

Andreas Neubauer¹, Doris Steinemann² und Brigitte Schlegelberger²

¹Universitätsklinikum Gießen und Marburg, und Philipps Universität, Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie, Marburg

²Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Zell- und Molekularpathologie, Hannover

Einleitung

Seit einigen Jahren ist das menschliche Genom bekannt und sequenziert. Dennoch werden fast monatlich wichtige Entdeckungen zur Genregulation gemacht, welche durch die Identifizierung der genomischen DNA-Sequenzen nicht ableitbar sind. So kann als Beispiel die Aufdeckung kleiner regulatorischer RNA-Moleküle aufgeführt werden. Eine Klasse sind die mikro RNA, genannt miRNA, welche wichtige Regulationsaufgaben sowohl auf translatorischer, als auch transskriptorischer Ebene aufweisen. Eine Zelle eines Gewebes A unterscheidet sich im Allgemeinen von einer Zelle eines anderen Gewebes B nicht durch die Zusammensetzung der genomischen DNA, sondern durch die angeschalteten (exprimierten) Gene. Daher wird seit jeher das Expressionsverhalten der Zellen verwendet, um diese weiter zu charakterisieren. Expression von Peroxidasen erlaubt die Zuordnung zur myeloischen Reihe, Expression von Zytokeratin als Epithelien etc. Proteinfärbungen sind oftmals durch Fehlen geeigneter monoklonaler Antikörper schwierig. Daher wurde seit langer Zeit auch die Menge definierter Transkripte einer Zelle zur Messung der Genexpression herangezogen. Erst die Einführung der Array-Technologie hat allerdings erlaubt, in sehr kurzer Zeit eine klinische Probe simultan auf die Expression tausender Gene zu untersuchen. Dies kann schnell mit einer großen Zahl von Proben durchgeführt werden. Die erhaltenen Ergebnisse können dann mit der Klinik, dem Ansprechen auf Therapie etc. korreliert werden. Auf diese Weise sind wichtige Erkenntnisse in der Erforschung von Leukämien gewonnen worden. In letzter Zeit sind neben der klassischen Technik der Bestimmung der Genexpression maturer Gene (also mRNA Moleküle) die Messung der Expression der mikro RNA in den Vordergrund getreten. Die Bestimmung dieser mikro RNA ist im Vergleich zu den globalen Genexpressionsanalysen allerdings zurzeit technisch noch nicht vollkommen

optimiert. Eine andere neue Entwicklung ist die Bestimmung der epigenetischen Modifikation einer Vielzahl von Genen, z.B. durch die Methylierung von Cytosin-Resten in regulatorischen Einheiten, und vor allem die Möglichkeit, mittels Array CGH („comparative genomic hybridization“, also vergleichende genomische Hybridisierung) genomische Zugewinne und Verluste zu erkennen (Abbildung 1; aus: (1)).

Arbeiten im Kompetenznetz Leukämien

Ein wichtiger Beitrag des Kompetenznetzes war es, zwischen führenden Gruppen auf dem Gebiet der Leukämieforschung eine Übereinkunft herbeizuführen, welche technischen Voraussetzungen für eine aussagekräftige Genexpressionsanalyse erfüllt sein müssen. Kritische Punkte der Methode sind die Qualität der Probe nach Versand und Asservierung, die Frage, ob eine Separation bestimmter Zellpopulationen durchgeführt werden soll, die RNA Extraktionsmethoden, die Qualitätskontrolle der eingesetzten RNA, Markierung, Hybridisierung, Waschprozeduren, Scanning sowie die nachfolgende bioinformatische Auswertung. Bei einem Vergleich verschiedener Plattformen zeigte sich, dass sowohl mit Affymetrix- als auch mit cDNA- oder Oligo-Mikroarrays übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden können. Diese Guidelines wurden 2006 in Leukemia publiziert (2). In diesem Artikel soll beispielhaft auf die im Rahmen des Kompetenznetzes gelaufenen Studien zur chronischen myeloischen Leukämie eingegangen werden.

Genexpressionsanalysen bei der CML

1. PR1 wird durch Imatinib abgeschaltet, was Konsequenzen für die Induktion einer T-Zellantwort auf Imatinib hat

In einer frühen Arbeit wurde die Frage gestellt, inwieweit durch die neue Substanz Imatinib (Glivec®) (erste klinische Daten in: 3) nicht nur Abl-ähnliche Tyrosinkinasen gehemmt werden, sondern auch

andere „off-target“ Proteine inhibiert oder gar aktiviert werden könnten. Dafür wurden Patienten, welche in der IRIS Studie (4, 5) mit Imatinib therapiert wurden, vor und während der Therapie Blutproben entnommen und einer breiten Genexpressionsanalyse mit einem home-made Array unterzogen. Kandidatengene wurden mittels quantitativer RQ-PCR validiert. Es stellte sich heraus, dass Imatinib spezifisch ein Gen, welches in der immunologischen Therapie der CML wichtig ist und durch Interferontherapie heraufreguliert wird, Myeloblastin (oder Proteinase-3) inhibiert. Es konnte dann noch gezeigt werden, dass – im Gegensatz zu Interferon-alpha – Imatinib die für die CML günstigen cytotoxischen T-Zellen (CTL) hemmt, was möglicherweise für die Langzeitprognose wichtig sein könnte (6, 7). Diese Daten unterstützen die Idee einer erfolgreichen Kombinationstherapie bestehend aus Imatinib und Interferon-alpha. Sie zeigen aber auch, dass eine Genexpressionsstudie wie diese nicht zwangsläufig direkte Genregulationen entdecken muss, sondern – wie hier vermutet – auch indirekte Ergebnisse aufdecken kann (in diesem Fall über die Hemmung von BCR/ABL). Daher sind anschließende Validierungsstudien (mit RQ-PCR oder Proteinfärbungen, Westernblot, Immunzytologie) essentiell.

2. CD34-positive Zellen der CML: Charakteristische Genexpressionsprofile mit möglichen Konsequenzen für neue Therapieverfahren

Verändert die An- oder Abwesenheit des für die CML kausalen Onkogens BCR/ABL das Genexpressionsprofil? Einige Arbeitsgruppen haben dies studiert. Kronenwett et al. fanden, dass mehr Gene herunter- als heraufreguliert sind beim Vergleich CD34-positive Progenitorzellen von CML-Patienten (N=5) mit Gesunden (N=10). Interessant auch die Daten, dass die signalabwärts von BCR/ABL bekannten Gene von Mitgliedern der RAS-Fa-

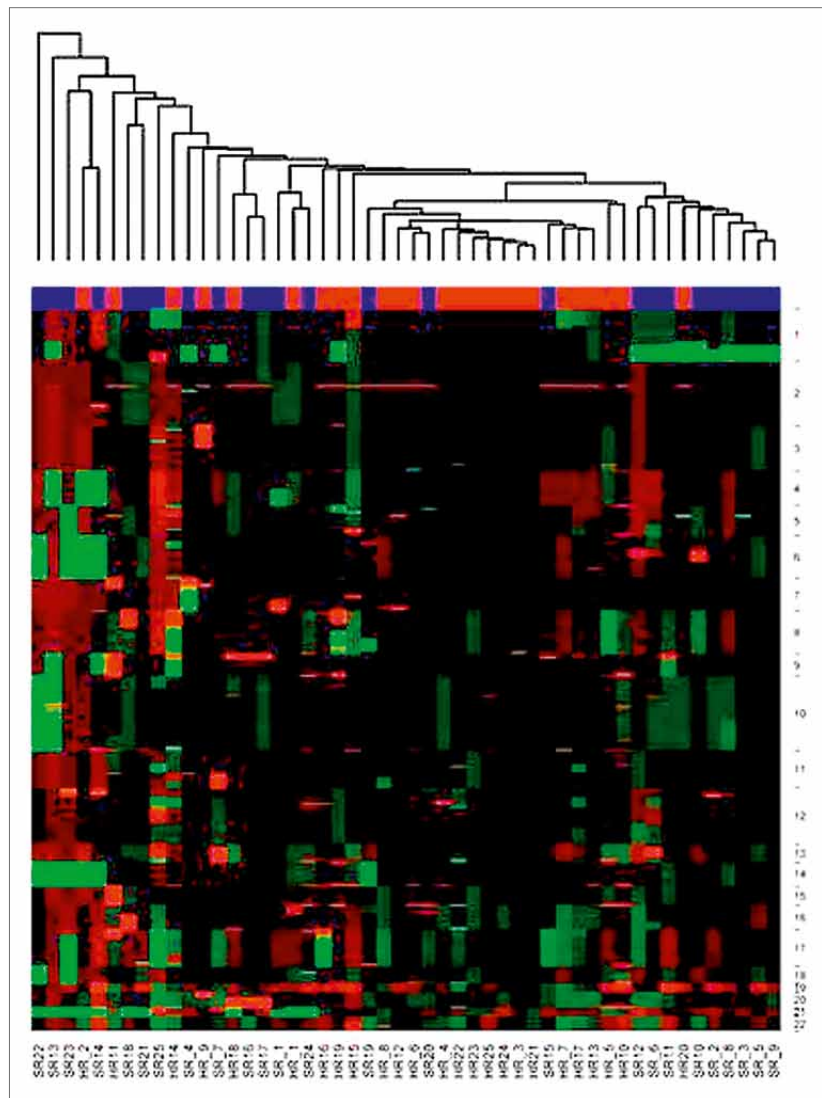


Abbildung 1: ArrayCGH-Analysen bei 50 Fällen von kindlicher ALL. Säulen repräsentieren die einzelnen Tumorproben, Reihen die genomischen Klone, die nach ihrer Chromosomen- und Genomposition geordnet sind. Zugewinne sind grün, Verluste rot dargestellt. Hierarchische Cluster-Analyse, über der Heat map sind Patienten mit Hochrisiko-Leukämie rot, Patienten mit Standardrisiko blau gekennzeichnet (Abbildung entnommen aus (1))

milie überwiegend heraufreguliert waren, das ebenfalls signalabwärts liegende AKT-Protein allerdings bei CML-Patienten herunterreguliert ist (8). Es fanden sich auch einige Gene, welche potentiell therapeutisch interessant sind, da sie bei CML heraufreguliert sind und mit Hemmstoffen der Ubiquitinierung angebar wären. Zheng und Mitarbeiter studierten CML in Blastenkrise. Es fand sich eine klare Gensignatur für progrediente CML; u.a. das Molekül CD52, welches durch den Antikörper MabCampath erkannt wird, war bei Blastenkrise heraufreguliert, was interessante therapeutische Implikationen haben könnte (9).

3. Kann Imatinib-Resistenz vorhergesagt werden?

Dies ist eine wichtige Frage, die nach den Daten von Crossman mit nein beantwortet werden muss (10). Frank et al. fanden bei ähnlicher Fragestellung, dass es unterschiedlich regulierte Gene bei Respondern vs. Non-Respondern zu geben scheint; schaut man allerdings in die Daten, sind die Unterschiede auch relativ gering (11). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich bisher kein Resistenzexpressionsprofil etabliert hat. Ebenfalls der Frage der Imatinib-Resistenz nachgehend, fanden Wang und Mitarbeiter mittels eines Antikörper-Arrays, welcher verschiedene Zytokine testet, heraus, dass Imatinib-refraktäre Zellen häufig über eine autokrine GM-CSF-Sekretion das zentrale Protein STAT5 aktivieren, welches dann unabhängig von Blockade des BCR/ABL antiapoptotische und proliferative Signale mediiert (12). Diese Befunde könnten wichtige Konsequenzen bei der Planung weiterer Therapien bei Progress haben: So konnte in vitro in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein kombinierter Einsatz eines BCR/ABL-Inhibitors mit einem JAK2-Inhibitor diesen Resistenzmechanismus aufhebt. Ob dies auch in vivo gilt, ist unbekannt.

Danksagung

Wir entschuldigen uns bei den vielen Autoren, deren Arbeiten wir wegen der Kürze des Artikels nicht darstellen können. Die Arbeiten der Autoren werden unterstützt durch das BMBF, die DFG, die José Carreras Leukämie Stiftung sowie die Frank-Axel-Hanisch Stiftung.

Referenzen:

- (1) Steinemann D et al. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008;47:471-480.; (2) Staal FJ et al. *Leukemia*. 2006;20:1385-1392.; (3) Druker B et al. *N Engl J Med*. 2001;344:1031-1037.; (4) Druker BJ et al. *N Engl J Med*. 2006;355:2408-2417.; (5) O'Brien SG et al. *N Engl J Med*. 2003;348:994-1004.; (6) Burchert A et al. *Blood*. 2003;101:259-264.; (7) Burchert A et al. *Leuk Lymphoma*. 2005;46:167-175.; (8) Kronenwett R et al. *Oncogene*. 2005;24:5313-5324. (9) Zheng C et al. *Leukemia*. 2006;20:1028-1034.; (10) Crossman LC et al. *Haematologica*. 2005;90:459-464. (11) Frank O et al. *Leukemia*. 2006;20:1400-1407.; (12) Wang Y et al. *Blood*. 2007;109:2147-2155. (eine ausführliche Version der Literaturangaben findet sich auf der Webseite)