

Retroviren und Onkogene I (Nobel-Vortrag)**

Von Harold E. Varmus*

Einleitung

In den folgenden beiden Vorträgen möchten Ihnen *Mike Bishop*^[***] und ich eine Geschichte erzählen, in der Retroviren, Onkogene, unsere persönliche Vergangenheit und die Entwicklung der Tumorstudiologie eng miteinander verknüpft sind. Sie beginnt mit einigen einfachen Fragen über Ursprung und Verhalten von viralen Genen und führt uns an einen Punkt, von dem aus sich viele Eigenschaften von Retroviren und tierischen Zellen überblicken lassen, einschließlich der Abweichungen, die zu Krebs führen können. Heute wissen wir, daß Retroviren normale Zellgene übernehmen und in krebserzeugende Gene, sogenannte Onkogene, umwandeln; solche Transduktionen sind selten, beruhen aber auf den normalen Ereignissen im komplizierten Lebenszyklus von Viren. Die Retroviren haben den Zugang zu mehr als vierzig zellulären Genen eröffnet, die in Onkogene übergehen können; einige erwiesen sich als Teile viraler Genome, andere wiederum wurden als genetisches Ziel viraler Insertionsmutationen identifiziert.

Wir hatten das Glück, an einem guten Teil der Experimente mitzuarbeiten, die zur Etablierung dieser Prinzipien führten. Aber wir haben dazu die Hilfe vieler talentierter Menschen in unserem Laboratorium an der University of California, San Francisco (UCSF), und ebenso die Zusammenarbeit mit und die freundliche Konkurrenz von anderen Gruppen gebraucht. (Ich werde so viele Namen wie möglich erwähnen, aber ich muß mich bei jenen geschätzten Kollegen, die hier unvermeidlicherweise nicht genannt werden, entschuldigen.) In unserer Geschichte kommen auch mehrere Viren vor; das Rous-Sarcoma-Virus spielt jedoch die Hauptrolle – ein weiterer Tribut an die Pionierarbeit von *Peyton Rous* und an das Prinzip der späten Anerkennung in der Wissenschaft. Das Rous-Virus, das Ergebnis seiner Beharrlichkeit bei der Erforschung eines einzigen Hühnertumors vor beinahe achtzig Jahren^[1], war das einzige Retrovirus, das die genetischen und biochemischen Anforderungen für unsere Arbeiten in der Ära vor der molekularen Klonierung erfüllen konnte.

Ein erster Vorgeschmack der Molekularbiologie: Hybridisierung mit dem *lac*-Operon

Nach heutigem Standard habe ich mich der Wissenschaft erst gefährlich spät gewidmet. Als Student am Amherst

College galt mein Interesse hauptsächlich den Novellen von *Dickens* und dem Antiestablishment-Journalismus, während ich mich nebenbei auf ein Medizinstudium vorbereitete. An der Harvard Graduate School habe ich mich dann zunächst einmal mit angelsächsischer und metaphysischer Dichtung beschäftigt, bevor ich an der Columbia University das Medizinstudium mit der Absicht begann, Psychiater zu werden. Bald aber veränderten sich meine Ambitionen in Richtung auf eine akademische Karriere als Internist. Daher bewarb ich mich 1966, wie viele meiner Kollegen, gleich nach der Promotion für eine Forschungsausbildung bei den National Institutes of Health. Vielleicht weil seine Frau Dichterin war, nahm mich *Ira Pastan* trotz meiner mangelnden naturwissenschaftlichen Erfahrung in sein Laboratorium.

Damals untersuchte *Ira* die biochemischen Wirkungen des thyreotropen Hormons (TSH) auf Gewebeschnitte, ein Thema, das der klinischen Endokrinologie nahe genug war, um nicht abschreckend auf mich zu wirken. Aber eines Tages, als ich noch Assistenzarzt am Columbia-Presbyterian Hospital war, sagte mir *Ira* am Telefon, daß ein Vortrag von *Earl Sutherland* ihn veranlaßt habe, mit Arbeiten über die Wirkungen von cyclischem AMP auf die Regulation des *lac*-Operons in *E. coli* zu beginnen. Spät abends am selben Tag, allein in der Hausbibliothek, blätterte ich das erste Mal im *Journal of Molecular Biology* – es ist der Columbia University hoch anzurechnen, daß diese Zeitschrift vorhanden war – und versuchte, die grundlegenden Artikel über das *lac*-Operon von *Jacob* und *Monod*^[2] nachzulesen. Ich wußte damals, daß mein Leben sich ändern würde.

Die Naturwissenschaften bestehen zum großen Teil aus der Durchführung von Messungen, und ich lernte schnell von *Ira*, daß eine neue Meßmethode sehr viel wichtiger als eine alte Theorie sein kann. Er und *Bob Perlman* hatten gerade entdeckt, daß cyclisches AMP die katabolische Repression des *lac*-Operons aufhebt^[3]. Sie schlugen mir vor, mit der relativ neuen Technik der molekularen Hybridisierung die Frage zu klären, ob die Regulation durch cyclisches AMP auf der Transcriptionsebene stattfindet. Bei dieser Methode hatte man nicht nur das Vergnügen, Resultate zu bekommen (nach *Gunther Stent* sind Resultate wunderbar, weil sie uns etwas geben, worüber wir reden können^[4]), sondern sie war auch intellektuell überaus ansprechend, da sie eindeutige Veränderungen bei der Synthese der *lac*-mRNA zeigte und damit die Unklarheiten der Hypothese beseitigte^[5]. Außerdem bestimmten die technischen Feinheiten dieser Meßmethoden mein späteres Denken über Probleme beim Nachweis einzelner Gene in komplizierteren eukaryotischen Zellen. Wir hybridisierten isotonenmarkierte *E.-coli*-RNA mit filtergebundener DNA aus zwei Bakteriophagen, die sich nur dadurch unterschieden, daß bei einem das *lac*-Operon fehlte; um die unspezifische Hybridisierung so gering wie möglich zu halten, gaben wir als Kompetitor unmarkierte RNA aus einer *E.-coli*-Mutante bei, die eine Deletion des *lac*-Operons hatte – eine ästhetische Verbindung von Genetik und Molekularbiologie, ebenso erfreulich wie die Resultate selbst!

[*] Prof. Dr. H. E. Varmus
Department of Microbiology and Immunology and
Department of Biochemistry and Biophysics
University of California, San Francisco
San Francisco, CA 94 143 (USA)

[**] Copyright © The Nobel Foundation 1990. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.

[***] J. M. Bishop, *Angew. Chem.* 102 (1990) 765; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 29 (1990) Nr. 7.

Einführung in die Provirus- und die Virogen-Onkogen-Hypothese

Ende der sechziger Jahre gab es als ungewöhnliches Angebot am NIH Abendkurse für Ärzte, die noch mit dreißig Jahren versuchten, in die naturwissenschaftliche Forschung zu gehen. Zwei dieser Kurse beeinflussten meine spätere Arbeit. Sie führten mich an wichtige Probleme heran, von denen ich glaubte, daß sie mit den Methoden gelöst werden konnten, die ich mir in meiner kurzen Lehrzeit angeeignet hatte.

Wie viele meiner Kollegen war ich von der Aussicht begeistert, reduktionistische Methoden auf eukaryotische Organismen anzuwenden und so Informationen über menschliche Krankheiten zu erhalten. Aus Veröffentlichungen vom Anfang der sechziger Jahre, die ich recht spät gelesen hatte, wußte ich genug über Viren und ihre Beziehung zu Tiertumoren, um zu verstehen, daß sie einen relativ einfachen Zugang zu einem so komplizierten Problem wie Krebs ermöglichen könnten. In der Tat schienen Viren für alle, die sich für die genetischen Grundlagen der Krebsentstehung interessierten, das einzig vielversprechende Forschungsobjekt zu sein. Ich wurde damals auf zwei ziemlich einfache, aber ketzerische Hypothesen aufmerksam, die beschrieben, wie Gene von RNA-Tumoviren sich mit Chromosomen der Wirtzellen vermischen.

Die gewagtere der beiden, die Provirus-Hypothese, wurde erstmalig von *Howard Temin*^[6] vorgebracht. (*John Bader*, einer unserer NIH-Dozenten, war einer der wenigen, die für diese Hypothese öffentlich eintraten^[7].) Die Provirus-Hypothese besagte, daß Gene von RNA-Tumoviren in DNA kopiert würden und sich stabil mit der Wirtzelle verbanden; die Provirus-DNA lieferte dann die Information zur Erzeugung neuer Viruspartikel. Die Hypothese wurde hauptsächlich – manche sagten auch kläglich – durch Studien mit Inhibitoren der DNA- und RNA-Synthese gestützt. Sie schien jedoch nicht ganz plausibel, da bis dahin noch kein Informationstransfer von RNA zu DNA bekannt war. Es war verlockend, eine grundlegende Entscheidung über das Provirus mit der molekularen Hybridisierung herbeizuführen.

Die andere Hypothese, die Virogen-Onkogen-Hypothese, war komplizierter^[8]. *George Todaro* und *Robert Huebner* schlugen vor, daß normale Zellen auch Gene enthalten müssen, die mit den in RNA-Tumoviren gefundenen Genen verwandt sind, da Virusproteine auch häufig in Zellen anscheinend nicht infizierter Tiere gefunden wurden, besonders bei Hühnern und Mäusen. Solche als Tumorgene (Virogene) bekannten Gene sollten als Teile von Chromosomen vertikal weitergegeben werden, als Reaktion auf eine Fülle von Reizen exprimiert werden und durch Infektion der Keimzellen irgendwann in der Vergangenheit erworben worden sein. Da bekannt war, daß einige RNA-Tumoviren besonders stark onkogenetisch wirksam sind, wurde außerdem vermutet, daß tumorinduzierende Gene solcher Viren (virale Onkogene) auch in der Keimzellbahn infolge urzeitlicher Infektionen weitergegeben würden. Die Aktivierung dieser endogenen viralen Onkogene könnte durch Carcinogene wie Chemikalien, ionisierende Strahlung und andere Viren erfolgen und den neoplastischen Prozeß in Gang setzen.

Übergang zur RNA-Tumovirologie in revolutionären Zeiten

Im Sommer 1969 verband ich einen Rucksackurlaub in Kalifornien mit der Suche nach einem geeigneten Platz zum Studium von Tumoviren. Ich besuchte auf einen Hinweis von *Harry Rubin* in Berkeley hin *Mike Bishop*, *Leon Levinow* und *Warren Levinson*, die gerade angefangen hatten, mit Rous-Sarcoma-Viren an der UC San Francisco zu arbeiten. (Es sei angemerkt, daß *Rubin* mir zuerst ein Treffen mit *Peter Duesberg* empfohlen hatte, der aber gerade nicht in der Stadt war.) Ein kurzes Gespräch mit *Mike* reichte, um mich von unserer intellektuellen Kompatibilität zu überzeugen (eine der wenigen Überzeugungen, die glücklicherweise auch nach zwanzig Arbeitsjahren auf diesem Gebiet noch Bestand hat), und ich plante, bei der UCSF-Gruppe als „post-doctoral fellow“ ab dem nächsten Sommer mitzuarbeiten.

Noch bevor das Jahr vorüber war, veränderten jedoch zwei große Entdeckungen die gesamte Tumovirologie. Es gelang *Satoshi Mizutani* und *Temin*^[9] sowie *David Baltimore*^[10], das vorhergesagte Enzym – die reverse Transcriptase – in Virusteilchen zu finden. Die Zweifel an der Provirus-Hypothese wurden so weitgehend beseitigt, da nunmehr die Synthese der häretischen DNA-Kopie von einem RNA-Genom möglich war. Es gelang *Steve Martin*, eine überaus wichtige Mutante des Rous-Sarcoma-Virus zu isolieren^[11], die die Fähigkeit zur Transformation von Zellen bei erhöhter Temperatur verliert, sie jedoch wiedererlangt, sobald die Temperatur gesenkt wird. Mit *Martins* Mutante konnte zum ersten Mal das später von uns so benannte *src*-Gen definiert werden. Zugleich wurde gezeigt, daß durch dieses Gen – und auch durch das vom Gen codierte Protein – die Transformation eingeleitet und aufrechterhalten wurde. Da die Virusmutante auch bei solchen Temperaturen normal wuchs, bei denen sie unfähig zur Transformation von Zellen war, ließen sich onkogene von replikativen Funktionen trennen. Dieser Befund wird in dieser Geschichte bald wieder zur Sprache kommen.

Erste Exkurse mit dem Rous-Sarcoma-Virus: Die Suche nach proviraler DNA

Die reverse Transcriptase wurde als starke Stütze der Provirus-Hypothese freudig begrüßt. Es schien aber doch wichtig zu sein, das Provirus direkt nachzuweisen, am naheliegendsten durch molekulare Hybridisierung, und seinen Syntheseweg speziell in infizierten Zellen und nicht nur in vitro zu verfolgen. Die reverse Transcriptase bot sich erfreulicherweise dazu an, diese Aufgabe zu vereinfachen, und zwar durch die Synthese potentiell leistungsfähiger Sonden; gedacht war an radioaktive, virusspezifische, von einer Virus-RNA-Matrize kopierte DNA.

Rückblickend erscheinen meine anfänglichen Bemühungen, diese Probleme zu lösen, teils frustrierend, teils wie eine Donquichotterie – dennoch wurden die Ergebnisse in bekannten Journalen veröffentlicht. Anfangs verwendeten wir Doppelstrangprodukte der reversen Transcriptase aus Rous-Sarcoma-Virus (RSV) zur Hybridisierung, um die Zunahme von Genkopien anhand der Beschleunigung der Reassoziations durch zelluläre DNA zu messen^[12]. Allerdings wurde die RNA-Matrize durch die reverse Transcriptase in vitro

ungleichmäßig kopiert^[13], so daß die Produkte komplizierte Hybridisierungskinetiken aufwiesen und somit nicht das einheitliche Virusgenom (dessen genetische Zusammensetzung noch unbekannt war) repräsentierten. Als ich versuchte, RSV-verwandte DNA in nichtinfizierten und RSV-infizierten Hühnerzellen zu messen, fanden sich multiple Kopien der virusverwandten DNA in den normalen Zellen, was zumindest einige Aspekte der Virogen-Onkogen-Hypothese zu bestätigen schien^[14]. Aber der erwartete RSV-DNA-Anstieg in den infizierten Hühnerzellen ließ sich nicht zeigen, bis ich dazu überging, Einzelstrang-DNA als Sonde zu verwenden^[15]. Zu diesem Zeitpunkt hatte *Paul Neiman* die Zunahme aber schon durch Hybridisierung mit isotonenmarkierter RNA aus Virionen nachgewiesen^[16]. Und inzwischen hatten *Hill* und *Hillova* auf einem gänzlich anderen Weg, nämlich durch DNA-Transfektion, überzeugendere Beweise für die Provirus-Hypothese gefunden^[17]. Sie gaben DNA aus RSV-infizierten Zellen zu neuen Zellen und konnten aus diesen das Originalvirus gewinnen. Es mußte daher das komplette Virusgenom in der DNA der infizierten Zellen vorhanden gewesen sein.

Unsere Versuche mit Proviren wurden dadurch erleichtert, daß ich von Hühnerzellen, den traditionellen Wirtszellen für RSV-Kulturen, abging und statt dessen Zellen anderer Vogelarten – Ente und Wachtel – und von Säugern einsetzte^[18]. Weil wir vor der Infektion in diesen Zellen wenig virusverwandte DNA finden konnten, war es ziemlich einfach, die Zunahme neuer RSV-DNA-Kopien nach der Infektion zu messen, den Zeitverlauf der DNA-Synthese zu verfolgen, zu zeigen, daß die reverse Transkription im Cytoplasma stattfindet, und lineare, zirkuläre und integrierte Formen viraler DNA zu definieren^[19].

Herstellung einer Sonde zur Prüfung der Virogen-Onkogen-Hypothese

Das unterschiedliche Vermögen normaler Vogel-DNA zur Hybridisierung mit DNA-Sonden, die von RSV stammten, lenkte unsere Aufmerksamkeit auf einige Arten virusverwandter DNA-Sequenzen, die wir in Hühner-DNA fanden. Waren diese Sequenzen Gene für virale Strukturproteine? Wichtiger noch, enthielten sie virale Transformationsgene, so wie die Onkogen-Virogen-Hypothese voraussagte? Für die Klärung dieser Fragen war es unbedingt erforderlich, Sonden zu bekommen, die wesentlich genauer definiert waren. Das war Anfang der siebziger Jahre, bevor die Restriktionskartierung und die molekulare Klonierung zur Verfügung standen, keine leichte Aufgabe für uns.

Ein wirksames Reagens war allerdings vorhanden. 1971 berichtete *Peter Vogt* über die Isolierung von Transformationsdefekten und replikationskompetenten RSV-Mutanten^[20]. *Duesberg* et al. konnten zeigen, daß die genomischen RNA-Untereinheiten dieser „td“-Mutanten etwa 15 % kürzer waren als die Untereinheiten des Virus-Wildtyps^[21]. Die vorläufige Interpretation war, daß die fehlenden Sequenzen (die ursprünglich „x“, später „sarc“ genannt wurden) einen Teil oder das ganze virale Transformationsgen (*v-src*) enthielten, das zuvor durch die temperaturempfindlichen (*ts*) Mutanten definiert worden war. Wie die *ts*-Mutanten von *Martin* waren die Deletionsmutanten, trotz des ausgedehnten Sequenzverlustes, noch fähig zur Replikation, und es war

verlockend zu vermuten, daß sich die Deletion vollständig oder zumindest weitgehend mit dem transformierenden Gen deckte.

Mike und ich kannten diese Mutmaßungen sehr gut, da wir mit den von *Vogt* und *Duesberg* geleiteten ebenfalls in Kalifornien gelegenen Laboratorien zusammenarbeiteten und wir uns in etwa sechswöchigem Abstand in Los Angeles oder der Bay Area trafen. Während dieser Diskussionen

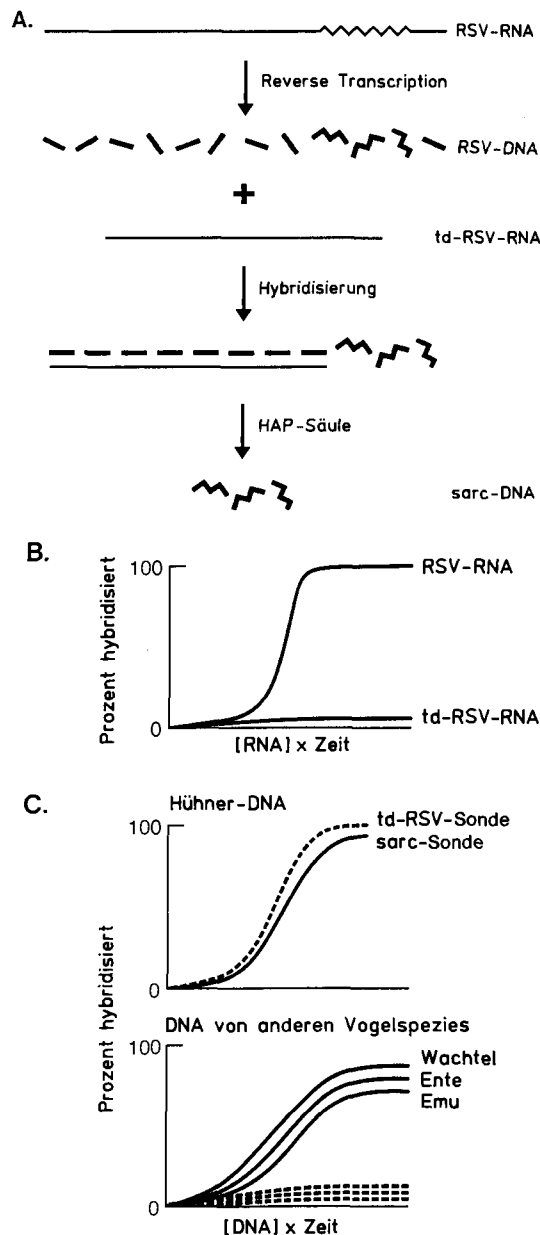


Abb. 1. Schematische Zusammenfassung der ersten Experimente mit der sarc-Sonde (siehe [22] und [23] für Primärdaten und weitere Einzelheiten). Diagramm A: Radioaktiv markierte sarc-spezifische DNA wurde hergestellt, indem die Produkte der reversen Transkription von RSV-RNA mit der RNA einer Transformationsdefekten Deletionsmutante von RSV (td-RSV) hybridisiert wurden. Die Grundlagen der Methode werden im Text beschrieben. Dünne Striche stellen RNA dar, dicke Striche DNA und Zickzacklinien sarc-Sequenzen (d.h. Sequenzen, die in RSV-, aber nicht in td-RSV-Genomen vorkommen). HAP = Hydroxylapatit. Diagramm B: sarc-DNA ist spezifisch für Sequenzen, die RSV und td-RSV unterscheiden. Die Sonde wurde mit RSV-RNA und td-RSV-RNA hybridisiert; die Ergebnisse wurden durch HAP-Chromatographie ermittelt. Diagramm C: Die sarc-Sonde (durchgezogene Linien) hybridisiert mit der DNA vieler Vogelspezies. Im Gegensatz dazu hybridisieren Sonden der anderen Anteile des RSV-Genoms (td-RSV-Sonde, gestrichelte Linien) nur schwach mit der DNA anderer Spezies als Huhn. Der Grad der Hybridisierung (die gezeigten Werte sind normiert) wurde durch HAP-Chromatographie ermittelt.

wurde uns klar, daß wir eine annähernd spezifische Sonde für das RSV-Transformationsgen hätten, wenn wir radioaktive DNA herstellen könnten, die spezifisch für die deletierten Sequenzen in td-RSV-Mutanten ist.

Unsere Strategie dafür war im Prinzip einfach, in der Durchführung jedoch schwierig (Abb. 1 A). Wir synthetisierten isotopenmarkierte Einzelstrang-DNA-Fragmente an einer Wildtyp-RSV-RNA-Matrize, die dann mit td-RSV-RNA hybridisiert wurden, um unerwünschte Anteile durch Chromatographie an Hydroxylapatit unter Zurücklassung der sarc-spezifischen DNA entfernen zu können. Als erster hat *Ramareddy Guntaka* diesen Versuch durchgeführt und einige ermutigende Ergebnisse erhalten. Schließlich gelang es *Dominique Stehelin*, eine sarc-Sonde herzustellen, die äußerst strengen Anforderungen genügte: Fast vollständige Hybridisierung mit RSV-RNA, keine signifikante Hybridisierung mit td-RSV-RNA (Abb. 1 B) und Repräsentation von mehr als 10 % des RSV-Genoms – fast der gesamten sarc-Region – in der Sonde^[22].

Entdeckung konservierter Sequenzen in Vogel-DNA mit der sarc-Sonde

Als *Stehelin* die sarc-Sonde mit normaler Hühner-DNA inkubierte, hybridisierte sie weitgehend (wie natürlich auch die aus td-RSV-RNA erzeugten Sonden) (Abb. 1 C). Diese aufregenden Ergebnisse waren noch alle mit der ursprünglichen Onkogen-Virogen-Hypothese konsistent. Um so größer war unsere Aufregung, als die nächsten Befunde ihr zu widersprechen schienen: Während sich die „virogene“ Sonde aus td-RSV nur schwach mit DNA-Sonden mehrerer anderer Vogelspezies zu Hybriden umsetzte, hybridisierte die sarc-Sonde weitgehend sogar mit der DNA des australischen Emus – eines Rattiten, der in der Evolution ziemlich weit vom Huhn entfernt ist (wie wir von unserem Kollegen *Allan Wilson* aus Berkeley erfuhren)^[23]. Das große Ausmaß und die Verlässlichkeit der Hybridisierung mit der sarc-Sonde zeigten, daß ihre Homologen in normalen Zellen sich während der Evolution der Vögel mit einer ähnlichen Geschwindigkeit auseinander entwickelt hatten wie die zellulären Gene, die bei den wenigen früheren Exkursen in die molekulare Evolution benutzt worden waren. Das legt nahe, daß diese Sequenzen mindestens über hundert Millionen Jahren konserviert worden waren.

Unsere Folgerungen aus diesen Ergebnissen erscheinen rückblickend, da wir wissen, daß sie zutreffen, noch kühner als damals^[23]. Wir sagten, daß das RSV-Transformationsgen tatsächlich in der normalen zellulären DNA vorkommt, aber nicht in der durch die Virogen-Onkogen-Hypothese vorhergesagten Weise. Statt dessen schlugen wir vor, daß das zelluläre Homologe ein normales Zellgen sei, das bei der Entstehung von RSV in leicht veränderter Form in das retrovirale Genom übernommen worden war. Dieser Vorläufer des viralen Onkogens schien – wie auch durch seine Konservierung während der Evolution angedeutet wird – keineswegs ein schädlicher Bestandteil gewesen zu sein, der nur auf ein carcinogenes Signal wartete, sondern hatte wohl eine für den Organismus wertvolle Funktion. Da das virale *src*-Gen es dem RSV ermöglicht, Tumoren zu induzieren, vermuteten wir, daß sein zelluläres Homologes normalerweise jene Prozesse beeinflusst, die bei der Tumorentstehung fehlgesteuert

werden: Die Kontrolle des Wachstums oder der Entwicklung der Zellen.

Erhärtung der Ergebnisse: sarc repräsentiert das c-src-Proto-Onkogen

Trotz der Erfolgsmeldungen blieben nach den ersten Experimenten mit der sarc-Sonde noch viele Fragen offen.

Die drängendste Frage, und die erste in den Köpfen unserer Kritiker, scheint heute zugleich grundlegend und banal: Hatte die sarc-Sonde tatsächlich ein funktionelles, protein-codierendes Homologes des viralen Transformationsgens (*v-src*) aufgespürt, oder hatten uns die immer noch schlecht definierten genetischen und physikalischen Karten des RSV-Genoms in die Irre geführt? Etwas Hilfe kam von Genetikern; sie kartierten eine große Zahl bekannter Transformationsmutationen von RSV innerhalb der Region des viralen Genoms, die bei der Bildung der td-RSV-Deletionsmutanten verloren gegangen war^[24]. Eindeutigere Hinweise kamen von Proteinbiochemikern: *Joan Brugge* und *Ray Erikson* fanden das lang gesuchte Produkt von *v-src*. Es war ein Protein von etwa 60 000 Dalton^[25], das eine Codesequenz von etwa 1600 Nucleotiden benötigen würde, was einem Großteil des fehlenden td-RSV-Genoms entsprach. *Hermann Oppermann* und andere^[26] konnten dann in normalen Zellen ein Protein nachweisen, das sich vom *v-src*-Protein praktisch nicht unterscheiden ließ. Sie stützten somit die These, daß mit der sarc-Sonde ein Gen (jetzt *c-src* genannt) bestimmt wurde, das *v-src* ähnelte. Letztlich zeigten die molekulare Klonierung und die Nucleotidsequenzierung des RSV-Genoms, wieviel Glück wir beim Entwurf unserer Sonde gehabt hatten^[27]. Bei den meisten td-RSV-Mutanten fehlt außer dem kompletten *v-src* fast nichts.

Die zweite Frage war subtiler: Bedeutete die Konservierung des Gens *c-src* während der Evolution der Vögel tatsächlich, daß es sich um ein zelluläres Gen handelte? Oder könnte es sich doch um ein ererbtes virales Gen handeln, das besser als andere konserviert wurde? Wir erhielten von mehreren Seiten Antworten auf diese Fragen, und alle stützten die Argumente, die auf der Evolution basierten. Mit Hühnerchromosomen, die *Elton Stubblefield* in Texas der Größe nach fraktioniert hatte, fanden wir, daß *c-src* und Virogene voneinander unabhängig waren: Die viralen Gene, die wir nachweisen konnten, lagen auf einem oder mehreren großen Chromosomen, aber *c-src* befand sich auf einem kleinen Chromosom^[28]. *Steve Hughes* verwendete dann Restriktionsenzyme, um die Sequenzdiversität in viralen Genen und ihrer Umgebung und in *c-src* bei vielen individuellen Hühnern zu bestimmen^[29]. Das Muster, das mit der sarc-Sonde entstand, war monoton, wie man es von einem konservierten zellulären Gen erwarten würde (und wie es zum Beispiel für die Gene für Globin, Ovalbumin und andere gezeigt wurde). Das Muster, das mit der Sonde auf virale Strukturgene erzeugt werden konnte, ließ eine Vielfalt in der Zahl und im Kontext erkennen, so als ob sie erst kürzlich durch voneinander unabhängige Infektionen der Keimbahn in das Hühnergenom gelangt seien. Als wir die Transcriptionsprodukte von *c-src* und von virusverwandten Genen untersuchten, fanden wir in individuellen Hühnerembryos unterschiedliche Mengen und Typen viraler RNA, aber ähnliche Mengen einer einzigen, unterschiedlich großen Spezies von *c-src*-RNA^[30].

Den schlagendsten Beweis für die zelluläre Natur von *c-src* erbrachte die molekulare Klonierung. Denn damit konnte gezeigt werden, daß die codierenden Sequenzen von *c-src* an vielen Stellen von Introns unterbrochen wurden^[31], und zwar – nach neueren Erkenntnissen – in einer für zelluläre Gene typischen Weise. Im Gegensatz dazu ähneln endogene Virogene, wie weiter unten ausführlich beschrieben wird, den Proviren, denn sie bestehen aus ununterbrochenen codierenden Domänen, die von repetitiven Sequenzen flankiert werden.

Die dritte Frage war sehr aufschlußreich bezüglich des krebserzeugenden Mechanismus von *v-src*: Worin bestanden die vermuteten physiologischen Unterschiede zwischen einem benignen Proto-Onkogen und dem davon abstammenden pathogenen viralen Onkogen? Schon bei den ersten Messungen der *src*-Genexpression ergab sich, daß das virale Gen, das von einem starken viralen Transcriptionspromotor gesteuert wird, sehr viel stärker exprimiert wurde als das zelluläre Gegenstück^[32]. Die für die Transformation benötigten Konzentrationen des *v-src*-Proteins waren aber geringer als nicht-onkogene Konzentrationen des *c-src*-Proteins^[33]; dies schien auch auf qualitative Unterschiede zu deuten. Mark Collett in Eriksons Labor^[34] und Art Levinson in unserem Labor^[35] hatten gefunden, daß *src*-Proteine Protein-Kinasen sind, und Tony Hunter und Bart Sefton konnten später zeigen, daß diese spezifisch für Tyrosinreste sind^[36]. Danach wurden in Hidesaburo Hanafusas Labor die feinen strukturellen und physiologischen Unterschiede zwischen der viralen und der zellulären Version des Gens definiert^[37]: Von den Unterschieden in der Aminosäuresequenz zwischen *p60^{v-src}* und *p60^{c-src}* verstärken mindestens drei die Protein-Tyrosinkinase-Aktivität des transformierenden Proteins. Zur Entstehung des *src*-Onkogens tragen also sowohl qualitative als auch quantitative Faktoren bei.

Zum Schluß stellt sich die Frage, wie gut das zelluläre *src*-Gen konserviert wurde. Deborah Spector zeigte bereits sehr früh, daß unter weniger stringenten Bedingungen ein großer Teil oder die ganze *src*-Sonde mit den Genomen aller Vertebraten, nicht nur mit denen von Vögeln, hybridisiert werden konnte^[38]. Da dies auch den Menschen einschloß, stieg das Interesse an unserer Arbeit, und außerdem zeichnete sich die Möglichkeit ab, daß retrovirale Proto-Onkogene bei menschlichem Krebs eine Rolle spielen. Schließlich konnte mit neuen Techniken die Liste der Organismen, die *c-src* aufweisen, erweitert werden, so daß praktisch alle Metazoen eingeschlossen sind – Insekten^[39], Würmer^[40], Schwämme^[41] und Hydras^[42] – eine in gleicher Weise erhebende und ernüchternde Erinnerung an unsere evolutionären Ursprünge.

Die *src*-Geschichte bleibt unvollendet. Wir können nicht sagen, welchen Vorteil *c-src* normalen Organismen und Zellen bringt, obwohl neuere Arbeiten darauf hindeuten, daß *c-src* sowohl bei der Entwicklung, speziell des Zentralnervensystems^[43], als auch bei der Wachstumskontrolle während der Mitose^[44] beteiligt ist. Wir kennen auch die physiologischen Substrate der *src*-Kinase nicht, obwohl zahlreiche Phosphotyrosin-haltige Proteine identifiziert werden konnten^[45]. Und wir wissen nicht, wie die enzymatische Aktivität von *p60* reguliert wird, wenn auch die Phosphorylierung dabei eine Rolle spielt^[46]. Schließlich hat das *src*-Paradigma die Entwicklung unseres Arbeitsgebietes in mehrere Richtungen angeregt: Identifizierung vieler viraler Onkogene

und ihrer zellulären Vorläufer^[47], Charakterisierung einer erstaunlichen Vielfalt onkogener Proteine^[48], Ermittlung unvorhergesehener Beziehungen zu Teilen des wachstumsregulatorischen Netzwerks^[49] und die Beschreibung mutierter Proto-Onkogene in menschlichen Tumoren^[50]. Diese Entwicklung wird Mike Bishop in seinem Vortrag beschreiben. Ich bleibe hier beim Virus – und speziell dem Provirus.

Entschlüsselung der Provirusstruktur

Anfang der siebziger Jahre war das Provirus eine gut akzeptierte Vorstellung, aber die Organisation viraler DNA und ihre Position innerhalb von Chromosomen waren noch Gegenstand von Mutmaßungen. Mehrere Eigenarten viraler RNA und des viralen Lebenszyklus ließen vermuten, daß provirale DNA besondere Eigenschaften aufweisen mußte^[19]. Zum ersten lag der Primer für den ersten viralen DNA-Strang nahe dem 5'- anstatt dem 3'-Ende der viralen RNA^[51], so daß die Synthese ein komplexer Prozeß sein mußte und das Provirus nicht nur eine einfache Kopie der viralen RNA sein konnte. Auch fand man an beiden Enden der viralen RNA eine kurze Sequenz (R), die so zwar in zwei Kopien vorhanden war, aber bei der Synthese viraler DNA nur einfach kopiert zu werden schien^[52]. Wie kam die zweite Kopie von R zustande? Schließlich war es schwierig, die effiziente Synthese der viralen RNA ohne einen starken Transcriptionspromotor vor der Startsequenz zu erklären; wie wurde dieser Promotor gebildet?

Die Lösung dieser Probleme lag in der unerwartet eleganten Konfiguration der viralen DNA, wie sie hauptsächlich von Peter Shank, Steve Hughes und Hsing-Jien Kung in unserer Gruppe^[53] und unabhängig im Labor von John Taylor in Philadelphia^[54] erarbeitet werden konnte. Wiederum gelang diese Entwicklung mit Hilfe von RSV, und die Ergebnisse basierten auf Hybridisierungen mit spezifischen Sonden, dieses Mal für die terminalen Regionen des viralen Genoms. Es

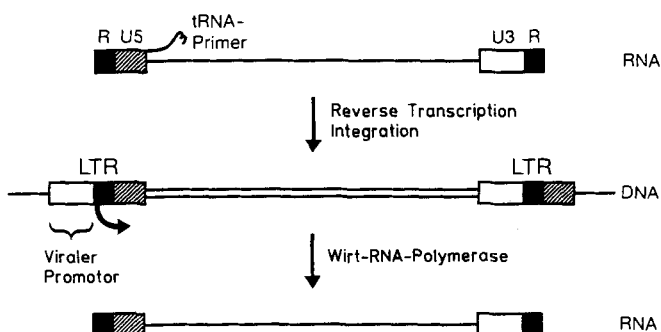


Abb. 2. Die Organisation proviraler DNA im Vergleich mit retroviraler DNA. Die oberste Zeile zeigt eine Untereinheit des viralen dimeren Genoms, mit Wirt-tRNA in der Nähe des 5'-Endes, wo sie als Primer für die Synthese des ersten viralen DNA-Strangs dient. R bedeutet kurze, an beiden Enden viraler RNA vorkommende Sequenzen; U5 und U3 sind ausschließlich in den 5'- und 3'-Regionen der RNA vorkommende Sequenzen, die während der DNA-Synthese unter Bildung der „long terminal repeats“ (LTR-Regionen) dupliziert werden. Die mittlere Zeile stellt ein in die Wirtszell-DNA (einfacher Strich) integriertes Provirus dar. Die codierenden viralen Sequenzen liegen zwischen den LTRs (Doppelstrich). Die Klammer kennzeichnet die Region, die den viralen Promotor in U3 der stromaufwärts gelegenen LTR umfaßt; der gebogene Pfeil deutet auf den Startort und die Richtung der Provirus-Transcription durch die RNA-Polymerase des Wirts hin. Die unterste Zeile zeigt den Aufbau des primären viralen Transcripts nach 3'-Prozessierung; der Poly(A)-Trakt am 3'-Ende ist nicht dargestellt.

zeigte sich, daß die viralen Gene im Provirus von langen terminalen Regionen, „long terminal repeats“ (LTR-Regionen), flankiert wurden, die von Sequenzen an beiden Enden der viralen RNA stammten (Abb. 2). (Die Enden der LTR-Regionen entsprechen den Primer-Sequenzen für die beiden DNA-Stränge; mit ihnen wurde eine Strategie der DNA-Synthese aufgeklärt, die jedoch zu kompliziert ist, um sie hier vorzutragen^[19].) Da die R-Sequenz einmal in jeder LTR-Sequenz vorkommt, kann sie durch Transcription von Teilen beider LTRs rekonstituiert werden. Und virale Sequenzen, die starke Transcriptionssignale enthalten, finden sich vor der RNA-Startsequenz. Die Kartierung von Integrationsstellen zeigte, daß viele Regionen des Wirtgenoms ein Provirus aufnehmen können; die transcriptionelle Autarkie ermöglicht es dem Provirus, in verschiedenen chromosomalen Umgebungen wirksam zu werden.

Proviren als mobile Elemente, die Insertionsmutationen verursachen

Aber mit der Struktur des Provirus ließ sich mehr aufklären als nur einige Geheimnisse des retroviralen Lebenszyklus. Proviren gleichen in ihrem grundsätzlichen Aufbau und sogar in bestimmten kurzen Sequenzen einem sehr häufigen Typ mobiler DNA-Elemente, deren Vorkommen inzwischen in Pflanzen, Bakterien, Hefen, Insekten und vielen anderen Organismen beschrieben wurde (Abb. 3)^[55] – dies ist ein

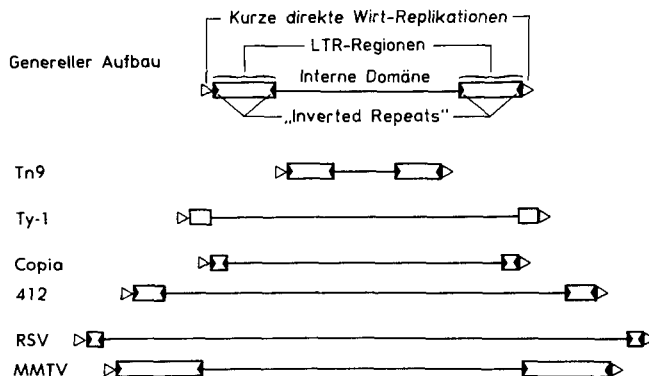


Abb. 3. Mobile DNAs sind häufig wie Proviren organisiert. Die Abbildung zeigt einige häufige Eigenschaften vieler transponierbarer Elemente: LTRs (Rechtecke), „inverted repeats“ innerhalb von LTRs (gefüllte Dreiecke) und kurze Duplikationen in der Wirt-DNA, die während der Insertion entstanden sind (leere Dreiecke). Die dargestellten mobilen Elemente umfassen retrovirale Proviren [RSV und Mäuse-Mammatumovirus (MMTV)], Retrotransposonen von *Drosophila* (Copia und 412) und von sprossender Hefe (Ty-1) sowie ein konventionelles *E.-coli*-Transposon (Tn9) (Nachdruck mit freundlicher Erlaubnis von Academic Press; siehe [55]).

weiteres markantes Beispiel für Konservierung in der Evolution. In den letzten Jahren konnte ihre Verwandtschaft mit Retroviren gezeigt werden, da einige dieser Elemente dupliziert und reloziert werden, indem mit reversen Transcriptasen neue DNA-Kopien von RNA-Transkripten erzeugt werden^[56]; allerdings entstehen dabei keine extrazellulären Viren. Diese Eigenschaften treffen auch für endogene Proviren zu, die aus der Keimbahn vieler Vertebraten kloniert werden konnten^[57], wodurch der grundsätzliche Unterschied zwischen vererbten Virogenen und zellulären Proto-Onkogenen erneut verdeutlicht wird.

Als eine praktische Konsequenz der erstaunlichen Ähnlichkeit zwischen retroviralen Proviren und mobilen Elementen mußte in Betracht gezogen werden, daß Proviren wie mobile DNA Insertionsmutationen verursachen können. 1978, während eines Forschungsurlaubs im Labor von *Mike Fried* beim Imperial Cancer Research Fund, wollte ich diese Idee experimentell überprüfen. Von *John Wyke* erhielt ich eine Ratten-Zelllinie, die durch ein einziges RSV-Provirus transformiert worden war und die als Ziel für provirale Insertionsmutationen nach Superinfektion mit Mäuse-Leukämievirus (MLV) dienen konnte. Als wir die vielen Klone der Zellen durchkämmten, die die Transformationseigenschaften nach der Infektion mit MLV verloren hatten, fanden *Suzanne Ortiz* und ich, daß zwei Klone an verschiedenen Stellen innerhalb des bereits existierenden RSV-Provirus ein inseriertes MLV-Provirus enthielten, das die Expression von *v-src* beeinflusste^[58].

Durch dieses Experiment wurde grundsätzlich gezeigt, daß Proviren als Insertionsmutagen wirken und dadurch Gene inaktivieren können. Als Nebeneffekt ermunterte es uns, über Insertionsmutationen nachzudenken, die durch Aktivierung der Genexpression dominierende Aktivität entwickeln. *Greg Payne* versuchte dann eine Erklärung dafür zu finden, daß das Vogel-Leukosevirus (ALV) – ein Virus, das vom td-RSV praktisch nicht zu unterscheiden und von dem keine virale Onkogenität bekannt ist – trotzdem innerhalb weniger Wochen nach der Injektion Tumoren (meist B-Zell-Lymphome) bei anfälligen Hühnern induzieren kann^[59]. Konnten ALV-Proviren möglicherweise manchmal in der Nähe von zellulären Proto-Onkogenen eingebaut werden und deren Expression durch eine virale LTR verstärken? Die Hinweise, die *Greg* für diese Hypothese fand^[60], gingen jedoch – so provokant sie auch waren – fast in der Aufregung unter, die die Entdeckung von *Hayward, Neel und Astrin*^[61] verursachte: Sie hatten ALV-DNA in B-Zell-Lymphomen direkt neben *c-myc* – einem bekannten Vorläufer eines retroviralen Onkogens^[62] – gefunden und gezeigt, daß die Expression von *c-myc* durch die virale LTR getrieben wurde.

ALV-induzierte Tumoren lehrten uns einige neue Prinzipien: Retroviren können Neoplasie induzieren, indem ihre Insertion Proto-Onkogene aktiviert^[63]; Proviren und ihre Zielgene können unterschiedlich angeordnet sein und dabei ähnliche Auswirkungen auf die Transcription haben^[64]; und Proto-Onkogene müssen nicht transduziert werden, um bei der Onkogenese mitzuwirken. Der zuletzt genannte Punkt war besonders wichtig, denn er deutete bereits die Flut von Proto-Onkogenen in menschlichen Tumoren an, die nicht in Verbindung zu irgendeinem Virus standen^[50].

Der Gebrauch von Proviren zur Kennzeichnung von Transposons für neuartige Proto-Onkogene: Die *int-1*-Story

So wichtig es für unsere Arbeit auch war, ALV wies uns nicht auf Proto-Onkogene hin, die nicht bereits als Vorläufer retroviraler Onkogene bekannt waren. Dafür benutzten wir ein anderes Retrovirus ohne virales Onkogen, das Mäuse-Mammatumovirus (MMTV). Wie RSV hat auch MMTV eine bemerkenswerte Vergangenheit^[65]. Es wurde in Holland vor über fünfzig Jahren in der Milch von inzüchtigen Mäusen gefunden, die häufig Mammatumoren bekamen^[66].

In den Jackson Laboratories in Maine^[67] wurde MMTV als erstes Säugetier-Retrovirus identifiziert. Es ist bisher der einzige effiziente Verursacher des Mammacarcinoms und daher ein Modell für eine der häufigsten menschlichen Krebserkrankungen.

MMTV-induzierte Mammatumoren beruhen auf einem quasiklonalen Wachstum von virusinfizierten Zellen^[68]. *Roel Nusse* wollte klären, ob die Tumorzellen durch Insertion von viraler DNA in der Nähe eines bis dahin unbekannten Proto-Onkogens entstanden. Er untersuchte viele Tumoren mit dem Ziel, einen mit nur einem einzigen neuen Provirus zu finden. Dieses Provirus und die flankierende DNA klonierte er dann in *E. coli*. In der Nähe fand sich ein unbekanntes Gen, das wir *int-1* nannten, und das in diesem und auch in einigen anderen Tumoren mit den in der Nähe gelegenen Insertionen exprimiert wurde, nicht jedoch in normalen Mammdrüsen^[69].

Diese Befunde reichten jedoch nicht, um *int-1* als Onkogen zu bezeichnen. Ein erster Hinweis war die Wiederholung: Über drei Viertel der Mammatumoren des C3H-Mäusestamms weisen Insertionsmutationen im *int-1*-Locus auf. Dann versuchte *Tony Brown* etwas, was die Natur nicht getan hatte: Er integrierte das *int-1*-Gen in ein retrovirales Genom; das so erzeugte Virus veränderte das Wachstum und die Morphologie von kultivierten Mammazellen^[70]. Schließlich wendete *Ann Tsukamoto* eine von *Ralph Brinster*, *Richard Palmiter* und *Philip Leder* entwickelte Methode^[71] an und brachte das an MMTV-LTR gekoppelte *int-1*-Gen in die Mäusekeimbahn ein^[72]. Alle transgenen Mäuse, männliche wie weibliche, zeigten eine dramatische Hyperplasie des Mammaepithels, und die meisten Weibchen entwickelten innerhalb von sechs Monaten Mammacarcinome. Es gelang uns fast, die Kochschen Postulate für eine genetische Erkrankung zu erfüllen: Indem wir die virusmutierte Form des Gens in die Keimbahn einbauten – ironischerweise beinahe so, wie es nach der Virogen-Onkogen-Hypothese in der Natur stattfinden sollte – haben wir die Krankheit wiedererschaffen.

Bevor ich unsere transgenen Mäuse verlasse, muß ich noch eine allgemeinere Bemerkung machen. In Kalifornien und vielen anderen Gegenden ist die medizinische Forschung durch gutgemeinte Bestrebungen zur Abschaffung von Tierversuchen ernstlich bedroht. Wenn man *Peyton Rous* seine Hühner verweigert hätte, wäre unser Arbeitsgebiet ohne Vergangenheit; wenn man uns allen jetzt die Mäuse und sonstigen Tiere verweigert, wird es wenig Zukunft haben.

Ein vorläufiges Transduktionsschema für Proto-Onkogene

int-1 war nur das erste einer langen Reihe von Proto-Onkogenen, die als Loci wiederholter Aktivierung durch Provirus in Tumoren identifiziert wurden^[63]. Retroviren spielen also eine Doppelrolle bei der Cancerogenese, nämlich bei der Transduktion und bei der Insertionsmutation. Es ist nicht überraschend, daß beide Phänomene mechanistisch miteinander verwandt zu sein scheinen: Eine Insertionsmutation ist vermutlich der erste Schritt in der Sequenz der Ereignisse, die gelegentlich als Endprodukt ein virales Onkogen hervorbringt. Wir können vorhersagen, aber leider noch nicht

durch direkte Beobachtungen beweisen, daß zwei Rekombinationsereignisse für die Transduktion nötig sind (Abb. 4^[73]).

Das erste Ereignis findet während der Provirusintegration statt, wobei die Virus-DNA in Richtung 5' des zu vereinnahmenden aktivierten zellulären Gens plaziert wird. Das zweite läuft während der Virusreplikation in dem Tumor ab, der durch die Insertionsmutation entsteht; in diesem zweiten

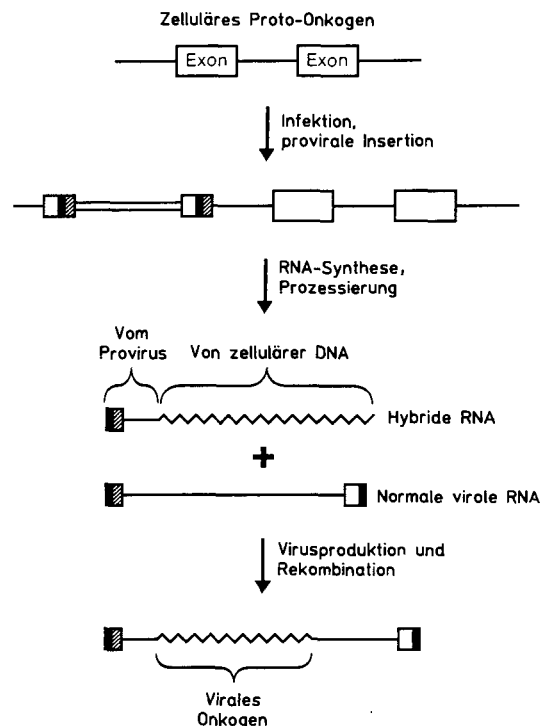


Abb. 4. Modell für die Transduktion zellulärer Proto-Onkogene zur Bildung von retroviralen Onkogenen. Exons eines Proto-Onkogens liegen stromabwärts nach einem retroviralen Provirus, das kürzlich durch Infektion eingebaut worden ist (Markierungen wie in Abb. 2). Chimäre Virus-Wirt-DNA, ein Produkt der proviralen Insertionsmutation, rekombiniert bei der Virusreplikation mit normaler viraler RNA. Dabei werden virale Sequenzen mit stromabwärts gelegenen zellulären Sequenzen verbunden. Weitere Einzelheiten siehe [73].

Schritt werden die viralen Sequenzen mit zellulären Sequenzen aus stromabwärts gelegenen Regionen des Gens verbunden. Wir vermuten, daß vor etwa einem Jahrhundert ein enger Verwandter von ALV ungefähr auf diese Weise eine geringfügig mutierte Version des Hühner-*src*-Gens übernahm und uns so den Weg eröffnete, dem wir auch jetzt noch folgen.

Die Aussichten der Retrovirologie

Bis hier hin bestätigt sich in dieser Geschichte *David Baltimore*s dankbare Feststellung^[74]: „a virologist is among the luckiest of biologists because he can see into his chosen pet down to the details of all its molecules.“ Da unsere Schoßtiere, die Retroviren, so bemerkenswerte Versuchsobjekte sind, genügten zwei kurze Fragen – wie wachsen Retroviren? und wie verursachen sie Krebs? –, um unser Augenmerk sowohl nach außen auf die Wirtszelle als auch nach innen auf die Viren selbst zu richten^[75]. Die Folge davon ist, daß wir uns mit einigen der interessantesten Gebiete der modernen

Biologie beschäftigen: den genetischen Ursachen von Krebs, der Transposition von DNA durch RNA-Intermediate, der Kontrolle der Genexpression in Eukaryoten und den molekularen Hinweisen auf die Evolution.

Inzwischen hat die Onkogen- und Proto-Onkogenforschung einen Grad der Reife erreicht, der es ermöglicht, mit erstaunlich wenig Virologie auszukommen. Allerdings bleiben Retroviren bedeutende Werkzeuge zur Isolierung wichtiger neuer Onkogene; Beispiele dafür waren die Entdeckung des *jun*- und des *crk*-Gens in den letzten Jahren^[76]. Seit der Entdeckung der reversen Transcriptase vor beinahe zwanzig Jahren ist der Lebenszyklus von Retroviren anscheinend fast erschöpfend erforscht worden^[19]. Trotzdem gibt es einige Eigenschaften von zentraler Bedeutung, die erst jetzt ins Blickfeld rücken^[75]. Rezeptoren an der Zelloberfläche für die Anheftung und den Eintritt von Viren wurden kürzlich identifiziert und zeigen bemerkenswerte biochemische Eigenschaften^[77]; die Integrationsreaktionen von Proviren wurden in vitro mit Nucleoprotein-Komplexen nachvollzogen^[78], so daß man integrative Vorläufer und Zwischenprodukte beschreiben kann^[79]; Retroviren erwiesen sich als vielseitige genetische Vektoren^[80], die vielleicht eines Tages klinisch eingesetzt werden können, um Gendefekte in der gleichen Weise zu korrigieren, wie die Natur vom Wirt abstammende Onkogene transponiert. Außerdem wurden viele unerwartete Effekte der Expression viraler Gene entdeckt, einschließlich der translationalen Verschiebung des Leserahmens während der Synthese der reversen Transcriptase^[81] und komplizierter viraler Regulationsgene, die das Verhalten von zwei Klassen menschlicher Retroviren bestimmen^[82]. Darüber hinaus werden die Prinzipien des Zusammenbaus von Viren durch physikalische und genetische Eingriffe in die viralen Strukturproteine und Proteasen erkennbar^[83]. Diese faszinierenden Probleme sind jetzt besonders drängend, da wir alle durch die weltweite Verbreitung des letalen humanen Retrovirus HIV (human immunodeficiency virus) bedroht werden^[84]. Somit fordern Retroviren nach wie vor unsere Intelligenz auf eine Weise heraus, die uns beim Kampf gegen so bedeutende Krankheiten wie Krebs und neuerdings AIDS helfen und zur gleichen Zeit grundlegende Eigenschaften im Leben unserer Zellen aufdecken könnte.

Dank

Meine Dankeschuld ist groß: Gegenüber meinen vielen Mitarbeitern und Kollegen, sowohl den hier bereits genannten als auch den vielen ungenannten, für gemeinsame Arbeit, Ideen und Kritik; gegenüber mehreren Institutionen (besonders den National Institutes of Health, der American Cancer Society und der University of California, San Francisco) für die finanzielle und sonstige Unterstützung meiner Karriere; und gegenüber meiner Familie für ihre liebevolle Toleranz. Der Beginn meiner wissenschaftlichen Laufbahn wurde von *Ira Pastan* zutiefst beeinflusst, der mir zeigte, daß das Leben im Laboratorium dem in der Klinik vorzuziehen war; von *Peter Vogt*, der mir die virale Genetik beibrachte, als ich sie brauchte; und von *Mike Bishop*, der mir seit beinahe zwei Jahrzehnten ein großmütiger und anspruchsvoller Kollege gewesen ist. Meine Danksagung bliebe unvollständig, würde ich nicht besonders die Freundschaft und Hilfe erwäh-

nen, die mir *Suzanne Ortiz*, *Nancy Quintrell*, *Jean Jackson*, *Leon Levintow*, *Warren Levinson* und *Don Ganem* gewährt haben.

Eingegangen am 26. Januar 1990 [A770]
Übersetzt von Dr. Hartmut Günther-Koszka, Berlin

- [1] P. Rous, *J. Exp. Med.* 132 (1911) 397; *Science (Washington, D.C.)* 157 (1967) 24.
- [2] F. Jacob, J. Monod, *J. Mol. Biol.* 3 (1961) 318; F. Jacob, A. Ullmann, J. Monod, *ibid.* 13 (1965) 704.
- [3] R. L. Perlman, B. DeCrombrugge, I. Pastan, *Nature (London)* 223 (1969) 810; R. Perlman, B. Chen, B. DeCrombrugge, M. Emmer, M. Gottesman, H. Varmus, I. Pastan, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 35 (1970) 419–423.
- [4] G. Stent in L. Wolpert, A. Richards (Hrsg.): *A Passion for Science*, Oxford University Press, Oxford 1988, S. 109–119.
- [5] H. E. Varmus, R. L. Perlman, I. Pastan, *J. Biol. Chem.* 245 (1970) 2259, 6366.
- [6] H. M. Temin, *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 17 (1964) 557; H. M. Temin, *Science (Washington, D.C.)* 192 (1976) 1075.
- [7] J. P. Bader, *Virology* 26 (1965) 253.
- [8] R. J. Huebner, G. J. Todaro, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 64 (1969) 1087.
- [9] H. M. Temin, S. Mizutani, *Nature (London)* 226 (1970) 1211.
- [10] D. Baltimore, *Nature (London)* 226 (1970) 1209.
- [11] G. S. Martin, *Nature (London)* 227 (1970) 1021.
- [12] L. Gelb, D. Kohne, M. Martin, *J. Mol. Biol.* 57 (1971) 129.
- [13] H. E. Varmus, W. E. Levinson, J. M. Bishop, *Nature New Biol.* 233 (1971) 19.
- [14] H. E. Varmus, R. A. Weiss, R. Friis, W. E. Levinson, J. M. Bishop, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69 (1972) 20.
- [15] H. E. Varmus, S. Heasley, J. M. Bishop, *J. Virol.* 14 (1974) 895.
- [16] P. E. Neiman, *Science (Washington, D.C.)* 178 (1972) 750.
- [17] M. Hill, J. Hillova, *Nature New Biol.* 237 (1972) 35; *Virology* 49 (1972) 309.
- [18] H. E. Varmus, P. K. Vogt, J. M. Bishop, *J. Mol. Biol.* 74 (1973) 613; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 (1973) 3067.
- [19] a) R. Weiss, N. Teich, H. Varmus, J. Coffin (Hrsg.): *RNA Tumor Viruses*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor; b) H. Varmus, R. Swanstrom in [19a], Kap. 5 (1982), S. 369–512; c) H. Varmus, R. Swanstrom in [19a], Kap. 5S (1985), S. 75–134.
- [20] P. K. Vogt, *Virology* 46 (1971) 939.
- [21] G. S. Martin, P. H. Duesberg, *Virology* 47 (1972) 494; L.-H. Wang, P. Duesberg, K. Beemon, P. K. Vogt, *J. Virol.* 16 (1975) 1051.
- [22] D. Stehelin, R. V. Guntaka, H. E. Varmus, J. M. Bishop, *J. Mol. Biol.* 101 (1976) 349.
- [23] D. Stehelin, H. E. Varmus, J. M. Bishop, P. K. Vogt, *Nature (London)* 260, (1976) 170.
- [24] A. Bernstein, R. MacCormick, G. S. Martin, *Virology* 70 (1976) 206.
- [25] J. S. Brugge, R. L. Erikson, *Nature (London)* 269 (1977) 346.
- [26] M. S. Collett, J. S. Brugge, R. L. Erikson, *Cell* 15 (1978) 1363; H. Oppermann, A. D. Levinson, H. E. Varmus, L. Levintow, J. M. Bishop, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 1804; L. R. Rohrschneider, R. N. Eisenman, C. R. Leitch, *ibid.* 76 (1979) 4479.
- [27] A. P. Czernilofsky, A. D. Levinson, H. E. Varmus, J. M. Bishop, E. Tischer, H. M. Goodman, *Nature (London)* 287 (1980) 198; T. Takeya, H. Hanafusa, *J. Virol.* 44 (1982) 12.
- [28] T. Padgett, E. Stubblefield, H. E. Varmus, *Cell* 10 (1977) 649; S. H. Hughes, E. Stubblefield, F. Payvar, J. D. Engel, J. B. Dodgson, D. Spector, B. Cordell, R. T. Schimke, H. E. Varmus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 1348.
- [29] S. H. Hughes, F. Payvar, D. Spector, R. T. Schimke, H. L. Robinson, J. M. Bishop, H. E. Varmus, *Cell* 18 (1979) 347.
- [30] D. Spector, B. Baker, H. E. Varmus, J. M. Bishop, *Cell* 3 (1978) 381; D. Spector, K. Smith, T. Padgett, P. McCombe, D. Roulland-Dussoix, C. Moscovici, H. E. Varmus, J. M. Bishop, *ibid.* 3 (1978) 371.
- [31] R. C. Parker, H. E. Varmus, J. M. Bishop, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 5842; T. Takeya, H. Hanafusa, R. P. Junghans, G. Ju, A. M. Skalka, *Mol. Cell. Biol.* 1 (1981) 1024; D. Shalloway, A. D. Zelenetz, G. M. Cooper, *Cell* 24 (1981) 531.
- [32] J. M. Bishop, H. Varmus in [19a], Kap. 9 (1982), S. 999–1108.
- [33] R. P. Parker, H. E. Varmus, J. M. Bishop, *Cell* 37 (1984) 131; E. B. Jakobovits, J. E. Majors, H. E. Varmus, *ibid.* 38 (1984) 757.
- [34] M. S. Collett, R. L. Erikson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 2021; T. W. Hsu, J. L. Sabran, G. E. Mark, R. V. Guntaka, J. M. Taylor, *J. Virol.* 28 (1978) 810.
- [35] A. Levinson, H. Oppermann, L. Levintow, H. E. Varmus, J. M. Bishop, *Cell* 15 (1978) 561.
- [36] T. Hunter, B. M. Sefton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 1311.
- [37] T. Takeya, H. Hanafusa, *Cell* 32 (1983) 881.
- [38] D. H. Spector, H. E. Varmus, J. M. Bishop, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 4102.

- [39] B.-Z. Shilo, R. A. Weinberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981) 6789; M. A. Simon, B. Drees, T. Kornberg, J. M. Bishop, *Cell* 42 (1985) 831.
- [40] A. Kamb, M. Weir, B. Rudy, H. E. Varmus, C. Kenyon, *Nature (London)* 337 (1989) 364.
- [41] A. Barnekow, M. Scharlt, *Mol. Cell. Biol.* 4 (1984) 1179.
- [42] T. C. Bosch, T. F. Unger, D. A. Fisher, R. E. Steele, *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 4141.
- [43] J. S. Brugge, P. C. Cotton, A. E. Queral, J. N. Barrett, D. Nonner, R. W. Kenne, *Nature (London)* 316 (1985) 554; P. F. Maness, M. Aubry, C. G. Shores, L. Frame, K. H. Pfenniger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 5001; R. Martinez, B. Mathey-Provot, A. Bernards, D. Baltimore, *Science (Washington, D.C.)* 237 (1987) 411.
- [44] D. O. Morgan, J. M. Kaplan, M. J. Bishop, H. E. Varmus, *Cell* 57 (1989) 775; S. Shenoy, J.-K. Choi, S. Bagrodia, T. D. Copeland, J. L. Maller, D. Shalloway, *ibid.* 57 (1989) 763.
- [45] T. Hunter, J. A. Cooper, *Annu. Rev. Biochem.* 54 (1984) 897.
- [46] T. Hunter, *Cell* 49 (1987) 1.
- [47] J. M. Bishop, H. Varmus in [19a], Kap. 9S (1985), S. 249–356.
- [48] H. E. Varmus, J. M. Bishop (Hrsg.): *Cancer Surveys-Proteins Encoded by Oncogenes*, Vol. 5, Number 2, Oxford University Press, Oxford 1986.
- [49] H. E. Varmus in G. Stamatoyannopoulos, A. W. Nienhuis, P. Leder, P. W. Majerus (Hrsg.): *Molecular Basis of Blood Diseases*, Kap. 9, W. B. Saunders, London 1987, S. 271–346.
- [50] H. E. Varmus, *Annu. Rev. Genet.* 18 (1984) 553; J. M. Bishop, *Science (Washington, D.C.)* 235 (1987) 305.
- [51] J. M. Taylor, R. Illmensee, *J. Virol.* 16 (1975) 553.
- [52] J. M. Coffin, W. A. Haseltine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 1908; M. S. Collet, P. Dierks, J. F. Cahill, A. J. Faras, J. T. Parsons, *ibid.* 74 (1977) 2389; W. A. Haseltine, J. M. Coffin, T. C. Hageman, *J. Virol.* 30 (1979) 375; R. P. Junghans, S. Hu, C. A. Knight, N. Davidson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 477; E. Stoll, M. A. Billeter, A. Palmenberg, C. Weissmann, *Cell* 12 (1977) 57.
- [53] S. Hughes, P. K. Vogt, P. R. Shank, D. Spector, H.-J. Kung, M. L. Breitman, J. M. Bishop, H. E. Varmus, *Cell* 15 (1978) 1397; P. R. Shank, S. Hughes, H.-J. Kung, J. Majors, N. Quintrell, R. V. Guntaka, J. M. Bishop, H. E. Varmus, *ibid.* 15 (1978) 1383; H. E. Varmus, P. R. Shank, S. Hughes, H.-J. Kung, S. Heasley, J. Majors, P. K. Vogt, J. M. Bishop, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43 (1979) 851.
- [54] T. W. Hsu, J. L. Sabran, G. E. Mark, R. V. Guntaka, J. M. Taylor, *J. Virol.* 28 (1978) 810; J. L. Sabran, T. W. Hsu, C. Yeater, A. Kaji, W. S. Mason, J. M. Taylor, *ibid.* 29 (1979) 170.
- [55] H. E. Varmus, in J. Shapiro (Hrsg.): *Transposable Elements*, Kap. 10, Academic Press, New York 1983, S. 411–503; H. E. Varmus, P. O. Brown in M. Howe, D. Berg (Hrsg.): *Mobile DNA*, ASM Publications, New York 1989, S. 35–56.
- [56] D. Baltimore, *Cell* 40 (1985) 481; H. E. Varmus, *Nature (London)* 314 (1985) 583.
- [57] J. Stoye, J. Coffin in [19a], Kap. 10 (1985), S. 357–404.
- [58] H. E. Varmus, N. Quintrell, S. Ortiz, *Cell* 25 (1981) 23.
- [59] N. Teich, J. Wyke, T. Mak, A. Bernstein, W. Hardy in [19a], Kap. 8 (1982) S. 785–998.
- [60] G. S. Payne, S. A. Courtneidge, L. B. Crittenden, A. M. Fadly, J. M. Bishop, H. E. Varmus, *Cell* 23 (1981) 311.
- [61] W. S. Hayward, B. G. Neel, S. M. Astrin, *Nature (London)* 290 (1981) 475; B. G. Neel, W. S. Hayward, H. L. Robinson, J. Fang, S. M. Astrin, *Cell* 23 (1981) 323.
- [62] D. Sheiness, J. M. Bishop, *J. Virol.* 31 (1979) 514; M. Roussel, S. Saule, C. Lagrou, C. Rommens, H. Beug, T. Graf, D. Stehelin, *Nature (London)* 281 (1979) 452.
- [63] H. E. Varmus: *Cancer Surveys*, Vol. 2, Oxford University Press, Oxford 1982, S. 301; R. Nusse, A. Berns in G. Klein (Hrsg.): *Cellular Oncogene Activation*, Kap. 3, Marcel Dekker, New York 1988.
- [64] G. S. Payne, J. M. Bishop, H. E. Varmus, *Nature (London)* 295 (1982) 209.
- [65] J. Hilgers, P. Bentvelzen, *Adv. Cancer Res.* 26 (1978) 143.
- [66] R. Korteweg, *Genetics* 18 (1936) 350.
- [67] J. J. Bittner, *Science (Washington, D.C.)* 84 (1936) 162.
- [68] J. C. Cohen, P. R. Shank, V. Morris, R. Cardiff, H. E. Varmus, *Cell* 16 (1979) 333.
- [69] R. Nusse, H. E. Varmus, *Cell* 31 (1982) 99; R. Nusse, A. van Ooyen, D. Cox, Y. K. T. Fung, H. Varmus, *Nature (London)* 307 (1984) 131.
- [70] A. M. C. Brown, R. S. Wildin, T. J. Prendergast, H. E. Varmus, *Cell* 46 (1986) 1001.
- [71] T. A. Stewart, P. K. Pattengale, P. Leder, *Cell* 38 (1984) 627; R. D. Palmiter, R. L. Brinster, *Annu. Rev. Genet.* 20 (1986) 465; S. Cory, J. M. Adams, *Annu. Rev. Immunol.* 6 (1988) 25; D. Hanahan, *Science (Washington, D.C.)* 246 (1989) 1265.
- [72] A. S. Tsukamoto, R. Grosschedl, R. C. Guzman, T. Parslow, H. E. Varmus, *Cell* 55 (1988) 619.
- [73] H. E. Varmus, *Science (Washington, D.C.)* 216 (1982) 812; J. M. Bishop, *Annu. Rev. Biochem.* 52 (1983) 301; R. Swanson, R. C. Parker, H. E. Varmus, J. M. Bishop, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 (1983) 2519.
- [74] D. Baltimore, *Science (Washington, D.C.)* 192 (1976) 632.
- [75] H. E. Varmus, *Science (Washington, D.C.)* 240 (1988) 1427.
- [76] Y. Maki, T. J. Bos, C. Davis, M. Starbuck, P. K. Vogt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 2848; P. K. Vogt, T. J. Box, R. F. Doolittle, *ibid.* 84 (1987) 3316; B. J. Mayer, M. Hamaguchi, H. Hanafusa, *Nature (London)* 332 (1988) 272.
- [77] P. J. Maddon, A. G. Dalglish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss, R. Axel, *Cell* 47 (1986) 333; J. S. McDougal, M. S. Kennedy, J. M. Sligh, S. P. Cort, A. Mawle, J. K. A. Nicholson, *Science (Washington, D.C.)* 231 (1986) 382; L. M. Albritton, L. Tseng, D. Scadden, J. M. Cunningham, *Cell* 57 (1989) 659.
- [78] P. O. Brown, B. Bowerman, H. E. Varmus, J. M. Bishop, *Cell* 49 (1987) 347.
- [79] T. Fujiwara, K. Mizuuchi, *Cell* 55 (1988) 497; P. O. Brown, B. Bowerman, H. E. Varmus, J. M. Bishop, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 2525.
- [80] J. Coffin in [19a], Kap. 4 (1985), S. 17–74; E. Gilboa, *BioEssays* 5, 252 (1987).
- [81] T. Jacks, H. D. Madhani, F. R. Masiarz, H. E. Varmus, *Cell* 55 (1988) 447; T. Jacks, M. D. Power, F. R. Masiarz, P. A. Luciw, P. J. Barr, H. E. Varmus, *Nature (London)* 331 (1988) 280.
- [82] H. Varmus, *Genes Dev.* 2 (1988) 1055; B. R. Franza, B. R. Cullen, F. Wong-Staal (Hrsg.): *The Control of Human Retrovirus Gene Expression*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor 1988.
- [83] C. Dickson, R. Eisenman, H. Fan in [19a], Kap. 6 (1985), S. 135–146; A. M. Skalka, *Cell* 56 (1989) 911.
- [84] *The Science of AIDS: Readings from Scientific American Magazine*, W. H. Freeman, New York 1988.