

Früherkennung krebserzeugender Gefahren unbekannter Substanzen

Neues Testsystem ermöglicht Einschränkung von Tierversuchen
 Von Manfred Reinacher und Erich Eigenbrodt

Tumoren können aufgrund der verschiedensten äußeren Ursachen entstehen. Zu den wichtigsten gehören heute Chemikalien (kanzerogene Substanzen), ionisierende und ultraviolette Strahlen und Viren. Es wird diskutiert, inwieweit diese sehr verschiedenen Faktoren eventuell über ähnliche Mechanismen zur Tumorentstehung führen können. Eine Möglichkeit hierfür wäre unter anderem eine Aktivitätsänderung von sogenannten zellulären Onc-Genen (Tumorgene), die in jeder normalen Zelle vorhanden sind, deren physiologische Funktion jedoch bisher nicht genau bekannt ist. Diese Aktivitätsänderung von Onc-Gen-Produkten kann man bisher aber nur in wenigen Fällen und nur mit sehr aufwendigen Methoden direkt messen. Auch ist im realen Untersuchungsfall die Angelegenheit dadurch kompliziert, daß es eine Anzahl verschiedener Tumorgene gibt – bisher sind ungefähr 26 bekannt und es werden sicherlich noch beträchtlich mehr Onc-Gene entdeckt werden –, man aber nicht weiß, welches Onc-Gen denn im Einzelfall nun durch eine äußere Einwirkung wie z. B. eine kanzerogene Substanz, aktiviert wird.

Daher werden zur Zeit mögliche kanzerogene Wirkungen mit indirekteren Methoden untersucht. Hierbei gilt es, zwei Aufgaben möglichst gleichzeitig zu erfüllen. Es sollen zum einen alle kanzerogenen Gefährdungen sicher erkannt werden, zum anderen müssen aber die Untersuchungen vom Aufwand her praktikabel sein und es sollen möglichst wenige Versuchstiere hierfür eingesetzt werden müssen. Ein völliger Verzicht auf Versuchstiere ist derzeit nicht möglich, da viele krebserzeugende Substanzen erst nach einem Umbau des Moleküls, wie er im Stoffwechsel des Tieres erfolgt, ihre tumorerezeugende Wirkung entfalten. Solche Veränderungen der Substanz im Stoffwechsel eines Tieres lassen sich aber nicht sicher außerhalb eines Organismus nachvollziehen. So sind Substanzen bekannt, die sich zwar an die Erbsubstanz anlagern oder sogar Veränderungen im Erbgut verursachen – beides außerhalb eines Tieres meßbare Vorgänge –, jedoch keine Tumoren induzieren. Umgekehrt gibt es auch chemische Verbindungen, die Tumoren erzeugen, ohne daß sie in einer solchen Untersuchung ohne Einsatz von Versuchstieren hierfür einen Hinweis geben würden. Daher muß das derzeit aktuelle Ziel sein, die für solche Studien benötigten Tierzahlen zu senken. Dies geschieht am besten, indem man Tests entwickelt, die möglichst früh eine tumorerezeugende Wirkung nachweisen können und gleichzeitig in der Lage sind, diese kanzerogene Fähigkeit unabhängig von der einzelnen Ursache für alle Tumoren anzuzeigen.

Hierfür bietet sich die Untersuchung des Zuckerstoffwechsels in Tumorzellen an. Schon lange – seit den Veröffentlichungen von Otto Warburg 1920 – ist bekannt, daß Tumorzellen hier eine einheitliche Veränderung gegenüber Normalzellen aufweisen. Die Interpretation und Nutzbarmachung dieser Befunde gelang allerdings nicht, solange sie unter dem Gesichtspunkt des Energiestoffwechsels gesehen wurden.

Wichtig erscheint heute eher, daß die Zuckerspaltung bei der Veränderung der Aktivitäten bestimmter Kontrollenzyme verstärkt für den Baustoffwechsel benutzt werden kann. Wir untersuchen besonders intensiv das letzte der Kontrollenzyme der Zuckerspaltung (Glykolyse), die Pyruvatkinase. Durch die Bestimmung sehr ähnlicher, aber nicht identischer Pyruvatkinase-Enzyme, sogenannter Isoenzyme, kann hier noch eine weitergehende Information erhalten werden, als dies bei einer Untersuchung ohne Berücksichtigung des Auftretens von Isoenzymen möglich wäre.

Gleichzeitig lassen diese Isoenzyme die vielversprechende Möglichkeit offen, daß Veränderungen in ihrem Muster schon im Blut

erkennbar sein könnten. Sie sind im Zytoplasma der Zelle gelöst und werden bei Zellschädigungen, wie sie in Tumoren häufig auftreten, leicht in das Blutplasma abgegeben, wo sie nachgewiesen werden können. Damit eröffnet sich prinzipiell die Möglichkeit, kanzerogene Veränderungen zu erkennen, ohne das Versuchstier zum Tumornachweis töten und sezieren zu müssen bzw. beim Menschen operieren und Biopsiematerial entnehmen zu müssen.

Ergebnisse

Unsere Untersuchungen zeigten, daß in allen Tumorgeweben, die von Zellen ausgehen, welche das Isoenzym der Pyruvatkina-

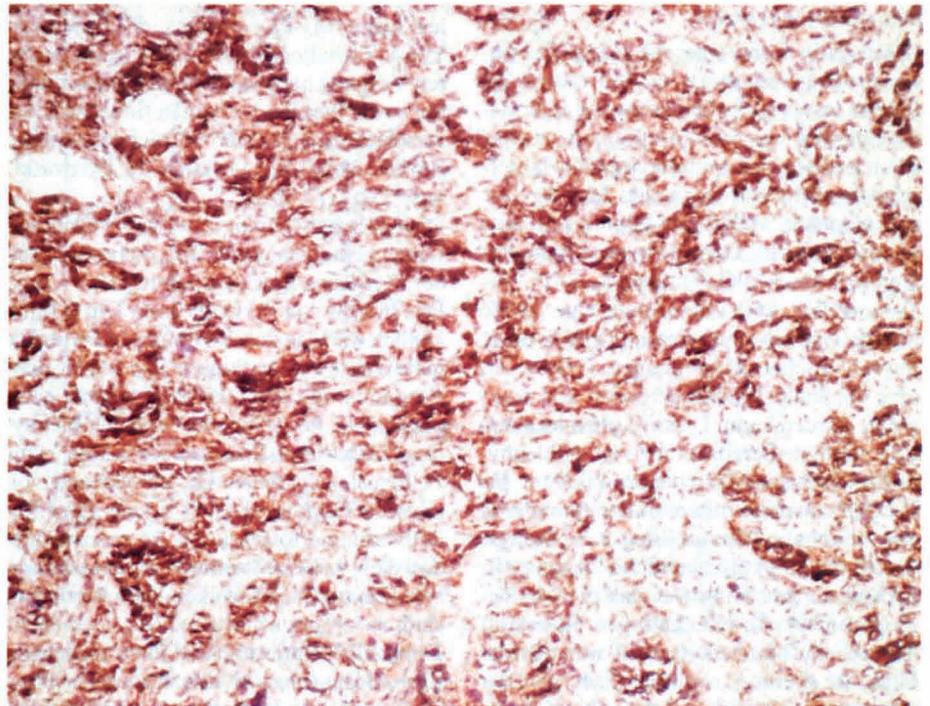


Abb. 1: Immunhistologischer Nachweis des hohen Gehaltes an Pyruvatkinase-Isoenzym Typ M_2 in einem Ausschnitt aus einem sehr bösartigen Bindegewebstumor (Fibrosarkom) der Ratte. Der Gehalt an Pyruvatkinase entspricht dem Ausmaß der Braunfärbung der Tumorzellen.

se Typ M_2 enthalten, der Gehalt an diesem Isoenzym gesteigert ist. Es besteht ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Pyruvatkinase Typ M_2 und der Malignität der Tumoren. Je bösartiger ein Tumor ist, desto höher ist sein Gehalt an Pyruvatkinase Typ M_2 (Abb. 1). Dies gilt für biologisch so weit voneinander entfernte Tierarten wie Huhn, Hund und Ratte, so daß eine weite Verbreitung dieses Phänomens unter den Warmblütlern angenommen werden kann.

Unsere Untersuchungen zeigten aber auch, daß sich die Pyruvatkinase Typ M_2 aus Tumoren (Tumor- M_2 -Pk) in ihren immunologischen Eigenschaften von Pyruvatkinase Typ M_2 der Lunge unterscheidet. So lassen sich Tumorzellen in der Lunge mit monoklonalen Antikörpern gegen Tumor- M_2 -Pk sehr deutlich und spezifisch darstellen, obwohl das Lungengewebe selbst reich an normaler M_2 -Pyruvatkinase ist, die aber von dem monoklonalen Antikörper nicht erkannt wird (Abb. 2).

Wir haben daher dieses Enzym aus Ratten- und Hühnertumoren gereinigt und seine Eigenschaften mit dem Lungenzym verglichen. Das Enzym aus Tumoren war sehr viel weniger aktiv bei normaler Konzentration seines Substrates Phosphoenolpyruvat. Es konnte durch Kohlenhydratstoffwechsel-Zwischenprodukte und durch Aminosäuren sehr viel stärker aktiviert oder inaktiviert werden als normale M_2 -Pk. Bei der Umwandlung von normalen Zellen zu Tumorzellen wird sie in Virus-transformierten Fibroblasten durch ein Onc-Gen-Produkt, die pp60^{src}-Kinase, zusätzlich durch Phosphorinbau inaktiviert.

Gleichzeitig nimmt aber die Menge des Enzymproteins sehr stark zu. Mit diesen Befunden lassen sich die Steigerung des M_2 -Pk-Gehaltes in Spontantumoren ebenso verstehen wie die immunologische Unterscheidbarkeit von normaler M_2 -Pk. Der monoklonale Antikörper könnte z. B. eine phosphorylierte, Tumor-Pk-spezifische Region auf dem Molekül erkennen.

Tumorzellen enthalten somit eine große Menge eines Pyruvatkinasetyps, der unter physiologischen Bedingungen inaktiv ist, aber bei Sauerstoffmangel sofort voll reaktiviert werden kann. Dies erlaubt zum einen eine optimale Bereitstellung von Kohlenhydratstoffwechsel-Zwischenprodukten für die Zellbausteinsynthese und zum anderen eine optimale Bereitstellung von Energie durch die Glykolysekette bei Sauerstoffmangel. Es gibt Hinweise, daß die von Tumorzellen in Anwesenheit von Sauerstoff abgegebene Milchsäure nicht nur aus der Glukose stammt, sondern auch aus der Aminosäure Glutamin, die in allen Körpergeweben in hohen Konzentrationen vorkommt. Dieser Stoffwechselzustand bevorzugen Tumorzellen gegenüber normal sich teilenden Zellen und führt dazu, daß sie sich

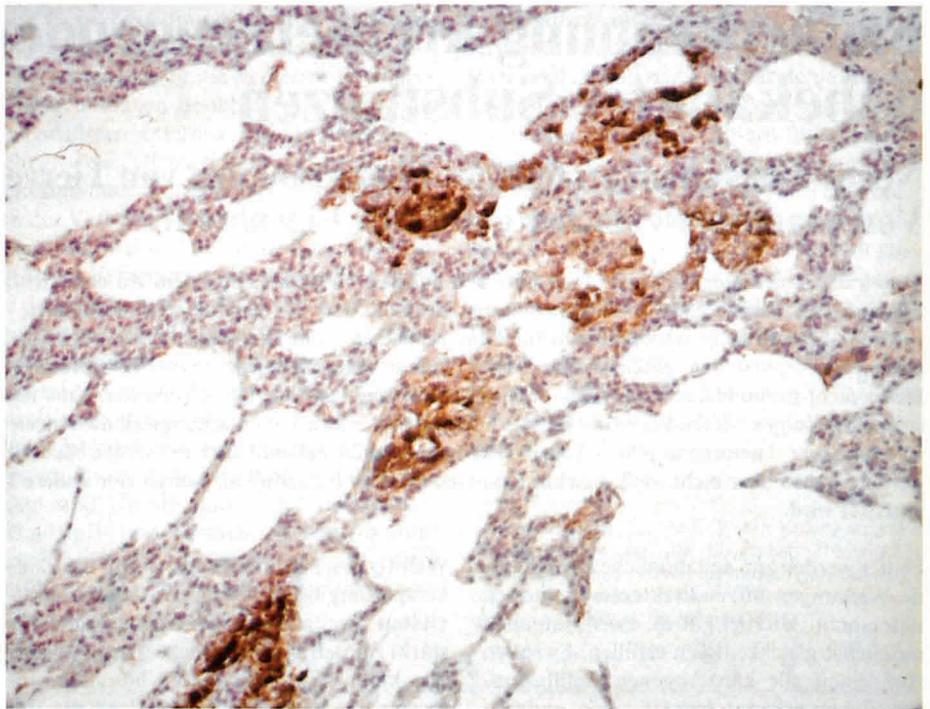


Abb. 2: Nachweis von „tumorspezifischer“ M_2 -Pyruvatkinase durch einen monoklonalen Antikörper. Während die kleinen Tochtergeschwülste (eines Eierstockkrebses der Ratte) in der Lunge stark reagieren (braun), ist das Lungengewebe, das viel „normale“ M_2 -Pyruvatkinase enthält, negativ.

auch bei schlechter Blutgefäßversorgung und unter wechselnder Nährstoffversorgung weiterleben oder zumindest überleben können.

Eine ähnliche Stoffwechselsituation wird auch in Lebertumoren, deren Ausgangszellen keine M_2 -Pk, sondern das Isoenzym Typ L enthalten, durch einen etwas anderen Vorgang hergestellt. In den Lebertumoren sowie in ihren Vorstufen findet sich mit verschiedenen Methoden nachweisbar ein starker Abfall des Gehaltes an Pyruvatkinase Typ L (Abb. 3).

Dies ist inzwischen in ersten biochemischen Untersuchungen auch für Lebertumoren des Menschen gezeigt worden. Das Fehlen von Pyruvatkinase Typ L führt ähnlich wie eine durch Tumorgen-Produkte inaktivierte Pyruvatkinase Typ M_2 zu einer Verminderung der Glykolyse und zu einer optimalen Bereitstellung von Kohlenhydratstoffwechsel-Zwischenprodukten zur Zellbausteinsynthese. Da abweichend von anderen Tumortypen hier jedoch keine Reaktivierung erfolgen kann, ist zu erwarten, daß diese Lebertumoren gegenüber Sauerstoffmangel wesentlich empfindlicher sind.

Leberzellen sind aufgrund ihrer vielschichtigen Bedeutung für den Körper in ihren Stoffwechselfunktionen vielseitiger als viele M_2 -Pk-haltige Zellen. Um den gleichen Stoffwechselzustand zu erreichen, wie man ihn z. B. in transformierten Fibroblasten findet, müssen einige strategisch wichtige

Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels in den Leberzellen an- oder abgeschaltet werden. Diese Enzyme haben wir in Lebertumoren bestimmt und tatsächlich verändert sie sich im Vergleich zur normalen Leber, so daß der gleiche Stoffwechselzustand wie in M_2 -Pyruvatkinase-haltigen Tumoren entsteht (Abb. 4).

Biologische Bedeutung

Die Untersuchung der Pyruvatkinase-Isoenzyme in Tumorzellen ist besonders erfolgversprechend, da durch die Pyruvatkinase ein zentraler Punkt eines Stoffwechselweges gesteuert wird, der in praktisch allen Tumorzellen verändert ist. Der Fortschritt im Verständnis dieser Abweichung vom normalen Stoffwechsel resultierte daraus, daß die Zuckerspaltung nicht mehr nur unter dem Gesichtspunkt der Energiegewinnung gesehen wurde, sondern daß die bei der Zuckerspaltung entstehenden Bruchstücke als Bausteine zum Aufbau neuer, für eine Tumorzelle wesentlicher Bestandteile betrachtet wurden (Abb. 4). Die breite biologische Bedeutung dieser Beobachtungen ergibt sich daraus, daß so weit entfernte Tierarten wie Huhn und Ratte gleichartige Veränderungen aufweisen. Hieraus ist abzuleiten, daß diese Stoffwechselmechanismen auch beim Menschen ablaufen. Tatsächlich sind biochemische Untersuchungen menschlicher Tumoren bekannt, die unsere Befunde bestätigen.

Diese Ergebnisse sind nicht nur in der Untersuchung kanzerogener Wirkungen verwendbar, sondern sie sind auch für die Unterscheidung zwischen gutartigen und bö-

artigen Tumoren in der klinischen Diagnostik von Bedeutung. Auch lassen sich für die Tumorthherapie hilfreiche Schlüsse aus dem Zustand des Zuckerstoffwechsels ziehen, da

er auch für die Entgiftung der dabei eingesetzten Zellgifte von wesentlicher Bedeutung ist. Der Nachweis der Pyruvatkinase-Isoenzyme läßt sich also sowohl experimentell, d. h. zur Erkennung kanzerogener Gefahren durch unbekannte Stoffe, als auch klinisch zur Tumordiagnostik verwenden. Er ist sowohl am lebenden Organismus – Tier oder Mensch – als auch in der Gewebekultur (Abb. 5), die den Tierversuch soweit wie möglich ersetzen soll, anwendbar und weist direkt Kanzerogenität, unabhängig von dem Entstehungsmechanismus nach.

Hierin liegt auch ein Vorteil dieses Tests gegenüber der Untersuchung der Bindung von chemischen Substanzen an die Nukleinsäuren (Erbinformationsträger) und Proteine isolierter Zellen. Letztere kann nur einen Verdacht in Richtung kanzerogener Wirkungen belegen, jedoch eine solche weder beweisen noch ausschließen. Eine nicht chemisch bedingte Kanzerogenese – z. B. durch Strahlung oder Viren – kann damit nicht erfaßt werden.

Da „tumorspezifische“ Anteile an einem Isoenzym mit monoklonalen Antikörpern nachweisbar sind, ist der Test sehr spezifisch. Bei diesen „tumorspezifischen“ Veränderungen könnte es sich z. B. um phosphorylierte Bereiche des Enzyms handeln. So ist von einem Onc-Gen-Produkt, der pp60^{v-src}-Kinase, bekannt, daß sie den Phosphorylierungsgrad eines Pyruvatkinase-Isoenzym erhöht. Hier ist der Kreis zur Onc-Gen-Forschung geschlagen, der Tumorstoffwechselveränderungen mit Onc-Genaktivitätswechseln in Zusammenhang bringt.

All diese Ergebnisse wurden erzielt, ohne daß von unserer Arbeitsgruppe auch nur ein einziges Tier mit Kanzerogenen behandelt worden ist. Es wurden ausschließlich Spontantumoren und von anderen Arbeitsgruppen für deren eigene Untersuchungen induzierte experimentelle Tumoren verwandt. Schon allein durch diese gemeinsame Verwendung experimentell erzeugter Tumoren läßt sich die Zahl der Tierversuche in der Krebsforschung vermindern.

Perspektiven

Es muß ein möglichst breites Spektrum an Tumoren auf Veränderungen des Pyruvatkinase-Isoenzymgehaltes untersucht werden, um die Sicherheit der Methode zu belegen. Nach den bisherigen Ergebnissen ist zu erwarten, daß durch den Nachweis der Pyruvatkinase-Isoenzyme praktisch alle Tumoren erfaßt werden. Dadurch hat dieser Test gegenüber den anderen Tumormarkern wie CEA, TPA usw. den großen Vorteil, daß er nicht nur für einen Tumortyp bzw. ein eingeschränktes Tumorspektrum verwendbar ist. Dieser Vorteil beruht dar-

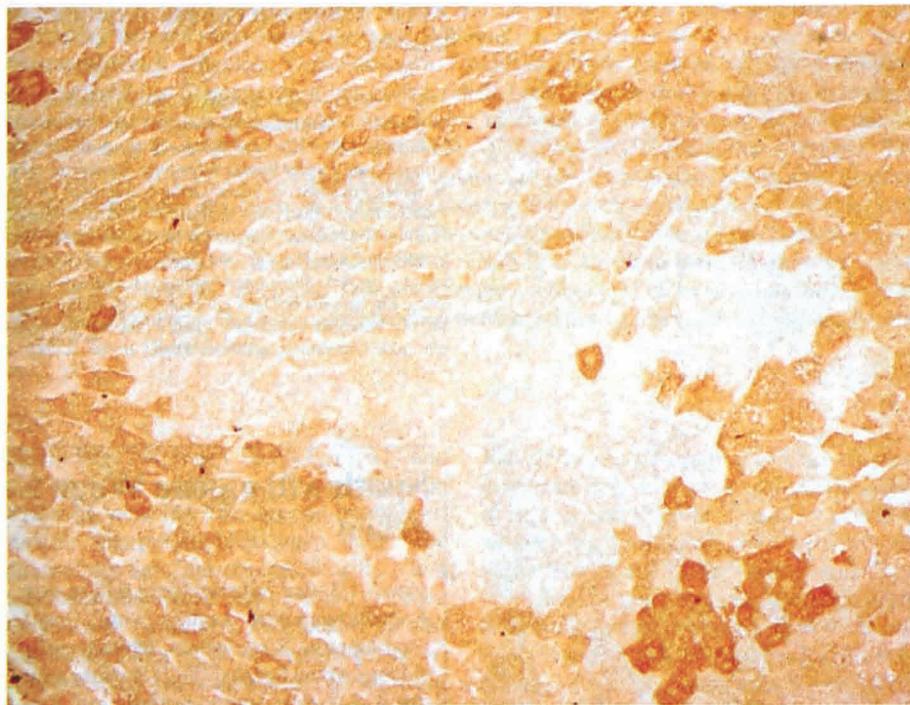


Abb. 3: Verlust von Pyruvatkinase Typ L (heller Herd) in einer Tumorstufe (präneoplastischer Herd) in der Rattenleber.

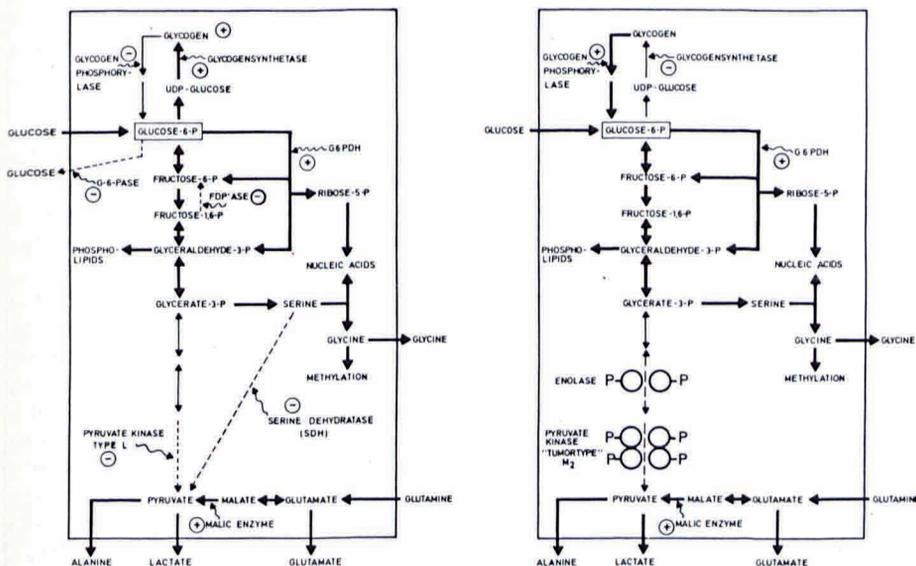


Abb. 4: Schematische Darstellung des Zuckerabbaues in Lebertumoren und ihren Vorstufen (links) sowie in Tumoren, die von M₂-Pyruvatkinase enthaltenden Zellen (rechts) ausgehen. Dicke Pfeile geben die Hauptstoffwechselwege an. Bekannte Aktivitätsänderungen von Enzymen sind mit + bzw. – gekennzeichnet. In der Abbildung links gilt der oberhalb des Glukose-6-Phosphats eingezeichnete Zustand für die Tumorstufen, während in den eigentlichen Tumoren eine ähnliche Situation vorliegt, wie sie in der Abbildung rechts eingezeichnet ist. Im Bereich der Pyruvatkinase unterscheiden sich beide Schemata dadurch, daß in der Abbildung links eine Abnahme der Pyruvatkinase (Typ L) eingetragen ist, während in der Abbildung rechts mehr Pyruvatkinasemoleküle (Typ M₂) vorliegen als in Normalzellen, diese jedoch durch Phosphat einbau – außer im Sauerstoffmangel – weitgehend inaktiviert sind.

auf, daß eine Stoffwechselsituation nachgewiesen wird, wie sie in allen Tumoren vorkommt, unabhängig von der Entstehungsart und unabhängig von dem entstandenen Tumortyp.

Durch die Erzeugung weiterer monoklonaler Antikörper gegen den „Tumortyp“ des Pyruvatkinase-Isoenzym Typ M_2 wird es möglich sein, neben dem immunhistologischen Nachweis von Tumoren schon im

Frühstadium einen Test zur Erkennung solcher „Tumor-Isoenzyme“ im Blut aufzubauen. Ein entsprechender Test für das L-Isoenzym der Pyruvatkinase konnte bereits entwickelt werden, da hierfür inzwischen genügend verschiedene monoklonale Antikörper isoliert und charakterisiert werden konnten.

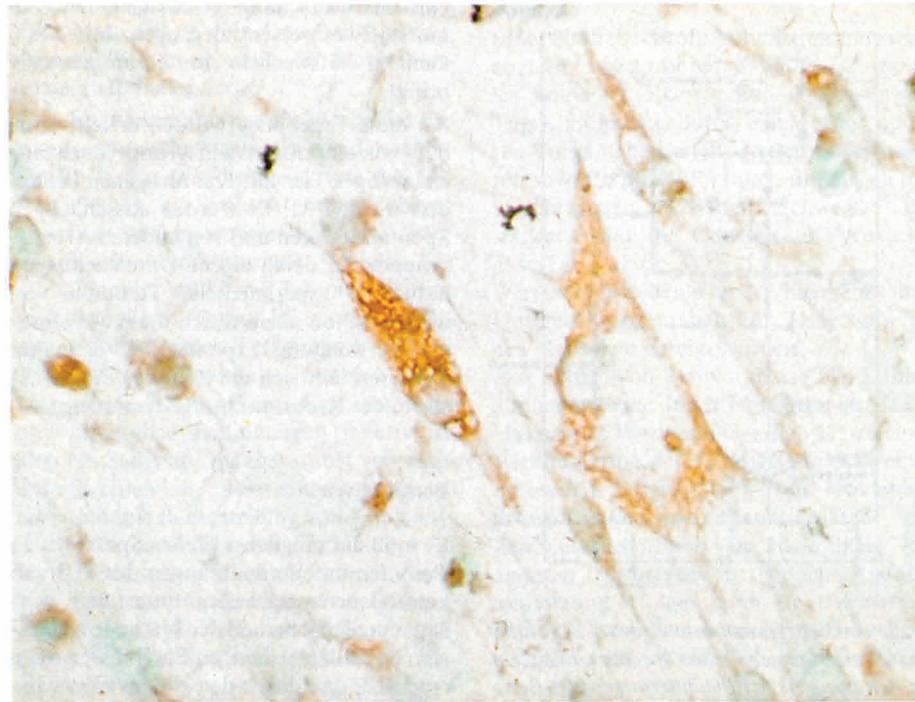


Abb. 5: Nachweis der Pyruvatkinase Typ M_2 in Gewebekulturzellen (embryonale Hühnerfibroblasten) vor (Abbildung oben) und nach (Abbildung unten) der Umwandlung der Zellen in Tumorzellen durch Infektion mit einem tumorerzeugenden Virus (Rous-Sarkom-Virus). In den Tumorzellen (Abbildung unten) ist auch in der Gewebekultur ein starker Anstieg des Gehaltes an M_2 -Pyruvatkinase (Braunfärbung) gegenüber den nur sehr schwach positiven Normalzellen (Abbildung oben) zu erkennen.

Teile dieser Untersuchungen sind in Zusammenarbeit mit folgenden Arbeitsgruppen erhalten und zum Teil bereits in anderen Zeitschriften publiziert worden: Prof. Dr. R. Friis, Ludwig Cancer Research Institute, Bern; Prof. Dr. H. Bauer, Präsident der Justus-Liebig-Universität; Dr. P. Presek, Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie; Prof. Dr. W. Schoner, Institut für Biochemie und Endokrinologie, (alle Gießen) und Prof. Dr. Schulte-Hermann, Institut für Tumor-Biologie-Krebsforschung, Wien. Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. E. Weiss, Institut für Veterinär-Pathologie, Gießen, für die uneingeschränkte Unterstützung dieser Arbeit.

Späth will eigene Wege gehen

(dpa) – Baden-Württemberg will in der Forschungspolitik künftig vom Bund unabhängige Wege gehen. Ministerpräsident Lothar Späth (CDU) erklärte sich am 3. Februar bereit, notfalls auf Zuschüsse des Bundes und der Europäischen Gemeinschaft zu verzichten, um das bisherige Tempo der Forschungsförderung in Baden-Württemberg aufrecht erhalten zu können.

Im Interesse der technischen Entwicklung könne das Land nicht immer abwarten, bis sein Projekt bei der Förderung des Bundes an der Reihe sei. Grundsätzlich meinte Späth bei einem Besuch des Super-Computer-Zentrums der Universität Stuttgart-Vaihingen, es sei damit zu rechnen, daß der Bund seine Forschungsmittel künftig „regionaler“ einsetzen werde. Es gehe nicht an, daß die starken Bundesländer immer genauso viele Fördermittel erhielten wie die schwachen Länder, sagte Späth.

Der CDU-Politiker setzte sich mit Nachdruck für einen europäischen Forschungsverbund ein. Eines Tages müsse es auch zu einer gemeinsamen europäischen Raumfahrt kommen, damit Europa nicht in Abhängigkeit gerate, „auch nicht von Amerika“, meinte er. Baden-Württemberg, das gegenwärtig über einen der leistungsfähigsten Höchstleistungsrechner der Welt, Cray 2, verfügt, wird nach Späths Worten auch bei der nächsten Computergeneration die Nase vorn haben. Beim Kauf von Cray 2 für rund 47,9 Millionen Mark im Jahr 1985 habe er bereits eine Option für Cray 3 erworben.