Die genetische Information der Krebsbildung

Zierfische als Helfer der Krebsforschung/Von Annerose und Fritz Anders

Der geistige und experimentelle Ansatz für die Krebsforschung im Genetischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen war und ist einfach: Da die endo- und exogenen krebsauslösenden Einflüsse auf die Zelle bzw. auf den tierischen Organismus letztlich alle den gleichen Endeffekt haben, nämlich das Auftreten von neoplastisch [1] transformierten Zellen bzw. von Tumoren, die stereotyp ungehemmte Zellteilung und anormale Zelldifferenzierung zeigen, muß die genetische Information für die Krebsbildung im Genom der Zelle selbst kodiert sein. Diese Information muß – da Krebs bei allen Gruppen der vielzelligen Tiere vorkommt – bei Tier und Mensch die gleiche sein. Sie muß auch ein stammesgeschichtlich altes Erbe sein, das von der Zivilisation unabhängig ist; denn schon die Saurier der Jurazeit und andere ausgestorbene Tiere hatten Krebs.

1954 machten wir uns mit einer kleinen Arbeitsgruppe auf den Weg, die deduzierte genetische Schlüsselinformation für die Krebsbildung zu suchen. Über mehrere pflanzliche und tierische Systeme der Krebsforschung gelangten wir schließlich zu dem für die damalige Zeit ausgefallenen System der „spontanen" Krebsentstehung bei den zentralamerikanischen Zahnkärpflingen *Xiphophorus maculatus* und *Xiphophorus helleri* (Bilder 2a). Den Aquarienliebhabern sind diese Fische als Platys und Schwertträger bekannt.

Die „spontane" Krebsentstehung bei *Xiphophorus* war schon 1928 von Curt Kosswig in Münster, Georg Häussler in Heidelberg und Myron Gordon in New York beobachtet worden, und zwar an bestimmten Bastarden, die aus der Kreuzung von bunten kommerziellen (domestizierten) Zierplatys und Zierschwertträgern hervorgegangen waren. Da die genetische Konstitution dieser Zierfische durch den langen züchterischen Weg sehr unübersichtlich ist, mußten wir bei der Suche nach der genetischen Information für Tumorbildung auf die unscheinbar grauen Fische aus Wildpopulationen, die durch die natürliche Selektion genetisch weitgehend einheitlich sind, zurückgreifen. Diese Fische standen uns teils aus Sammelreisen des New York Aquariums und des Zoologischen Instituts Hamburg und teils aus einer eigenen Sammelreise nach Mexiko zur Verfügung. Heute beherbergt das Genetische Institut mit 2000 Aquarien und vielen tausend Zahnkärpflingen das größte genetisch orientierte Fischlaboratorium der Welt. In ihm arbeiten gegenwärtig rund 40 Mitarbeiter, darunter 17 Diplomanden und 14 Doktoranden. Die Arbeiten werden durch die Justus-Liebig-Universität, die Deutsche Forschungsgemeinschaft, das Bundesministerium für Forschung und Technologie und das Umweltbundesamt sehr wirkungsvoll unterstützt und führen zwangsläufig zu einem

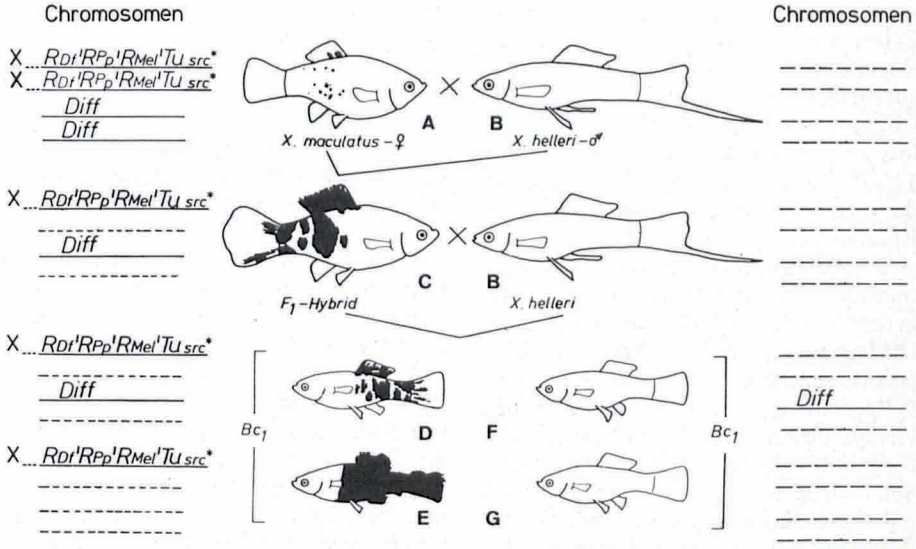


Bild 1: Kreuzungsschema zur Herstellung melanombildender Fisch-Bastarde, s. Text.

an der gegenwärtigen Forschung orientierten Unterricht in klassischer und molekularer Genetik.

Es bedurfte einer Serie langwieriger Experimente, bis (um 1965) die Schlüsselinformation für die Krebsbildung bei *Xiphophorus* genetisch und cytogenetisch erfaßt und der weiteren Konkretisierung zugänglich gemacht werden konnte. Dies soll anhand der Melanombildung, die leicht beobachtet werden kann, erläutert werden (Bild 1, A–G; entsprechende Photos in Bildern 2a und b).

Die Kreuzung (künstliche Besamung) eines Weibchens von *Xiphophorus maculatus* (Platy) aus dem Rio Jamapa (A) mit einem Männchen von *X. helleri* (Schwertträger) aus dem Rio Lancetilla (B) ergibt eine Bastardnachkommenschaft (F1), in der alle Tiere gutartige Melanome bilden. Die meisten Zellen dieser Melanome sind bis zum Endstadium (terminal) differenziert und gleichen strukturell, ultrastrukturell und biochemisch denen von winzig kleinen schwarzen Flecken in der Haut der Platy-Mutter. Die Melanome erscheinen nur in der Haut der Dorsalflosse und des hinteren Rumpfteils, d. h. in denjenigen Kompartimenten des Körpers, in denen auch die Flecken der Platy-Mutter liegen. Bei älteren F1-Bastarden vereinigen sich solche Melanome und bilden ein großes Melanom, welches nun beide Kompartimente besetzt. Die Rückkreuzung eines F1-Bastards (C) mit dem Schwertträger (B) führt zu einer Rückkreuzungsnachkommenschaft (BC1), die nach den Mendel-Gesetzen in drei Typen aufspaltet: Typ 1 (25% der BC1) entwickelt gutartige Melanome (D) wie die F1. Typ 2 (weitere 25% der BC1) bildet maligne Melanome (E), deren Zellen zumeist in einem frühen Differenzierungsstadium steckengeblieben sind; sie dringen zumeist in andere Gewebe ein und führen allmählich den Tod der Tiere herbei. Typ 3 (die restlichen 50%) bildet keine Melanome; er sieht aus wie der Schwertträger (F und G). Alle weiteren Rückkreuzungen von Trägern gutartiger Melanome mit dem Schwertträger führen in allen Generationen (z. Z. in BC26) zu derselben Mendel-Spaltung. Rückkreuzungen von Trägern bösartiger Melanome mit dem Schwertträger liefern ein etwas anderes Ergebnis: Hier bilden 50% der Nachkommen bösartige Melanome, während die restlichen 50% der Nachkommen bösartige Melanome, während die restlichen 50% frei von Melanomen sind; gutartige Melanome

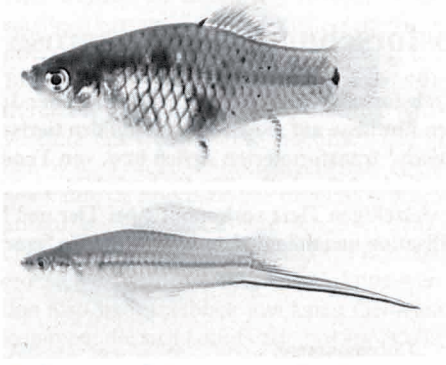
1 Die Terminologie der Tumoren ist manchmal verwirrend. Wir verwenden den Ausdruck Krebs, Tumor (lat. Schwellung), Neoplasie (lat. Neubildung) für alle gut- und bösartigen Neubildungen. Wo es notwendig ist, spezifizieren wir, was wir meinen

treten nicht auf. Zu einem anderen Ergebnis führt die Rückkreuzung von Melanomträgern mit dem Platy: Hier kommt es in der nächsten Generation zu einem Rückgang und in der übernächsten zu einem Verschwinden der Melanome.

Durch diese Kreuzungen geben sich vier genetische Komponenten der Krebsbildung zu erkennen. Die auffälligste Komponente ist die generelle Schlüsselinformation für die neoplastische Transformation, die als „Tumorgen" (*Tu*) bezeichnet wurde. Die übrigen drei Komponenten können aus der Einschränkung der *Tu*-Wirkung erschlossen werden. Die Tatsache, daß in diesem Experiment ausschließlich Pigmentzellen (Melanocyten) transformiert wurden, weist auf ein mutiertes pigmentspezifisches Regulationsgen (*R-Mel*) hin, welches die Transformation nur dieser Zellen erlaubt. Zur Transformation anderer Zellen bedarf es der Mutation anderer gewebspezifischer Regulationsgene. Desweiteren wurden nicht alle Pigmentzellen am Fischkörper transformiert, sondern nur diejenigen, die in der Haut der Dorsalflosse und des hinteren Teils (des „posterioren Parts") des Körpers vorhanden sind. Dies weist auf mutierte Regulationsgene hin, die für diese beiden Kompartimente des Fischkörpers spezifisch sind (*R-Df'* und *R-Pp'*); für die Melanombildung im Auge, am Maul, am vorderen Teil des Körpers usw. bedarf es der Mutation anderer kompartimentspezifischer Regulationsgene. Schließlich ist noch die Komponente zu erkennen, die den Unterschied zwischen Gut- und Bösartigkeit bedingt. Sie stammt wie *Tu, R-Mel* und *R-Df'* + *R-Pp'* vom Platy, ist aber nicht wie jene auf demselben Chromosom (in diesem Falle ein X-Chromosom), sondern auf einem anderen Chromosom (einem Autosom) lokalisiert. Diese Komponente kommt, wie Kopplungsanalysen zeigten, beim Schwertträger nicht vor. Wenn sie im tumortragenden Bastard vorhanden ist, bedingt sie terminale Differenzierung der transformierten Zellen und damit Gutartigkeit; ihr Fehlen in diesen Bastarden bedingt Bösartigkeit. Wegen ihrer zelldifferenzierenden Wirkung wurde das entsprechende Gen mit *Diff* bezeichnet.

Die nähere genetische Analyse hat dann gezeigt, daß alle Melanome, und zwar sowohl die erbbedingten als auch die durch Karzinogene induzierten, dem *Tu* zugeordnet werden können. *Tu* wird in den Wildpopulationen stets durch ein populationsspezifisches System von „Regulationsgenen" wie *R-Mel, R-Df* usw. kontrolliert. Regulationsgene, die in einer Wildpopulation mit *Tu* auf demselben Chromosom gekoppelt sind, können schon in der Nachbarpopulation einer anderen Koppelungsgruppe, d. h. einem anderen Chromosom angehören. Bastarde zwischen Angehörigen zweier solcher Populationen, die bei der Neuverteilung der Chromosomen nach der Mendel-Statistik kein für die *Tu*-Kontrolle ausreichendes System der Regulationsgene erhalten, bilden „spontan" Tumoren. Aber in der nächsten Generation kann das System der Regulationsgene nach der Mendel-Statistik wieder restauriert werden, so daß keine Neoplasien entstehen. Genotypen, deren Systeme der Regulationsgene zwar gestört sind, aber immer noch eine ausreichende Kontrolle über ihr *Tu* ausüben, sind sensitiv gegenüber physikalischen und chemischen Karzinogenen; manche von ihnen sind hochgradig sensitiv gegenüber Agenzien wie Cyclamat, Betelnußextrakt und Methyltestosteron, die sicherlich keine Karzinogene im üblichen Sinne, sondern sog. Tumorpromotoren sind. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden genetisch definierte Teststämme hergestellt, mit deren Hilfe heute zwischen der Initiator- und Promotorwirkung eines fraglichen physikalischen oder chemischen Agens unterschieden werden kann.

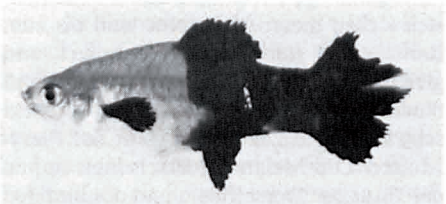
Bilder 2a: Xiphophorus maculatus; entspricht Kreuzungspartner A in Bild 1.



Xiphophorus helleri; entspricht Kreuzungspartner B in Bild 1

F_1-Bastard, hervorgegangen aus der Kreuzung zwischen X. maculatus und X. helleri; entspricht Kreuzungspartner C in Bild 1.

Rückkreuzungsbastard; hervorgegangen aus der Rückkreuzung der F_1 mit X. helleri; entspricht Tier E in Bild 1.



Bilder 2b: „Spontane" Melanombildung bei Xiphophorus, s. Bild 1 und Text.

Dreißig Regulationsgene

Weitere Einzelheiten über *Tu* und dessen Regulationsgene wurden zwischen 1970 und 1975 an 48 Strukturmutationen des Pigmentzellsystems und der Melanombildung (Stückverluste, Stückverdoppelungen, Stückumlagerungen usw. der Chromosomen), die im hiesigen Strahlenzentrum in Zusammenarbeit mit Gerhard Döll erzeugt wurden, gewonnen. *Tu* ist immer terminal auf einem Chromosom (X, Y oder Autosom) lokalisiert und kommt immer in mehreren Kopien vor. Zusätzlich eingeführte Kopien von *Tu* stärken des krebsbildende Potential eines Individuums; der Verlust von *Tu*-Kopien schwächt es. Fische ohne krebsbildende Potenz bzw. ohne *Tu* wurden nicht gefunden. Das pigmentzellspezifische *R-Mel* liegt unmittelbar neben *Tu*. Daran anschließend liegt eine Serie von wenigstens 14 kompartimentspezifischen Regulationsgenen wie *R-Df, R-Pp* usw., die, je nachdem, welches von ihnen geschädigt oder ausgefallen ist, Melanombildung im Auge, am Mund, an der Rückenflosse, der Schwanzflosse, am Begattungsorgan, usw. zulassen. Insgesamt wurden allein im Pigmentzellsystem rund dreißig Regulationsgene für *Tu* aufgespürt.

Onkogene und Tumorgene

Dies zusammen mit dem Befund, daß es Individuen ohne *Tu* offenbar nicht gibt, zeigte, daß die Krebsbildung im wesentlichen ein Problem der Regulation der Schlüsselinformation für die Tumorbildung ist. In den letzten Jahren konnte unsere Arbeitsgruppe dann nachweisen, daß es ganz überwiegend die Regulationsgene sind, an denen die Karzinogene aus der Umwelt ansetzen, wenn sie Neoplasien erzeugen. Fünfundzwanzig verschiedene aus der menschlichen Pathologie bekannte Krebs-Histotypen (nach dem Ursprungsgewebe typisiert), wie neurogene (z. B. Neuroblastome; Melanome), mesenchymale (z. B. Fibrosarkome, Retikulosarkome) und epitheliale (z. B. Adenokarzinome; Hepatome) Neoplasien wurden bei *Xiphophorus* in Zusammenarbeit mit Knut Frese aus dem hiesigen Institut für Veterinär-Pathologie identifiziert. Die Gewebsspezifität beruht auf der Spezifität der jeweils ausgefallenen Regulationsgene, die normalerweise den Organismus vor der Überaktivität seiner eigenen *Tu*-Kopien schützen.

Neue Entwicklungen der Krebsforschung im Genetischen Institut bahnten sich an, als holländische und amerikanische Forscher um 1970 konkrete Vorstellungen über die in bestimmten Viren (Retroviren) lokalisierten, für die Krebsbildung am Laboratoriumstier verantwortlichen Faktoren, hier

„Onkogene" genannt, entwickelten. Wir kennen heute über 20 solcher viraler Onkogene, unter denen diejenigen, die mit den Ursachen der Leukämien bei Tier und Mensch zusammenhängen, am eingehendsten studiert wurden. Etwa 20 weitere Onkogene kommen hinzu.

Da uns die Tumorbildung durch ein „Tumorgen" aus einem Chromosom bei *Xiphophorus* und die Tumorbildung durch ein „Onkogen" aus einem Virus bei einer Maus wesensgleich erschien, stellte sich die Frage, ob zwischen den Tumorgenen der Laboratoriumsfische und den Onkogenen der Viren ein substantieller Zusammenhang besteht.

Bei Mensch und Tier vorhanden

Die Beantwortung dieser Frage wurde 1976 dringlich, nachdem eine Forschergruppe in San Francisco gezeigt hatte, daß die gleichen Nucleotidsequenzen der DNA (Reihenfolgen der Bausteine der Erbsubstanz), die das Onkogen *src* von Rous' Sarkom-Hühnervirus hat, auch im nicht-infizierten Huhn, beim Menschen und beim Rind, aber auch in kommerzieller DNA, die aus Hoden vom Lachs gewonnen wurde, vorkommen. In Zusammenarbeit mit Heinz Bauer und Angelika Barnekow in Gießen und Robert Gallo in Bethesda hat Manfred Schartl in unseren Laboratorien bei *Xiphophorus* und seinen Verwandten solche Sequenzen identifiziert, und zwar bei allen untersuchten Individuen aus allen verfügbaren Populationen. Darüber hinaus wurden die Nukleotidsequenzen dieses viralen Onkogens bei allen untersuchten Individuen aus 15 Gruppen der vielzelligen Tiere gefunden, angefangen beim Menschen, über Maus, Schwein, Huhn, Frosch, Knochenfisch, Haifisch, Neunauge, Lanzettfischen, Küchenschabe, Taschenkrebs, Pfeilschwanzkrebs, Tintenfisch, Seeanemone bis herunter zu den Schwämmen.

Das ursprünglich als virales Gen erkannte Onkogen ist also zugleich ein molekularbiologisch definiertes zelluläres Onkogen. Einzeller, Algen, Hefen und Blütenpflanzen besitzen dieses Onkogen nicht. Wahrscheinlich ist es in der Evolution der Tiere gleichzeitig mit der Entstehung der Vielzelligkeit der Tiere entstanden, also vor eineinhalb Milliarden Jahren, als die Schwämme entstanden. Bei Fisch, Frosch, Huhn und – wie in anderen Laboratorien gefunden wurde – bei Drosophila und Maus zeigt es seine höchste Aktivität – gemessen an der Menge seiner Genprodukte – in einer frühen Phase der Embryonalentwicklung. Aber auch im Verlauf des normalen Individuallebens eines Fisches zeigt es in manchen Organen, besonders im Gehirn, hohe Aktivitäten. Es scheint, als ob es in verschiedenen Phasen der tierischen Entwicklung in verschiedenen Organen verschiedene Funktionen ausübt. In den Tumoren von *Xiphophorus* kann die Anzahl seiner Kopien und seine Aktivität bis auf das Fünfzigfache der Norm ansteigen. Letztere Erscheinung verdient intensive Untersuchungen, denn sie könnte ein wesentliches Glied im Ursachengefüge der Krebsbildung sein.

Beziehung zwischen Tu und c-src

Durch molekulare Hybridisierung von bekannten Onkogen-Proben mit der DNA von *Xiphophorus* ließ sich zeigen, daß die normale Körperzelle dieser Fische wenigstens zehn Kopien vom chromosomalen *src*-Onkogen (*c-src*) besitzt. Wenigstens vier von diesen Kopien haben den gleichen Erbgang und die gleiche Lokalisation wie das formal erschlossene *Tu*. Die *c-src*-Expression (Auswirkung des src-Gens), gemessen an der Aktivität eines Produktes (der pp60*c-src*-Kinase) wird durch die gleichen Systeme von Regulationsgenen kontrolliert wie die *Tu*-Expression, gemessen an der Tumorbildung. Zusätzlich eingeführte Kopien von *Tu*, die einen Dosiseffekt bei der Tumorbildung bedingen, zeigen den gleichen Effekt bei der *c-src*-Aktivität. Gegenwärtig wird im Genetischen Institut mit Methoden der molekularen Hybridisierung am Chromosom geprüft, wie eng die Beziehungen zwischen *Tu* und *c-src* sind. Offenbar sind die für die Tumorbildung „kritischen" *c-src*-Kopien dort lokalisiert, wo auch *Tu* liegt (s. *src* in Bild 1).

Eigene Evolution

Neben *c-src* wurden bei *Xiphophorus* vierzehn weitere Onkogene molekularbiologisch identifiziert. Einige von ihnen sind kloniert und sequenziert und werden mit den entsprechenden Onkogenen anderer Tiere und des Menschen verglichen. Alle bei *Xiphophorus* gefundenen Onkogene kommen bei allen Gruppen der Tiere oberhalb der Fische vor, auch beim Menschen. Unterhalb der Fische gibt es Einschränkungen. Es scheint, daß die Onkogene in der Stammesgeschichte mit steigender Evolutionshöhe der Tiere zahlenmäßig zugenommen und gleichzeitig eine eigene Evolution durchlaufen haben. Es wird großer Anstrengungen bedürfen, bis die Bedeutung der Onkogene in Evolution, Entwicklung und Tumorbildung verstanden ist.

Auch die molekularbiologische Untersuchung derjenigen Gene (Regulationsgene), die *Xiphophorus* vor seinen eigenen Krebsgenen schützen, ist im Genetischen Institut in Angriff genommen worden. Am meisten wissen wir über das Differenzierungsgen *Diff* (s. o.). Die Arbeiten schlossen an Beobachtungen von Helga Kersten in Erlangen und Susumu Nishimura in Tokyo an, nach denen die Transfer-Ribonukleinsäuren (tRNAs) für die Aminosäuren Asparagin, Asparaginsäure, Histidin und Tyrosin in unvollständig differenzierten Zellen in der ersten Position des Antikodons [2] das erwartete Guanosin (G) besitzen, während sie in differenzierten Zellen an dieser Stelle ein hochmodifiziertes G, nämlich ein Queuosin (Q), haben. Die Gemeinschaftsarbeit der Erlanger, Tokyoer und Gießener Arbeitsgruppen zeigte, daß das Auftreten der Q-haltigen tRNAs in den gutartigen Tumoren durch *Diff* bedingt ist. Wenn *Diff* defekt ist oder fehlt, fehlt auch Q. Für das Leben der tumorfreien Tiere hat dies offenbar keine essentielle Bedeutung. Allerdings sind die Tumoren, die an solchen Tieren entstehen, immer bösartig. Die Q-haltigen tRNAs stehen wahrscheinlich mit dem Primäreffekt des *Diff*-Gens in enger Beziehung. Er führt letztlich zu einer terminalen Differenzierung der neoplastisch transformierten Zellen, wodurch der gutartige Zustand der Neoplasie bestimmt wird. Über die funktionellen und molekularbiologischen Unterschiede zwischen Q-enthaltenden und Q-freien tRNAs ist nichts bekannt.

Große Erwartungen setzen wir in das Studium der Kompartimentspezifischen Regulationsgene (s. o.), die, wenn sie geschädigt oder ausgefallen sind, den Ort der Melanombildung am Fischkörper bestimmen; intakte Gene dieses Typs schützen vor Melanombildung in dem betreffenden Kompartiment des Fischkörpers. Diese Arbeiten stehen noch ganz am Anfang; doch haben sie bereits eine Beziehung der kompartimentspezifischen Regulationsgene zu den sog. Homeoboxen aufgedeckt. Homeoboxen sind kurze DNA-Abschnitte (180 Basenpaare lang), die vor etwa zwei Jahren von Schweizer Forschern bei *Drosophila* entdeckt und gleich darauf bei allen hierauf untersuchten Tieren nachgewiesen wurden. Auch *Xiphophorus* hat in seiner DNA Homeoboxen. Hier zeigt es sich nun, daß der Erbgang der formalgenetisch erfaßten kompartimentspezifischen Regulationsgene mit dem Erbgang bestimmter molekularbiologisch erfaßter Muster der Homeoboxen übereinstimmt und daß Mutationen dieser Regulationsgene, die sich im Auftreten von Tumoren an Auge, Mund, Rückenflosse usw. zu erkennen geben, mit Veränderungen am Muster der Homeoboxen einhergehen.

Bald werden einige Hunderte von Onkogenen identifiziert und in ihrem Aufbau bekannt werden. Dabei erscheint uns das Studium der tierischen Onkogene genau so wertvoll wie das der menschlichen. Nunmehr kann damit begonnen werden, diejenigen Gene aufzuspüren, die uns vor unseren eigenen Krebsgenen schützen.

2 (Gemeint ist die Position, die der dritten Position einer Dreiergruppe von „Basen" im genetischen Code gegenübersteht)