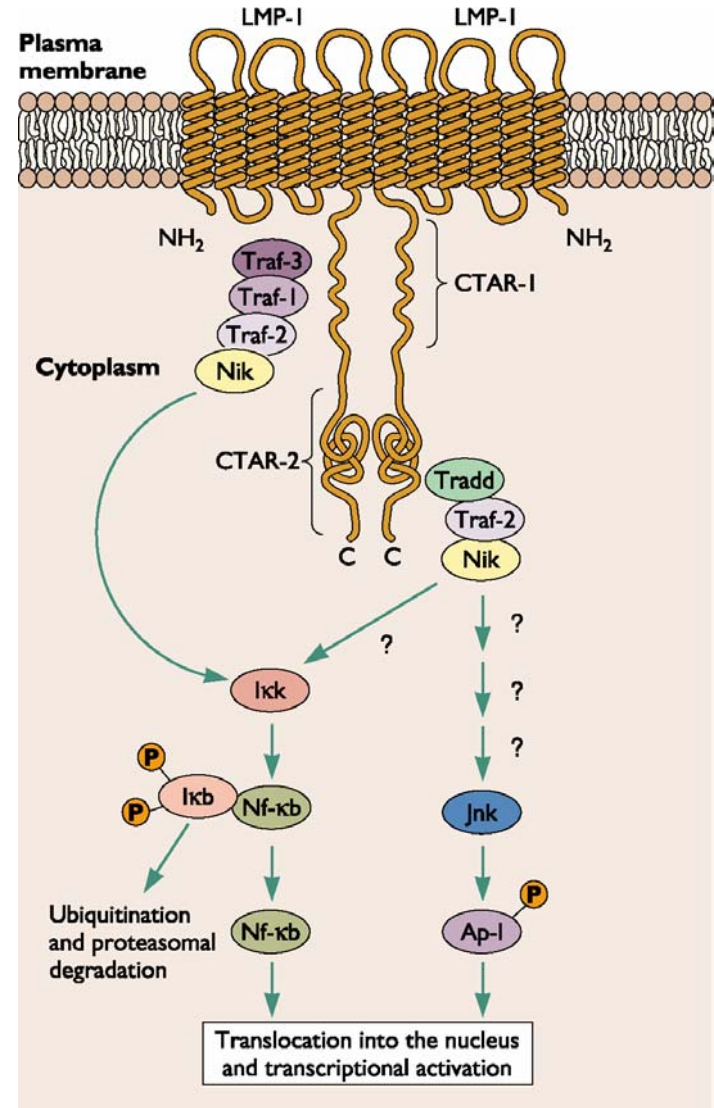
Traf = TNF-Rezeptor-assoziierte Proteine

Nik = NF κ b-induzierende Kinase

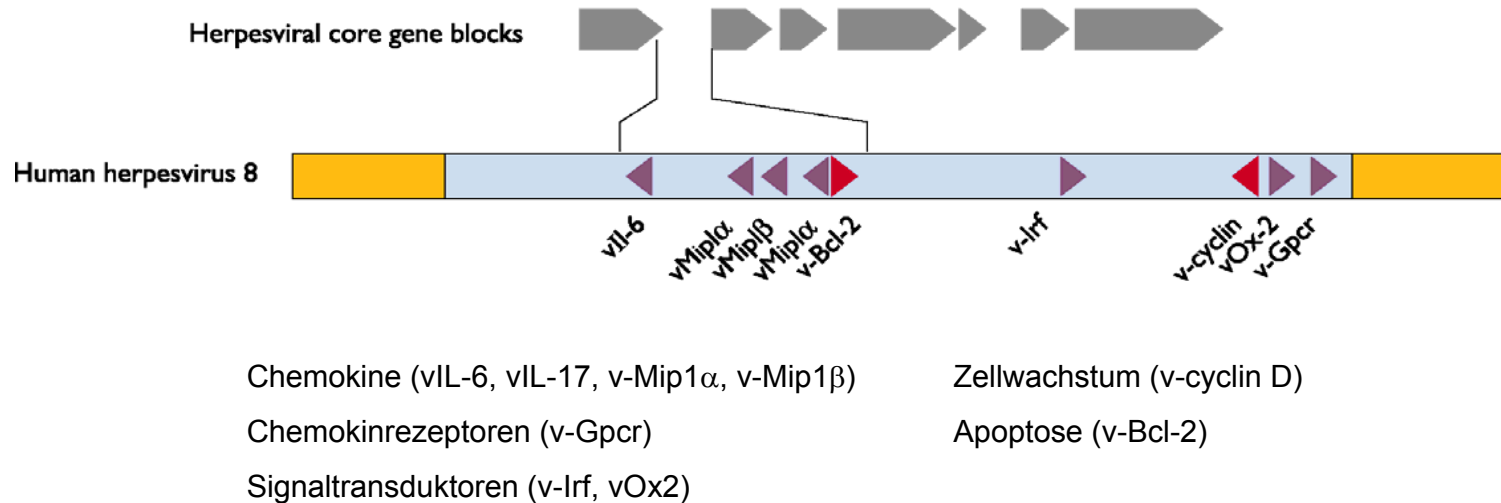
I κ k = I κ b-Kinase

**LMP-1 entspricht
konstitutiv aktivem Rezeptor**

- Hemmung der Differenzierung epithelialer Zellen
- Induktion der Transformation
- Immortalisierung von B-Zellen



Homologe zellulärer Gene in den Genomen einiger Herpesviren



HHV-8 assoziiert mit Kaposi Sarkom (Spindelzelltumor mit ausgeprägter Angiogenese)

v-GPCR: Homolog zu Chemokinrezeptor, der ohne Ligand aktiv

Morphologische Transformation von Maus 3T3-Zellen

→ Sekretion von vaskulärem, endothelalem Wachstumsfaktor (veGF)

Infektion primärer humaner Endothelzellen

→ Immortalisation

→ Spindelzellmorphologie

→ gesteigerte Produktion von veGF

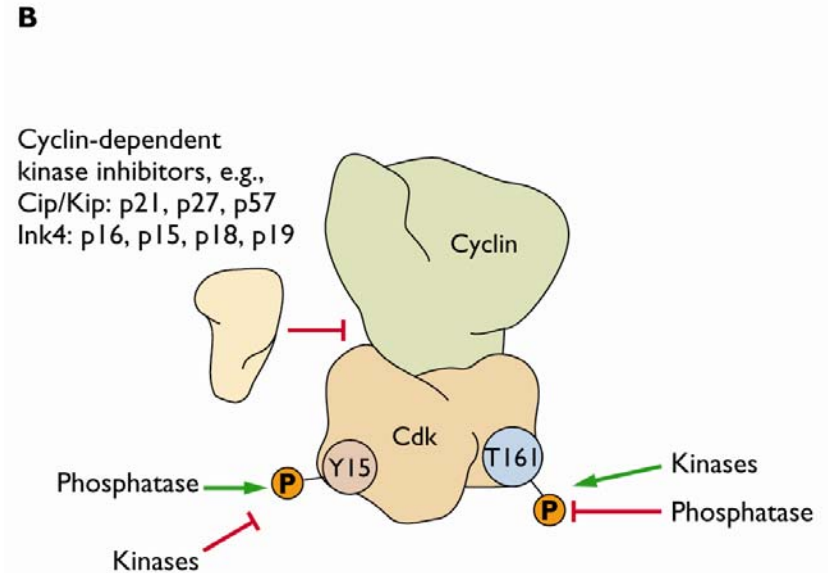
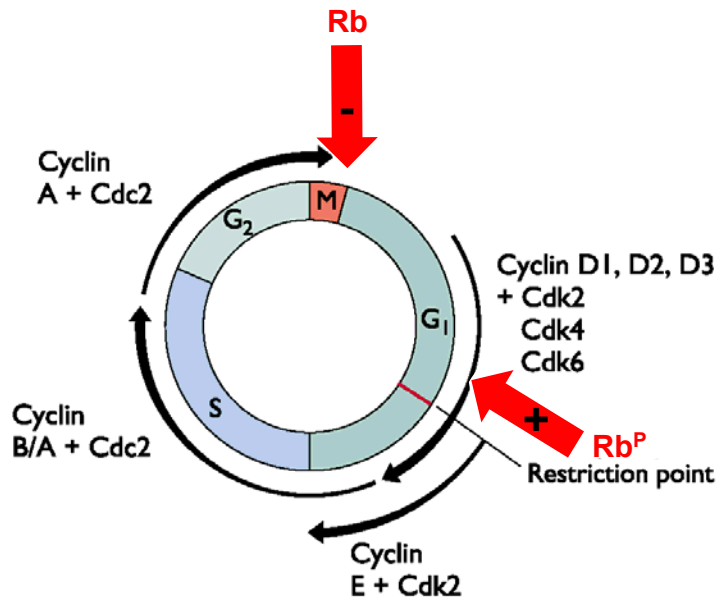
→ Wachstumsstimulation uninfizierter Zellen

Transformation bei DNA Viren

Transformation durch:

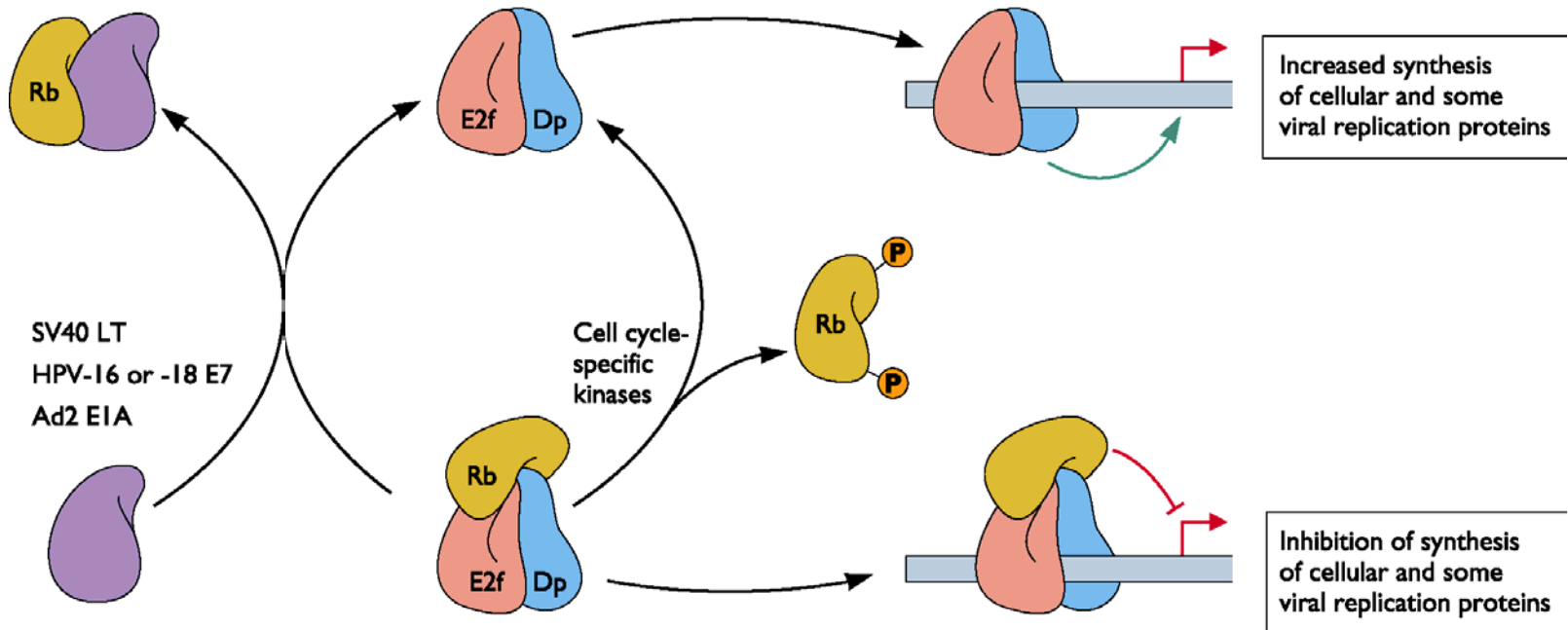
- ⇒ Beeinflussung der Signaltransduktion
- ⇒ zelluläre Homologe (bes. große DNA-Viren; keine v-onc)
- ⇒ **direkten Eingriff in Zellzyklus**

Schalterproteine des Zellzyklus: Retinoblastomprotein



Rb: entdeckt in Retinatumoren
Tumorsuppressor, der Eintritt in die S-Phase reguliert
Phosphorylierung durch CyclinD-abh.Kinase
nukleäres Protein-bindendes Protein

Hemmung der Rb-Funktion durch virale Proteine

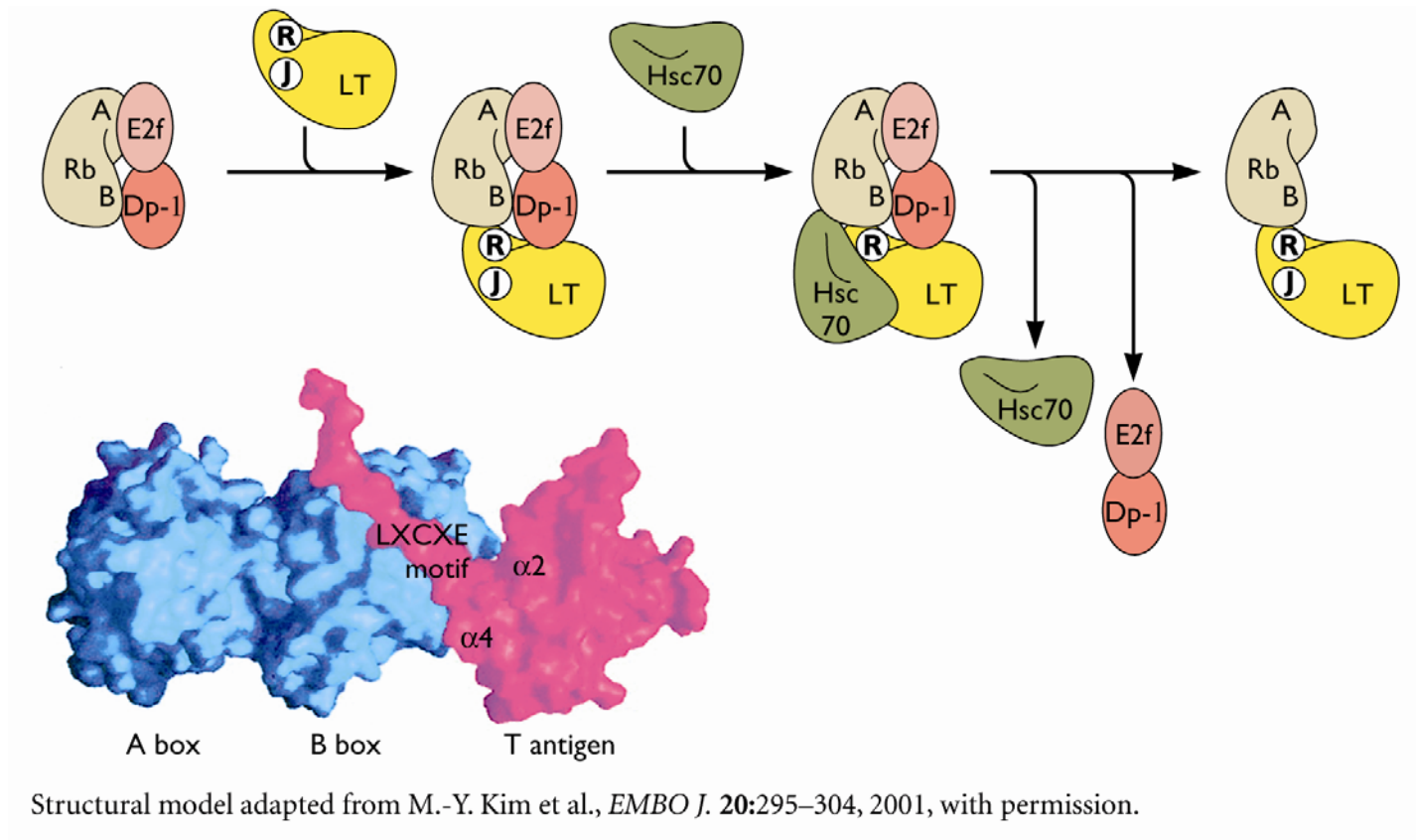


Virale Proteine verdrängen Rb aus Komplex mit E2f

E1A stabilisiert E2f

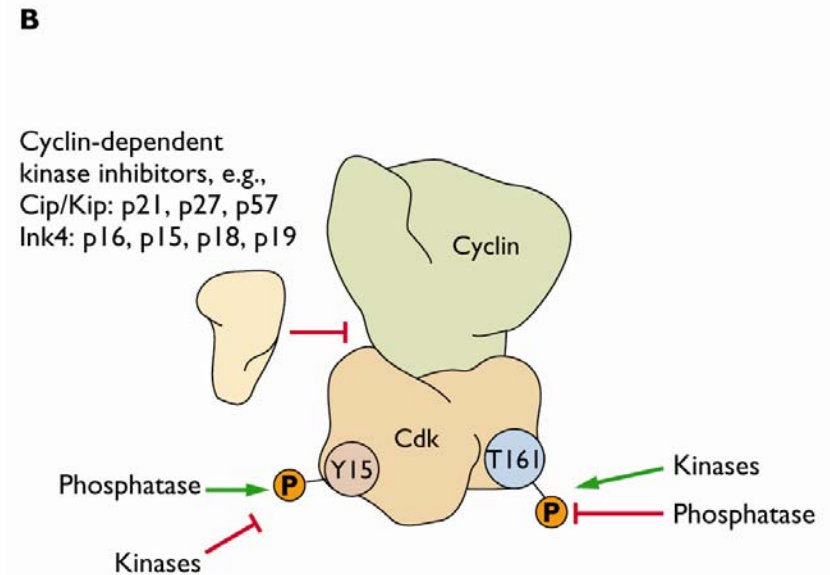
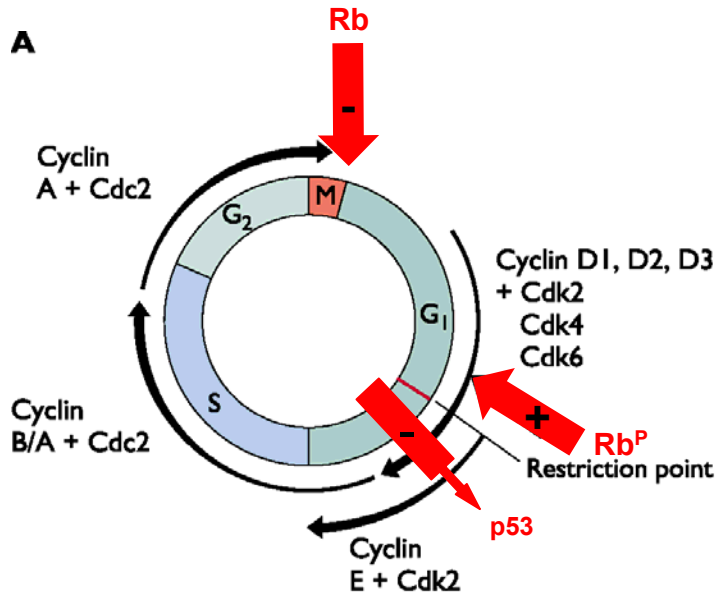
E7 induziert Degradation von Rb

Aktive Dissoziation des Rb-E2F-Komplexes durch SV40 LT



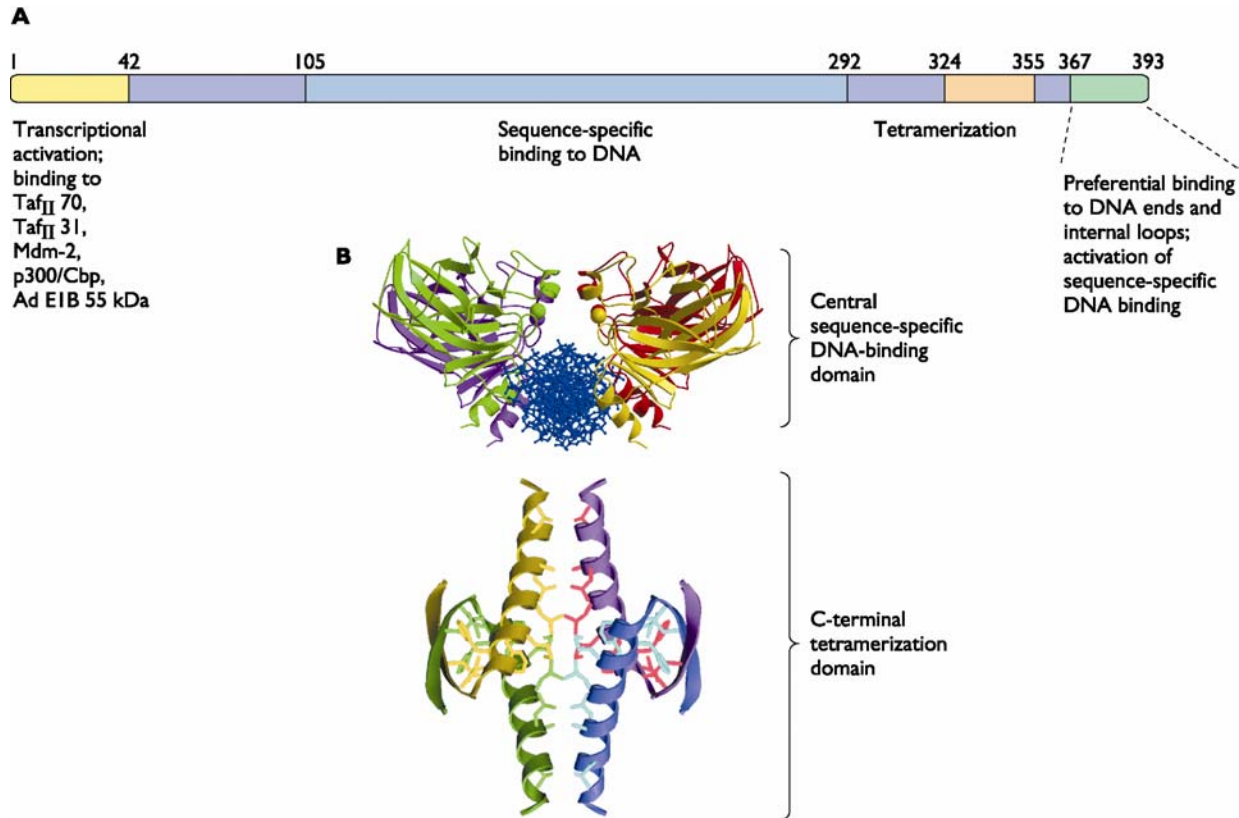
ATP-abhängige, Hsc70-vermittelte Verdrängung des E2f:Dp-1 Heterodimers

Zelluläre Schalterproteine des Zellzyklus:p53



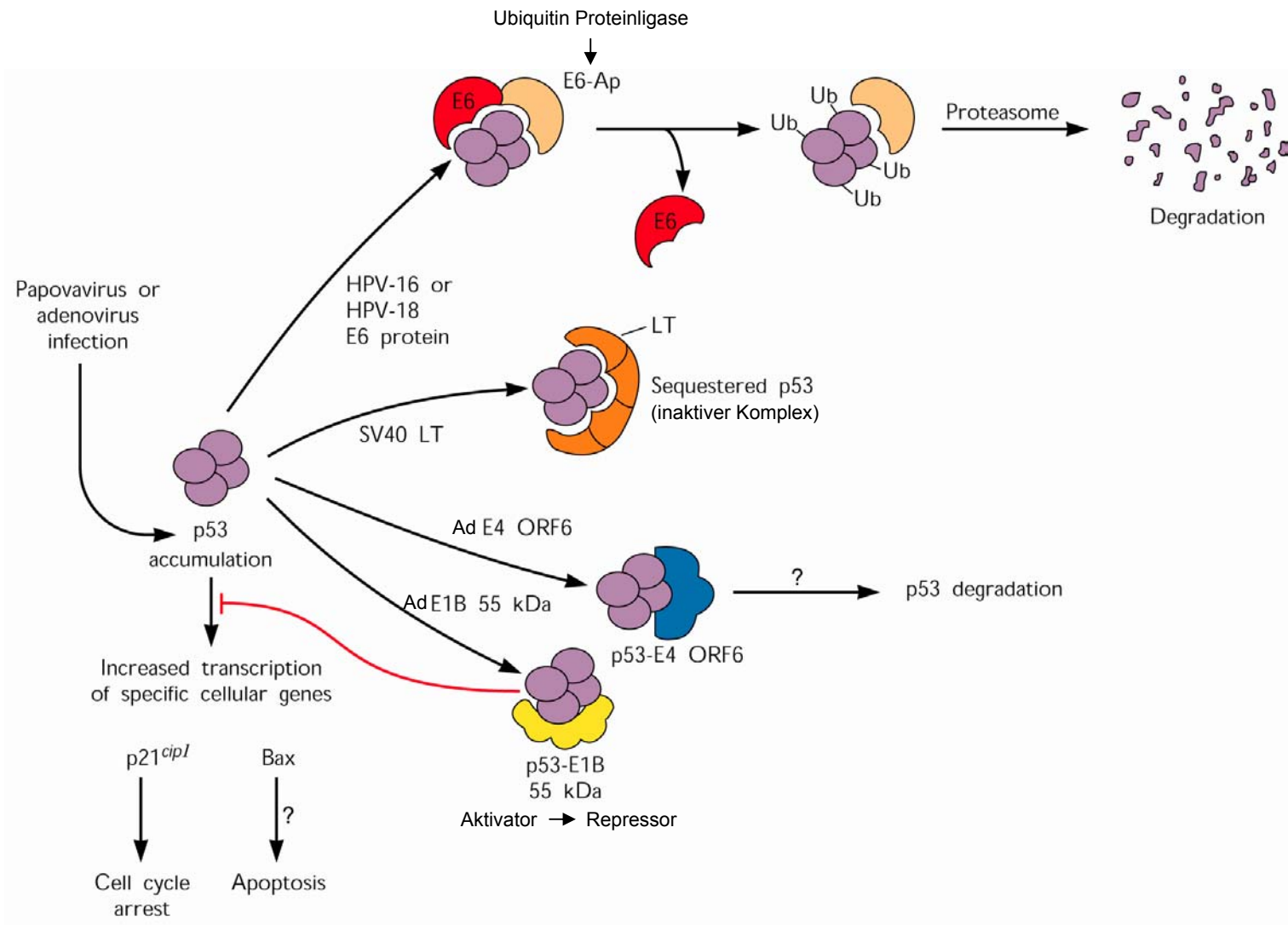
p53: das am häufigsten mutierte Gen in menschl. Tumoren (ca. 65% aller Tumore)
 Zellzyklusregulator in Abhängigkeit von DNA-Schäden oder unkontroll. Eintritt in S-Phase
 reguliert G₁/S arrest (geringe DNA-Schäden)
 Apoptose (,irreparable DNA-Schäden')

Das humane p53 Protein



- DNA-bindendes Protein; Transkriptionsregulator → CdK-Inhibitoren (p21)
- Tetramerisierung für DNA-Bindung essentiell
- [p53] strikt reguliert (gering im Normalzustand, hoch bei DNA-Schäden oder Induktion)
- [p53] reguliert durch Mdm-2 Bindung (Ubiquitin Ligase)
- DNA-Bindung und Transaktivierung durch Modifikationen im C-terminus reguliert (Phos., Acetyl.)

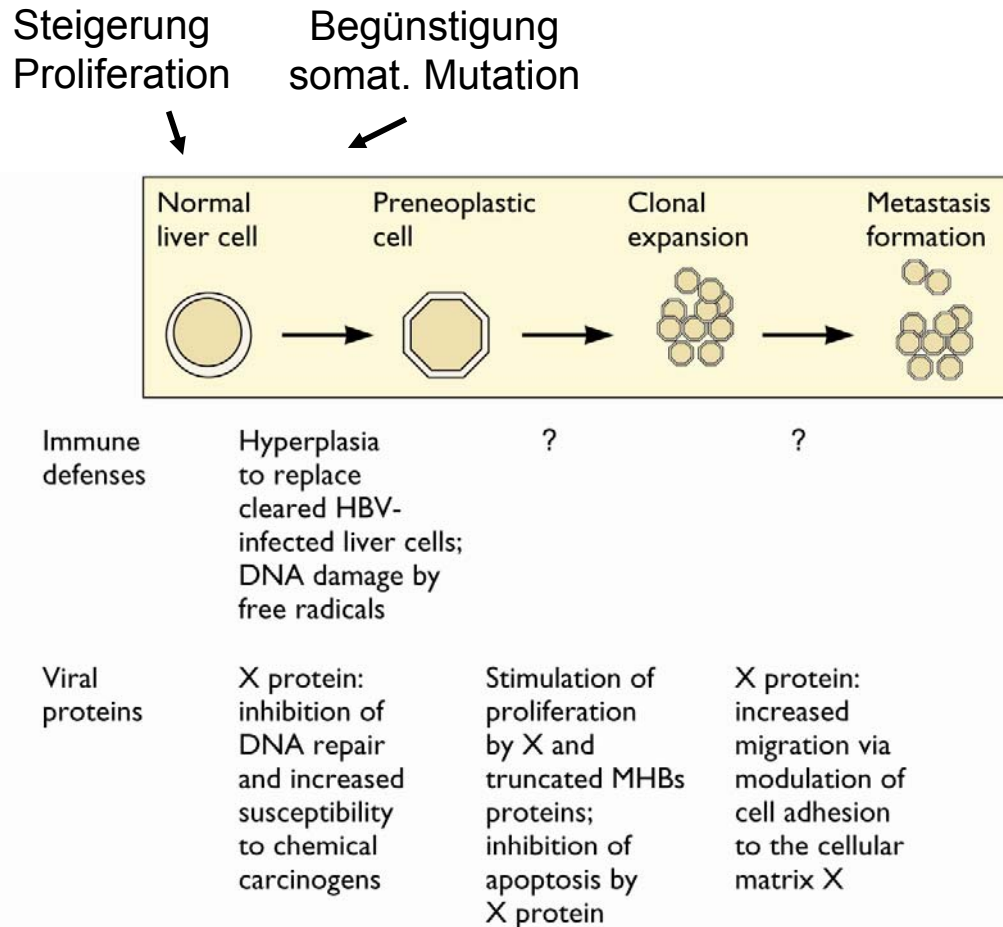
Inaktivierung von p53 durch adeno- und papovavirale Proteine



Onkogenese der Hepadnaviren (HBV)

- immer auf Grund einer persistenten HBV-Infektion
- persistent Infizierte haben ca. 100-fach höheres Risiko für HCC als Gesunde
- episomale Replikation, keine obligatorische Integration
- In HCCs oft Integration von Teilen des HBV-Genoms in regulatorische Gene (Vit.A-Säure Rezeptor, Zykline)
- Virus ist wichtiger Kofaktor, aber nicht ausreichend für Transformation
 - konsequente Impfung gegen HBV senkt die Inzidenz des HCCs

Mögliche Rolle von HBV-Proteinen bei der HCC-Entstehung



Adapted from C. Rabe et al., *Dig. Dis.* **19**:279–287, 2001, with permission.

Vielfalt viraler Transformationsmechanismen

Table 18.10 The diversity of viral transformation mechanisms

Virus	Viral genetic information in transformed cells			Transformation mechanisms		
	Physical state	Lytic functions	Transforming functions	Cell cycle progression	Apoptosis	Immune modulation or stimulation
Adenovirus						
Human subgroup C and A serotypes	Integrated into host genome by random recombination	Lost during integration	E1A and E1B gene products; some E4 proteins	Deregulated; inactivation of pRb family proteins by E1A proteins	Blocked by inactivation of p53 (E1B 55-kDa and E4 Orf 6 proteins) and by the E1B 19-kDa protein, a viral Bcl-2 homolog	Inhibition of transcription of MHC class I genes by subgroup A E1A proteins
Flavivirus						
Hepatitis C virus	Not integrated	Noncytolytic, persistent infection of cells that are rapidly dividing	Not known	Not known	Not known	Immune systems kill infected cells; survivors are selected over years of replication; tumor cells escape elimination
Hepadnavirus						
Hepatitis B virus	Episomal; viral sequences are integrated in some hepatocellular carcinomas	None	X protein; large or truncated middle B surface proteins	Defects in DNA repair; altered transcription of proto-oncogenes (e.g., <i>c-fos</i> , <i>c-myc</i>) and transcriptional regulators (e.g., NF- κ B); direct interaction of X with proteins in growth signaling pathways	Both pro- and antiapoptotic effects are seen, depending on conditions; some may be mediated by X protein binding to p53	Continuous tissue damage due to immune cell attack drives abnormal liver proliferation
Herpesvirus						
Epstein-Barr virus	Episomal; replicates in concert with host cell genome	Repressed	LMP-1 protein; EBNA-2 and LMP-2 increase production and stability, respectively, of LMP-1	Deregulated by constitutive signaling from LMP-1	Blocked: LMP-1 induces synthesis of Bcl-2 family proteins and inhibits signaling from death domain proteins	Cytotoxic T cells recognizing EBNA-1 are not produced, because a sequence in this viral protein inhibits the proteasome; EBNA-2 blocks signal transduction cascade induced by IFN
Papillomavirus						
Human types 16 and 18	Integrated into host genome by random recombination	Lost during integration	E6 and E7 proteins	Deregulated by inactivation of Rb family proteins by E7 protein	Blocked by E6 protein-induced degradation of p53	None known

Table 18.10 (continued)

Virus	Viral genetic information in transformed cells			Transformation mechanisms		
	Physical state	Lytic functions	Transforming functions	Cell cycle progression	Apoptosis	Immune modulation or stimulation
Polyomavirus						
Simian virus 40	Integrated into host genome by random recombination	Lost during integration	LT; sT in some circumstances	Deregulated by inactivation of Rb family proteins by LT and stimulation of Mapk cause cascade signaling by sT	Blocked by inactivation of p53 by LT	None known
Retroviruses						
Transducing (e.g., Rous sarcoma virus)	Integrated	None	Virally transduced, cell-derived oncogenes	Loss of tissue, developmental, and cell cycle regulation by inappropriate expression of oncogenes	None	None known
Nontransducing (e.g., Rous-associated viruses 1 and 2)	Integrated	None	Insertional mutagenesis, alteration of cellular proto-oncogenes (or their expression) in vicinity of proviral integration site	Loss of tissue, developmental, and cell cycle regulation by inappropriate expression of wild-type or truncated proto-oncogenes	None	Viral superantigen (murine mammary tumor virus, Sag protein) stimulates T cells and induces proliferation of B cells
Long latency (e.g., human T-lymphotropic virus type 1)	Integrated	None	Viral trans-activator proteins, Tax	Stimulates T-cell proliferation by induction of NF- κ B and IL-2	Not known	Abnormal T-cell proliferation is a critical early event, but other currently unknown changes are required