

DER NACKTMULL ALS EIN MODELLORGANISMUS FÜR KREBSRESISTENZ

Bioinformatische Analysen

Linda Wachholz, Nico Basilowski, Christoph Standfuß, Heike Pospisil

Zusammenfassung

Bei Nacktmullen wurde bisher Tumorentstehung nicht beobachtet. Zur Untersuchung der molekularen Ursachen dient der Nacktmull daher als ein wertvoller Modellorganismus für Krebsresistenz. Ziel dieser Arbeit war eine weiterführende Analyse des kürzlich publizierten Genoms des Nacktmulls. Eine Genvorhersage konnte auf Grundlage der vorhandenen Genom- und Transkriptomdaten durchgeführt und ein hypothetisches Netzwerk der Interaktionen der tumorinduzierenden Faktoren erstellt werden. Dieses Netzwerk basiert auf den Tumorsuppressor-Regulationswegen p53 und RB im Menschen. Die Genom- und Transkriptom-Daten des Nacktmulls weisen deutliche Unterschiede zu den Befunden im Menschen auf. Dieser Befund könnte ein erster Anhaltspunkt für die Aufklärung der molekularen Ursachen der Krebsresistenz von Nacktmullen sein.

Abstract

Naked mole-rats are resistant to both spontaneous cancer and experimentally induced tumorigenesis and are a valuable model organism for the systematic study of tumor progression in humans.

The aim of this work was to further investigate the recently published naked mole-rats genome. Based on public available genomic and transcriptomic data gene prediction was performed successfully both with ab initio methods, as well as with RNA sequence data. With the help of the gene prediction data a hypothetical network of interactions of tumor-inducing factors was created. This network is based on the tumor suppressor pathways p53 and RB, which are to be found in humans. We found clear differences in the genomic and transcriptomic data between human and naked mole-rat for both pathways. Probably, that finding could explain the cancer resistance and should be used for further analyses.

» I. EINLEITUNG

Jährlich erkranken in Deutschland fast eine halbe Million Menschen an Krebs, und etwa jeder vierte Todesfall ist darauf zurückzuführen [Krebs in Deutschland 2012]. Die Suche nach den Ursachen der Entstehung maligner Tumore sowie die Etablierung geeigneter Therapien sind seit vielen Jahren Gegenstand weltweiter Forschungsprojekte: Neben epidemiologischen Studien¹ beschäftigen sich zahlreiche Forschungsinitiativen aus der Biomedizin damit, die molekularen Reaktionswege bei der Tumorentstehung (Karzinogenese) aufzudecken und zu verstehen. In der Tumorbiologie werden molekularbiologische und biochemische Veränderungen von Stoffwechselwegen untersucht. Darüber hinaus umfasst die Krebsforschung auch andere Fachgebiete wie Tumorstudiologie, Infektionsbiologie, molekulare Genetik und Immunologie. Moderne molekularbiologische Techniken (wie Pyrosequenzierung [Margulies et al. 2005], Ionen-Halbleiter-Sequenzierung [Rothberg et

al. 2011], Matrixunterstützte Laserdesorption/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie [Tanaka et al. 1998] oder moderne Mikroskopieverfahren) erlauben mittlerweile die genaue und extrem hochauflösende Identifikation zellulärer Bestandteile und biologischer Moleküle, wie z. B. die Sequenzbestimmung von DNA und RNA. Mithilfe von neuen Sequenzierautomaten können die Basenabfolgen von DNA oder RNA sehr effizient bestimmt werden, da hier mehrere Tausend bis Millionen Sequenzierreaktionen gleichzeitig und automatisiert ablaufen. Während das menschliche Genom (ca. 3,2 Milliarden Buchstaben) im Rahmen des Humangenomprojektes in zehn Jahren sequenziert wurde [Lander et al. 2001], braucht man heute nur noch wenige Tage dafür; neue Technologien sollen dies sogar in wenigen Minuten schaffen [Zhanga et al. 2011].

Mit den o. g. Technologien konnten verschiedene mit Krebs in Zusammenhang stehende Schlüsselproteine, Mutationen, Chromosomenvariationen

und andere molekulare Veränderungen identifiziert werden, die bereits teilweise für die Therapie von malignen Tumoren verwendet werden. Allerdings sind die bisherigen Ergebnisse noch weit davon entfernt, Tumorentstehung als globalen Prozess zu verstehen oder gar zu therapieren.

Die hier vorgestellte Arbeit beschreibt einen anderen, bisher wenig verfolgten Forschungsansatz: Während die meisten Untersuchungen sich damit beschäftigen, die vorhandenen Auslöser von Tumoren zu detektieren, versuchen wir, in solchen Organismen, in denen bisher noch niemals Krebsentstehung beobachtet werden konnte, die entsprechenden Faktoren zu identifizieren, die entweder fehlen oder eine Tumorentstehung verhindern können. Als Modellorganismus wurde dazu der Nacktmull (*Heterocephalus glaber*) ausgewählt (siehe Abb. 1), dessen Genom im November 2011 veröffentlicht wurde [Kim et al. 2011a].

¹ Epidemiologische Studien untersuchen die Zusammenhänge zwischen Tumorentstehung und Krebsauslösern (z. B. Viren, Chemikalien, Toxine, Strahlung, Ernährung, Lebensstil, etc.).



Abb. 1) Abbildung eines Nacktmulls (rechts) im Vergleich zu einer Hausmaus (aus Edrey et al. 2011)

Der Nacktmull ist ein in unterirdischen Bauten lebendes afrikanisches Nagetier mit einigen sehr interessanten biologischen Eigenschaften, weshalb er seit geraumer Zeit bereits als Forschungsobjekt in unterschiedlichen Fachgebieten eingesetzt wird:

1. Für Nacktmulle konnte eine Lebensdauer von bis zu 30 Jahren nachgewiesen werden [Edrey et al. 2011]. Damit ist der Nacktmull das am längsten lebende (bisher bekannte) Nagetier [Buffenstein und Jarvis 2002, Buffenstein 2005] (beispielsweise leben Mäuse, die in der Größe dem Nacktmull vergleichbar sind, nur 4 Jahre). Sie zeigen eine sehr geringe Seneszenz, d. h., es gibt keine altersassoziierte Erhöhung in der Zellsterblichkeit. Darüber hinaus gibt es kaum morphologische oder physiologische Veränderungen im Laufe des Lebens und die Fertilität nimmt nicht ab [Sedivy 2009, Jarvis und Sherman 2002].

2. Nacktmulle weisen eine bei Säugetieren einmalige Lebensform auf: Sie leben in Kolonien, in denen es eine Königin gibt² (sogenannte Eusozialität) [Jarvis 1981].

3. Ihre Schmerzempfindlichkeit ist aufgrund eines fehlenden Moleküls (Substanz P), das sonst bei allen anderen Säugetieren in der Haut vorkommt, vermindert [Park et al. 2008].

4. Nacktmulle sind resistent sowohl gegenüber spontaner als auch experimentell mittels maligner Transformation induzierter Karzinogenese [Seluanov et al. 2009, Sedivy 2009].

Aufgrund der genannten Krebsresistenz wählten wir den Nacktmull als Modellorganismus für eine umfangreiche Sequenzanalyse des im November 2011 veröffentlichten Genoms [Kim et al. 2011a].

» II. HAUPTTEIL

Das Genom des Nacktmulls war auf einem öffentlich zugänglichen Genomsequenz-Server am European Bioinformatics Institute [Stoesser et al. 2012] erhältlich. Die Gesamt-DNA war auf 1.094 Genomabschnitte aufgeteilt. (Normalerweise ist die DNA in Chromosomen angeordnet, die jeweils einen kompletten, lückenlosen DNA-Abschnitt darstellen. Dass hier sehr viel mehr Teilbereiche als Chromosomen³ vorhanden waren, hing mit der unvollständigen Assemblierung⁴ der ermittelten Teilsequenzen zusammen, was auf unvollständige Daten oder viele Teilsequenzen mit häufigen Wiederholungen zurück zu führen sein kann.)

Im Zentrum dieser Arbeit stand zunächst die Analyse der Gene des Nacktmulls mit dem Ziel, diejenigen Gene zu identifizieren, die im Zusammenhang mit der Entstehung von Krebs stehen und sie mit denen des Menschen (und der Maus) zu vergleichen.

Zunächst mussten die auf dem Nacktmull-Genom lokalisierten Gene bestimmt werden. Dazu wurde zum einen auf einen publizierten Datensatz

(Punkt 1) zurückgegriffen und zum anderen Genvorhersagemethoden verwendet, um Gene zu identifizieren (Punkte 2 und 3):

1. Die Gesamt-RNA (Transkriptom) aus sieben verschiedenen Nacktmull-Geweben wurde extrahiert, sequenziert und die (kurzen) Sequenzstücke im Anschluss zu kompletten Genen zusammengesetzt (assembliert). Die ermittelten 22.561 Gene sind in der Datenbank „Naked Mole Rat Database“ öffentlich zugänglich [Kim et al. 2011a, Kim et al. 2011b] und wurden für den Vergleich mit bereits veröffentlichten Nacktmull-Genen herangezogen.

2. Die sogenannte ab-initio-Vorhersage sucht nach charakteristischen Signalen innerhalb einer DNA-Sequenz, die mit bestimmten Wahrscheinlichkeiten innerhalb eines Gens zu finden sind. Mithilfe der Software AUGUSTUS [Stanke und Waack 2003, Stanke et al. 2004] konnten 44.670 kodierende Bereiche vorhergesagt werden [Wachholz 2012].

3. Neben der ab-initio-Vorhersage ist eine Genidentifikation mithilfe von RNA-Sequenzen möglich (siehe Erläuterungen unter Punkt 1). RNA-Sequenzen

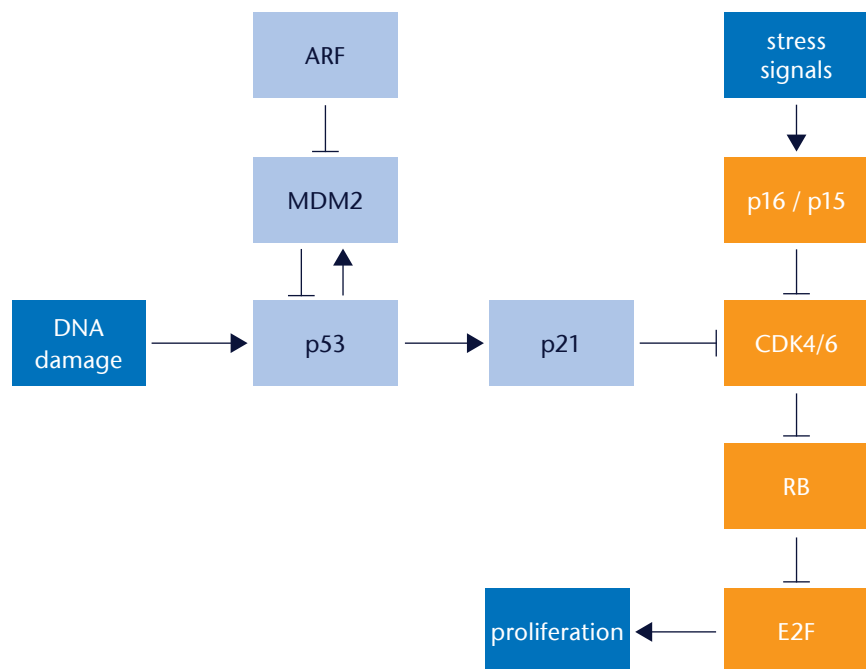


Abb. 2) Darstellung der Schlüsselproteine in Krebsregulationswegen (aus Wachholz 2012).

² Koloniebildung ist beispielsweise bei Ameisen und Bienen bekannt.

³ Der haploide Chromosomensatz des Nacktmulls enthält 30 Chromosomen [Deuve et al. 2008].

⁴ Computer-gestütztes Zusammenfügen von Teilsequenzen zu längeren Sequenzen.

werden als Zwischenprodukt bei der Proteinbiosynthese gebildet, so dass ein gefundenes RNA-Molekül die bei der Proteinbiosynthese abgelesenen DNA-Bereiche repräsentiert und einen verlässlicheren Schluss auf eine Gensequenz zulässt.

Die Übereinstimmung der vorhergesagten Gene im Nacktmull nach den o. g. Methoden lag zwischen 49% und 79% [Wachholz 2012]. Dieser scheinbar geringe Wert ist drauf zurückzuführen, dass RNA-Sequenzen stets nur ein Abbild des Zellzustandes zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion liefern. Allerdings kann dies leicht erklärt werden, da solche Gene, die gerade nicht in die Proteinbiosynthese involviert (exprimiert) sind, mit sequenzbasierten Genvorhersagemethoden nicht identifiziert werden können, weshalb die Zahl der so vorhergesagten Gene (meist) kleiner ist, wenn man keine RNA-Daten von verschiedenen Zellzuständen, Geweben, Entwicklungsstadien usw. verwendet. Zur Untersuchung der tumorrelevanten Proteine im Nacktmull wurden die identifizierten Gene mit den bekannten Gensequenzen in Mensch und Maus

verglichen. Zunächst beschränkten wir uns dabei auf Proteine, die in die Signal- und Stoffwechselwege im Krebs involviert sind (siehe Abb. 2), insbesondere auf die folgenden 10 Moleküle: p14, MDM2, p53, p21, p16, p15, CDK4, CDK6, RB und E2F. Alle diese Gene werden sowohl beim Menschen als auch bei der Maus exprimiert, und ihre Relevanz in der Tumorentstehung wurde für diese Organismen bereits nachgewiesen. Interessanterweise ergaben die Untersuchungen, dass – unabhängig von der Methode zur Genvorhersage – die Gene, die für die Proteine p14 und p16 kodieren, im Genom des Nacktmulls nicht gefunden werden konnten bzw. stark von denen im humanen Genom abweichen [Wachholz 2012]. p16 (Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitor 2A, CDKN2A) spielt eine wichtige Rolle im Zellzyklus und bei der Tumorentstehung [Zorroquiain et al. 2012]. Das Protein p14 entsteht aus demselben Genlocus wie p16, allerdings mit einem alternativen Leserahmen. p16 ist am RB Tumorsuppressor-Regulationsweg und p14 am p53-Tumorsuppressor-Regulationsweg beteiligt. Beide Regulationswege haben eine wichtige Kontrollfunktion im

Zellzyklus und beim sogenannten programmierten Zelltod (Apoptose) [Sherr C] und McCormick 2002, Rous-sel 1999]. Häufig konnten genomische Veränderungen in diesen beiden Regulationswegen in humanen Tumorzellen gefunden werden. Ein hypothetisches Netzwerk der Interaktionen (siehe Abb. 3) zeigt die zentrale Rolle, die p14 und p16 bei der Kontrolle von Zellzyklus, Proliferation und Apoptose nach Schädigungen der DNA spielen. Zusätzlich konnte mit unseren Befunden eine Theorie von Seluanov [Seluanov et al. 2009] gestützt werden, der bei Fibroblasten vom Nacktmull eine sogenannte Kontaktinhibition gefunden hat. Kontaktinhibition bewirkt den Stopp der Zellteilung bei Zellen, die sehr dicht nebeneinander liegen. So wird eine unkontrollierte Wucherung von Zellen in normalen, gesunden Geweben verhindert. In Tumorzellen ist die Kontaktinhibition nicht mehr vorhanden, so dass es zu einer unkontrollierten Zellvermehrung kommt. Bei Nacktmullen existiert eine zweistufige Kontaktinhibition, bei der bereits bei einer geringen Zelldichte die Zellvermehrung gehemmt

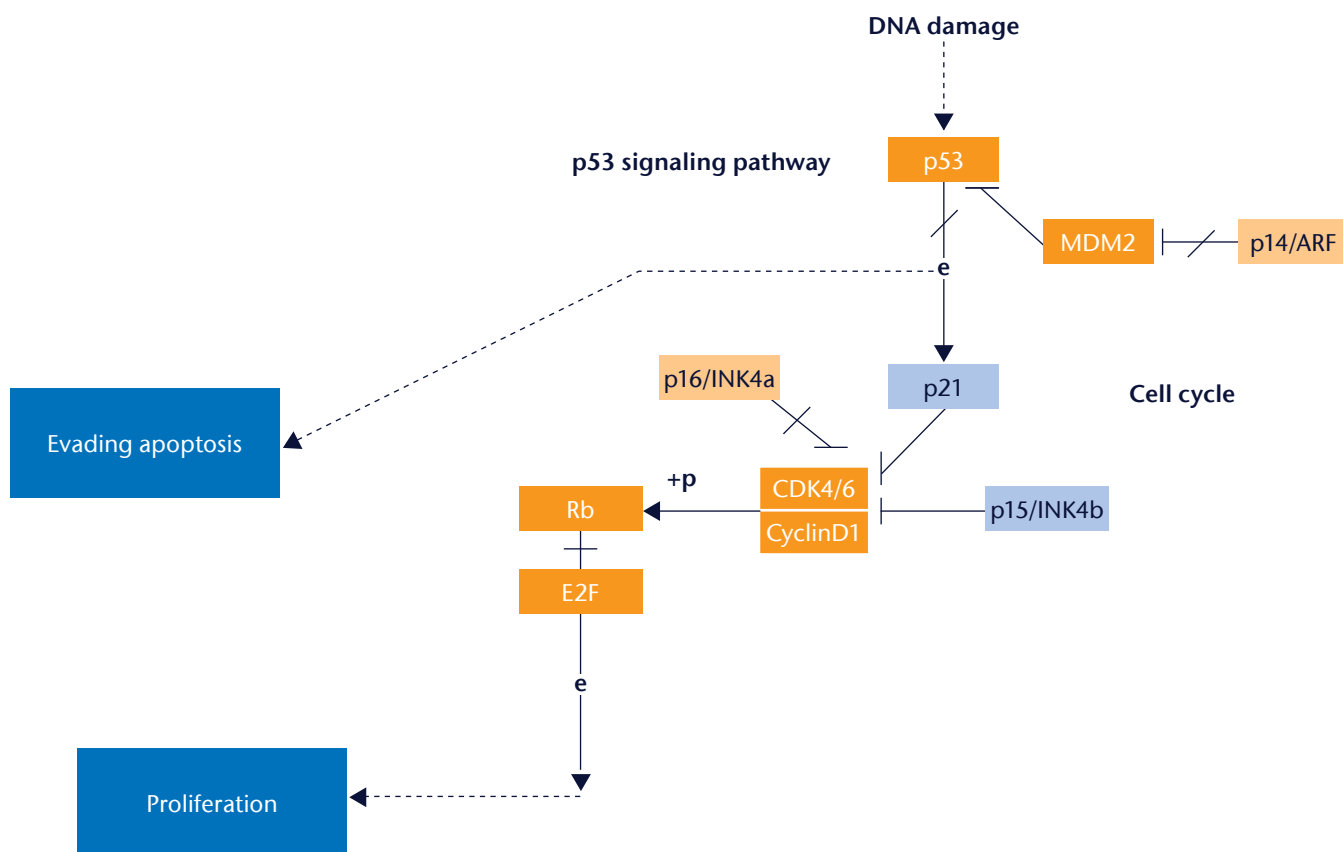


Abb. 3) Hypothetischer Regulationsweg im Tumor. Grün markiert sind die Proteine p14 und p16, für die im Genom des Nacktmulls (bisher) keine Gene identifiziert werden konnten (aus Wachholz 2012).

wird und bei der während der „frühen Kontaktinhibition“ p16 eine entscheidende Rolle spielt.

» III. SCHLUSS

In der vorliegenden Arbeit wurde das Genom des Nacktmulls mit Bioinformatik-Methoden untersucht mit dem Ziel, Schlüsselmoleküle zu identifizieren, die daran beteiligt sein könnten, dass bei diesen Tieren Tumore scheinbar nicht vorkommen. Es konnte gezeigt werden, dass einige der Schlüsselmoleküle zweier Regulationswege, die bei Krebs eine wichtige Rolle spielen (RB- und p53-Tumorsuppressor-Regulationswege), im Nacktmull nicht exprimiert werden. Weitere Analysen müssen zeigen, ob diese Befunde auch bei deutlich mehr experimentellen Daten und einem besser annotierten Nacktmull Bestand haben.

Die Identifikation von krebsregulatorischen Proteinen erlaubt ein verbessertes Verständnis der regulatorischen Prozesse, die zur Tumorentstehung führen können. Der Nacktmull ist für diese Untersuchungen ein erfolgversprechender Modellorganismus.

LITERATURVERZEICHNIS

- Buffenstein, R., Jarvis, JUM (2002): The naked mole-rat – a new record for the oldest living rodent. *Sci Aging Knowledge Environ.* 21: pe7.
- Buffenstein, R. (2005): The naked mole-rat: a new long-living model for human aging research. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 60: 1369–1377.
- Deuve, J. L., Bennett, N. C., Britton-Davidian, J., Robinson, T. J. (2008): Chromosomal phylogeny and evolution of the African mole-rats (Bathyergidae). *Chromosome Research* 16: 57–74.
- Edrey, Y. H., Hanes, M., Pinto, M., Mele, J., Buffenstein, R. (2011): Successful aging and sustained good health in the naked mole rat: a long-lived mammalian model for biogerontology and biomedical research. *ILAR J*, 52(1): 41–53.
- Jarvis, JUM. (1981): Eusociality in a mammal: cooperative breeding in naked mole-rat colonies. *Science*, 212: 571–573.
- Kim, E. B., Fang, X., Fushan, A. A., Huang, Z., Lobanov, A. V., Han, L., Marino, S. M., Sun, X., Turanov, A. A., Yang, P., Yim, S. H., Zhao, X., Kasaikina, M. V., Stoletzki, N., Peng, C., Polak, P., Xiong, Z., Kiezun, A., Zhu, Y., Chen, Y., Kryukov, G. V., Zhang, Q., Peshkin, L., Yang, L., Bronson, R. T., Buffenstein, R., Wang, B., Han, C., Li, Q., Chen, L., Zhao, W., Sunyaev, S. R., Park, T. J., Zhang, G., Wang, J., Gladyshev, V. N. (2011a): Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat. *Nature* 479: 223–227.
- Kim, E. B., Fang, X., Fushan, A. A., Huang, Z., Lobanov, A. V., Han, L., Marino, S. M., Sun, X., Turanov, A. A., Yang, P., Yim, S. H., Zhao, X., Kasaikina, M. V., Stoletzki, N., Peng, C., Polak, P., Xiong, Z., Kiezun, A., Zhu, Y., Chen, Y., Kryukov, G. V., Zhang, Q., Peshkin, L., Yang, L., Bronson, R. T., Buffenstein, R., Wang, B., Han, C., Li, Q., Chen, L., Zhao, W., Sunyaev, S. R., Park, T. J., Zhang, G., Wang, J., Gladyshev, V. N. (2011b): Transcriptome sequencing of naked mole rat, *Heterocephalus glaber*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE30337>.
- Krebs in Deutschland 2007/2008 (2012): 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin.
- Lander ES et al. (International Human Genome Sequencing Consortium) (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860–921.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y. J., Chen, Z., Dewell, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Gomes, X. V., Godwin, B. C., He, W., Helgesen, S., Ho, C. H., Irzyk, G. P., Jando, S. C., Alenquer, M. L., Jarvie, T. P., Jirage, K. B., Kim, J. B., Knight, J. R., Lanza, J. R., Leamon, J. H., Lefkowitz, S. M., Lei, M., Li, J., Lohman, K. L., Lu, H., Makhiyani, V. B., McDade, K. E., McKenna, M. P., Myers, E. W., Nickerson, E., Nobile, J. R., Plant, R., Puc, B. P., Ronan, M. T., Roth, G. T., Sarkis, G. J., Simons, J. F., Simpson, J. W., Srinivasan, M., Tartaro, K. R., Tomasz, A., Vogt, K. A., Volkmer, G. A., Wang, S. H., Wang, Y., Weiner, M. P., Yu, P., Begley, R. F., Rothberg, J. M. (2005): Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376–380.
- Park, T. J., Lu, Y., Jüttner, R., Smith, E. S. J., Hu, J., Brand, A., Wetzel, C., Milenkovic, N., Erdmann, B., Heppenstall, P. A., Laurito, C. E., Wilson, S. P., Lewin, G. R. (2008): Selective Inflammatory Pain Insensitivity in the African Naked Mole-Rat (*Heterocephalus glaber*). *PLoS Biol* 6: e13.
- Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J. H., Johnson, K., Milgrew, M. J., Edwards, M., Hoon, J., Simons, J. F., Marran, D., Myers, J. W., Davidson, J. F., Branting, A., Nobile, J. R., Puc, B. P., Light, D., Clark, T. A., Huber, M., Branciforte, J. T., Stoner, I. B., Cawley, S. E., Lyons, M., Fu, Y., Homer, N., Sedova, M., Miao, X., Reed, B., Sabina, J., Feierstein, E., Schorn, M., Alanjary, M., Dimalanta, E., Dressman, D., Kasinskas, R., Sokolsky, T., Fidanza, J. A., Namsaraev, E., McKernan, K. J., Williams, A., Roth, G. T., Bustillo, J. (2011): An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475: 348–352.
- Roussel, M. F. (1999): The ink4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene*, 18: 5311–5317.
- Sedivy, J. M. (2009): How to learn new and interesting things from model systems based on „exotic“ biological species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (46): 19207–19208.
- Seluanov, A., Hine, C., Azpurua, J., Feigenson, M., Bozzella, M., Mao, Z., Catania, K. C., Gorbunova, V. (2009): Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(46): 19352–19357.
- Sherr, C.J., McCormick, F. (2002): The rb and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, 2: 103–112.
- Sherman, P. W., Jarvis, JUM. (2002): *Heterocephalus glaber*. *Mammalian Species* 706, 1–9.
- Stanke, M., Waack, S. (2003): Gene prediction with a hidden markov model and a new intron submodel. *Bioinformatics*, 19 Suppl 2:ii215–ii225.
- Stanke, M., Steinkamp, R., Waack, S., Morgenstern, B. (2004): Augustus: a web server for gene finding in eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 32 (Web Server issue): W309–W312.
- Stoesser, G., Baker, W., van den Broek, A., Camon, E., Garcia-Pastor, M., Kanz, C., Kulikova, T., Leinonen, R., Lin, Q., Lombard, V., Lopez, R., Redaschi, N., Stoehr, P., Tuli, M.A., Tzouvara, K., Vaughan, R. (2012): The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Res*, 30: 21–26.
- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T., Matsuo, T. (1988): Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2: 151–153.
- Wachholz, L. (2012): Bioinformatische Genomuntersuchung und systembiologische Modellierung zur Beschreibung von tumorinduzierenden Interaktionen in *Heterocephalus glaber*. Masterarbeit Technische Hochschule Wildau [FH].
- Zoroquiain, P., Fernandes, B. F., González, S., Novais, G. N., Schalper, K. A., Burnier, M. N. Jr. (2012): p16ink4a expression in benign and malignant melanocytic conjunctival lesions. *Int J Surg Pathol.* 20: 240–245.
- Zhang, J., Chiodini, R., Badr, A., Zhang, G. (2011): The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of Genetics and Genomics* 38: 95–109.

AUTORENANGABEN

Linda Wachholz, M.Sc.

Biosystemtechnik/Bioinformatik
TH Wildau [FH]
linda.wachholz@th-wildau.de

Nico Basilowski, M.Sc.

Biosystemtechnik/Bioinformatik
TH Wildau [FH]
nico.basilowski@th-wildau.de

Christoph Standfuß, M.Sc.

Bioinformatik (Freie Universität Berlin), wissenschaftlicher Mitarbeiter an der TH Wildau [FH] in der Arbeitsgruppe Bioinformatik/High Performance Computing in Sciences christoph.standfuss@th-wildau.de

Prof. Dr. rer. nat. Heike Pospisil

Arbeitsgruppe Bioinformatik/High Performance Computing in Sciences
TH Wildau [FH]
heike.pospisil@th-wildau.de