

Die Plattform „Signaltransduktion, Genomics/Proteomics“

M. Heuser¹, L. U. Wingen², J. Ritter³, A. Neubauer³, B. Schlegelberger²

¹ Abteilung Hämatologie, Hämostaseologie und Onkologie, Medizinische Hochschule Hannover

² Institut für Zell- und Molekularpathologie, Medizinische Hochschule Hannover

³ Klinik für Hämatologie, Onkologie and Immunologie, Philipps-Universität Marburg

Schlüsselwörter

Signaltransduktion, Genomics, Proteomics, Microarray, Leukämie

Keywords

Signal transduction, genomics, proteomics, microarrays, leukemia

Zusammenfassung

Ziel der Plattform TP28/TP29 „Signaltransduktion, Proteomics/Genomics“ im Kompetenznetz „Akute und chronische Leukämien“ ist eine umfassende genetische Charakterisierung der verschiedenen akuten und chronischen Leukämien sowie die gemeinsame bioinformatische Analyse der von verschiedenen Gruppen erarbeiteten Daten. Die so erhaltenen biologischen Daten werden schon in allernächster Zeit dramatische Konsequenzen für die tägliche onkologische Praxis haben, indem einerseits Genexpressionsprofile als Grundlage für individualisierte Tumorthapie herangezogen werden und andererseits auch neue Signalwege als Ziel besserer Tumorthapie erforscht werden. Unabdingbare Voraussetzung für den diagnostischen Einsatz der Gen- und Proteinexpressionsanalyse zum Nutzen von Leukämiepatienten ist die Erarbeitung von Qualitätsstandards. Hier hat das Kompetenznetz „Akute und chronische Leukämien“ eine Schlüsselrolle.

Summary

The objective of the project „Signal Transduction, Proteomics/Genomics“, part of the competence network „Acute and chronic Leukemias“, is to achieve a comprehensive genomic characterization of different types of acute and chronic leukemias. The data which are generated via bioinformatics will have dramatic influence also on cancer therapy, in thus not only more individualized therapy depending on the individual risk be applied, but also novel signalling pathways will be discovered which will then result in new treatment strategies. The development of quality standards of gene and protein profiling, as well as the joint analysis of the acquired data, is an indispensable prerequisite for diagnostic application. This is the main focus of this project within the competence network „Acute and chronic Leukemias“

Plattform „Signal Transduction, Genomics/Proteomics“

Med Welt 2004; 55: 307–10

Ziel des Projektes „Signaltransduktion, Proteomics/Genomics“ im Kompetenznetz „Akute und chronische Leukämien“ ist eine umfassende genetische Charakterisierung der verschiedenen akuten und chronischen Leukämien. Durch Bündelung der Aktivitäten der teilnehmenden Arbeitsgruppen soll ein besseres Verständnis der genetischen Mechanismen erreicht werden, welche der Entwicklung und der Progression hämatologischer Neoplasien zugrunde liegen. Über die Analyse von Molekülen aus verschiedenen Signalwegen soll es gelingen, neue therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren.

Genomics

Die DNA-Sequenzen der allermeisten menschlichen Gene sind bekannt. Somit ist es möglich, einen Teil (sogenannte Oligonukleotide) oder die gesamte kodierende Sequenz (sogenannte cDNA) auf kleinste Flächen aufzubringen (sogenannte Filter oder auch Objektträger) und dann mit z. B. Blut- oder Knochenmarkproben von Patienten mit Leukämien zu hybridisieren, um die von den Tumorzellen angeschalteten („exprimierten“) Gene zu identifizieren und mit anderen Leukämien zu vergleichen. Diese Objektträger werden Arrays genannt. Man unterscheidet Expressions- von genomischen Arrays. Die gewonnenen Profile gleichen einer Unterschrift eines Menschen

und werden daher Signatur genannt, da sie das ganz charakteristische Profil dieser einzelnen Leukämieprobe sind.

Alle Netzwerkpartner untersuchen nun mithilfe von Genexpressionsanalysen verschiedene hämatologische Neoplasien. Mittels dieser Microarray-Analysen kann die Expression von über 40 000 Genen, d. h. des kompletten menschlichen Gensets, gleichzeitig untersucht werden. Der genaue Ablauf ist wie folgt:

Es werden Mikroarrays (DNA-Chips) – überwiegend beschichtete Glasobjektträger – genutzt, auf die an bestimmten Positionen DNA der einzelnen Gene (Sonden) aufgebracht ist. Auf die Mikroarrays wird fluoreszenzmarkierte cDNA bzw. cRNA aus Leukämiezellen aufgetragen. Komplementäre DNA bindet während der Hybridisierung aneinander; die Anzahl der gebundenen Moleküle und damit das Expressionsniveau eines Gens kann anhand des Fluoreszenzsignals quantifiziert werden (Abb. 1). Derzeit werden zwei unterschiedliche Verfahren angewendet: Die cDNA-Microarrays enthalten im Schnitt 500 bis 4000 Basenpaar-lange cDNA-Fragmente als Sonden, Oligonukleotid-Microarrays (z. B. der Firma Affymetrix) 20 bis 80 Basenpaar-lange Oligonukleotide als Sonden.

Durch Vergleich der Genexpressionsprofile verschiedener Leukämie-Subtypen erhöht sich die Chance, wichtige genetische Veränderungen und Wege der Leukämie-Entstehung aufzudecken. Es ist dabei von großem Vorteil, dass die Microarray-Analysen mit Proben von Patienten aus den Multi-center-Studien des Netzwerks „Akute und chronische Leukämien“ (7) durchgeführt werden. So lassen sich Expressionsdaten einfach auf ihre klinische bzw. prognostische Bedeutung überprüfen. Die so gewonnenen Daten können nun für ganz verschiedene Fragestellungen verwendet werden:

- Signaturen verschiedener Proben der gleichen Entität (z. B. AML) können miteinander verglichen werden um so die Biologie der Erkrankung besser erforschen zu können.
- Aus dem Vergleich der verschiedenen, morphologisch aber einheitlichen Proben können prognostische Differenzen abgeleitet werden, die zu einem verbesserten Risikoprofil beitragen können (siehe z. B. [5]).
- Darüber hinaus können neue Signalwege ermittelt werden, die bei Pathogenese und Therapie möglicherweise entscheidende Bedeutung für eine verbesserte Behandlung des individuellen Patienten spielen können (siehe z. B. [6]).

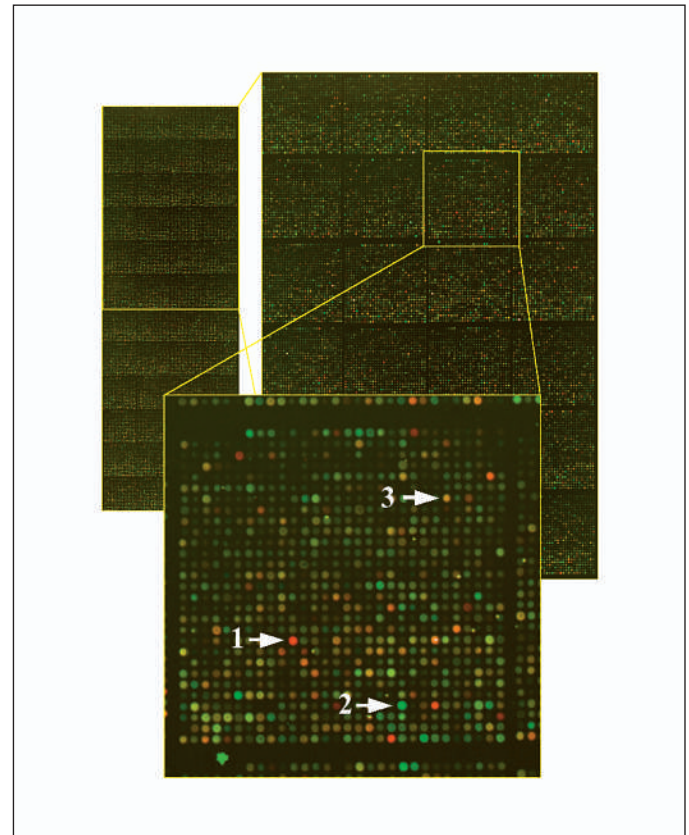
Proteomics

Unter Proteomics versteht man die simultane Darstellung aller exprimierten Proteine einer bestimmten Zellpopulation. Vorherrschendes Verfahren ist das Protein-Profililing, bei dem die exprimierten Proteine einer Zellpopulation möglichst detailliert erfasst werden und dann mit dem exprimierten Proteinset einer anderen Zellpopulation verglichen werden. Der Proteomics-Ansatz ist eine obligate Komponente des Gesamtvorhabens, da die Proteine die Effektoren der Zellfunktion darstellen und als solche letztendlich über die zellulären Prozesse wie Proliferation, Differenzierung oder Zelltod entscheiden. Des Weiteren ist eine besondere Herausforderung der Leukämiediagnostik die Aufdeckung der Proteinveränderungen, welche durch charakteristische genetische Veränderungen wie z. B. die Translokation t(8;21) oder die Mutationen in FLT-3 hervorgerufen werden. Viele dieser Veränderungen sind mit dem klinischen Verlauf bestimmter Leukämie-Subtypen assoziiert.

Das beim Protein-Profililing am häufigsten eingesetzte Verfahren ist die zweidimensionale Gelelektrophorese, in der größere Proteine zunächst aufgrund ihrer Ladungseigenschaften und anschließend aufgrund ihrer Masse separiert werden. Außerdem werden moderne massenspektrometrische Verfahren wie die SELDI-MS- oder die

Abb. 1

Darstellung der Fluoreszenzintensitäten eines cDNA-Microarrays nach Hybridisierung mit einer cDNA-Probe eines Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML); links ein Überblick über das komplette Microarray mit mehr als 40 000 „Spots“; rechts Ausschnittsvergrößerungen mit 4 x 6 Feldern bzw. einem Feld mit 29 x 30 Spots. Jeder Spot beinhaltet cDNA eines Gens. Ein rotes Signal (z. B. Nr. 1) steht für eine stärkere Expression, ein grünes Signal (z. B. Nr. 2) für eine schwächere und ein gelbes Signal (z. B. Nr. 3) für eine gleich starke Expression des jeweiligen Gens in der AML im Vergleich mit einer Referenzprobe. Bei fehlender Hybridisierung bleibt der Spot schwarz.



MALDI-TOF-Analysen, z. T. nach vorheriger chromatographischer Aufbereitung bestimmter Proteinfraktionen, zur Auftrennung und Identifizierung von Proteinen verwendet.

Bioinformatik

Essenzielle Voraussetzung für die Nutzung der Daten globaler Gen- und Proteinexpressionsanalysen ist die bioinformatische Verarbeitung der enorm großen Datenmengen. In den vergangenen Jahren wurden verschiedene bioinformatische Verfahren und mathematische Algorithmen zur Analyse von Expressionsdaten entwickelt und erprobt (9). Prominente Verfahren sind hier z. B. das hierarchische Clustering (4, 5) zur Identifizierung von Fallgruppen mit ähnlichem Expressionsprofil und SAM, ein Verfahren zur Bestimmung der Signifikanz unterschiedlicher Genexpressionsmuster (11).

Die Nutzung einer gemeinsamen Projekt-Datenbank für die Ergebnisse der Mi-

croarray-Analysen und zukünftig auch der Proteomics-Ergebnisse soll die sichere Aufbewahrung und Auffindung der Daten gewährleisten. Die Datenbankstruktur der ausgewählten „ICHIP“-Datenbank (12) ermöglicht die Einhaltung des international geforderten MIAME (minimal information of microarray experiments)-Standards (1). Hierdurch wird die Speicherung aller notwendigen Informationen, ausgehend vom experimentellen Design über die Zusammensetzung des Patientenkollektivs bis zur experimentellen Durchführung, zusammen mit den Ergebnissen der Microarray-Analyse sichergestellt.

Aktueller Stand des Genomics-Einsatzes in der Leukämieforschung

Akute und chronische Leukämien gehörten nicht zuletzt wegen der einfachen Proben-

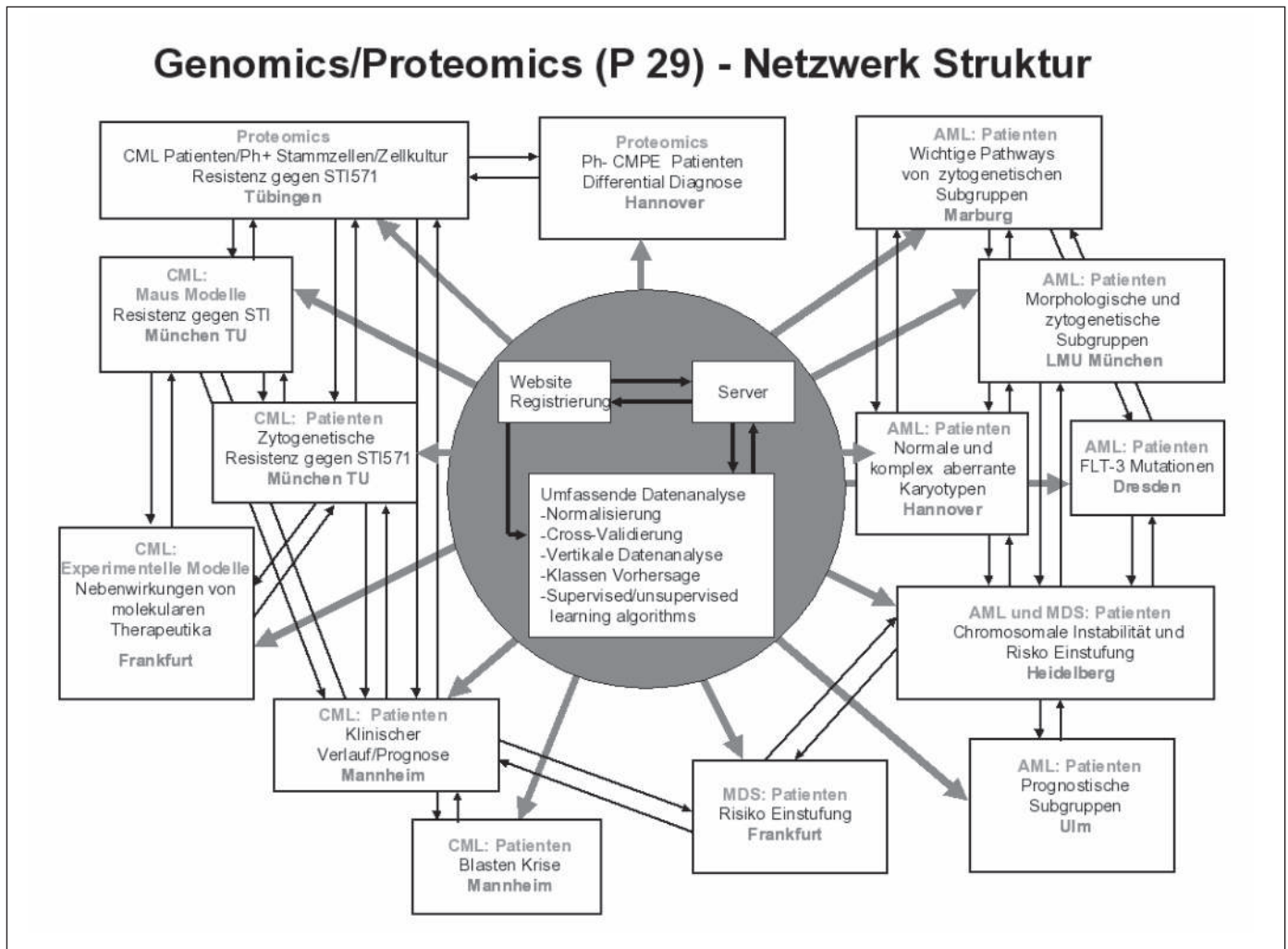


Abb. 2 Netzwerkstruktur des Teilprojekts „Genomics/Proteomics“ (AML = akute myeloische Leukämie, CML = chronische myeloische Leukämie, MDS = myelodysplastisches Syndrom, CMPE = chronische myeloproliferative Erkrankung, STI = Signaltransduktions-Inhibitor, Ph = Philadelphia-Chromosom, FLT-3 = FMS-like tyrosine kinase 3)

gewinnung und Probenaufarbeitung zu den ersten Studienobjekten der Microarray-Analyse. 1999 gelang es in einer „Proof-of-principle“-Analyse erstmals, nur anhand der Genexpressionsprofile von Leukämiezellen die beiden Hauptgruppen der akuten Leukämien, akute lymphoblastische und akute myeloische Leukämie, zuverlässig zu unterscheiden (6).

Durch Arbeitsgruppen aus dem Netzwerk wurden wichtige Ansätze zur Klassifikation akuter Leukämien, zur Identifikation neuer Leukämie-Subtypen und Vorhersage des Therapieansprechens geleistet: Für drei genetisch definierte Subtypen der akuten myeloischen Leukämie – t(8;21), t(15;17), inv16 oder t(16;16) – konnte gezeigt werden, dass diese anhand ihres Genexpressi-

onsprofils voneinander abgegrenzt werden können (10).

Aktuelle Untersuchungen deuten darauf hin, dass akute myeloische Leukämien mit normalem Karyotyp anhand des Genexpressionsprofils in zwei Gruppen mit günstiger und ungünstiger Prognose unterteilt werden können (2). Ein weiteres Anwendungsgebiet besteht in der „Vorhersage“ der Wirksamkeit von Medikamenten bzw. in der Aufklärung des Wirkungsmechanismus von Medikamenten. In einer retrospektiven Studie mit Philadelphia-Chromosom-positiven akuten lymphoblastischen Leukämien wurde das Therapieansprechen auf den selektiven Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib mit dem Genexpressionsprofil korreliert. Anhand von 95 Genen

konnte Sensibilität bzw. Resistenz gegenüber Imatinib vorhergesagt werden (8). Von Burchert et al. wurde gezeigt, dass bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie nur Interferon- α , nicht aber Imatinib die Expression von Myeloblastin induziert und dadurch eine spezifische T-Zell-Antwort auslöst, was für eine mögliche Kombination der beiden Therapien von Interesse ist (3).

Erarbeitung von Qualitätsstandards

Der Zusammenschluss verschiedener Arbeitsgruppen mit entsprechender experi-

menteller Erfahrung (Abb. 2) im Rahmen der Teilprojekte bildet die Grundlage zur Erarbeitung von Qualitätsstandards für das Gen- und Proteinexpressions-Profilierung und von gemeinsamen Minimalstandards für die bioinformatische Auswertung, um die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Experimente zu optimieren. Dies ist die Grundlage für die diagnostische Anwendung von Gen- und Proteinexpressionsanalysen.

Als erster Schritt in Richtung Etablierung qualitätssichernder Maßnahmen wurde eine detaillierte Dokumentation der von

den einzelnen Netzwerkpartnern angewandten Methodik des Genexpressions-Profilierung erarbeitet. Des Weiteren werden Ringversuche für die Microarray-Analysen durchgeführt, um den Einfluss der in den Arbeitsgruppen unterschiedlich durchgeführten einzelnen Arbeitsschritte zu untersuchen. Bisher unterscheiden sich z. B. präanalytische Schritte wie Transportzeit und Lagerung der Proben, aber auch die Microarray-Plattformen zwischen einzelnen Arbeitsgruppen.

Literatur

1. Brazma A et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* 2001; 29: 365–71.
2. Bullinger L et al. Gene expression profiling suggests prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350: 1604.
3. Burchert A et al. Interferon-alpha, but not the ABL-kinase inhibitor imatinib (STI571), induces expression of myeloblastin and a specific T-cell response in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2003; 101: 259–64.
4. Eisen MB et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 14863–68.
5. Getz G, Levine E, Domany E. Coupled two-way clustering analysis of gene microarray data. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 12079–84.
6. Golub TR et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999; 286: 531–7.
7. Hehlmann R et al. The German competence network “Acute and chronic leukemias”. *Leukemia* 2004; 18(4): 665–9.
8. Hofmann WK et al. Relation between resistance of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia to the tyrosine kinase inhibitor STI571 and gene-expression profiles: a gene-expression study. *Lancet* 2002; 359: 481–6.
9. Quackenbush J. Computational analysis of microarray data. *Nat Rev Genet* 2001; 2: 418–27.
10. Schoch C et al. Acute myeloid leukemias with reciprocal rearrangements can be distinguished by specific gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(15): 10008–13.
11. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 5116–21.
12. <http://www.dkfz.de/ibios/ngfnServices/dataManagement/index.jsp>

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. med. B. Schlegelberger
Institut für Zell- und Molekularpathologie
Medizinische Hochschule Hannover
Carl-Neuberg-Str. 1
30625 Hannover
Tel.: 05 11 / 5 32 45 22
Fax: 05 11 / 5 32 45 21
E-Mail: schlegelberger.brigitte@mh-hannover.de

Fazit für die Praxis

Genomics und Proteomics sind Techniken mit großem Potenzial zur Revolutionierung der Leukämiediagnostik und zur Identifizierung neuer therapeutischer Zielstrukturen. Mit der Erarbeitung von Qualitätsstandards in der Gen- und Proteinexpressionsanalyse kann ein wesentlicher Beitrag geleistet werden zur Einführung dieser Technologien als diagnostisches Verfahren.