
1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einleitung

Ein jeder Organismus ist viel mehr als nur die Summe all seiner Gene. In jeder Körperzelle besitzt der Mensch etwa 35.000 Gene, in denen alle Informationen gespeichert sind, um sämtliche notwendigen Lebensvorgänge und Prozesse zu bewerkstelligen und aufrechtzuerhalten. Zusammengesetzt aus den vier Grundbausteinen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin bestimmen sie die Struktur der Proteine, steuern den Aufbau der Zellen, Gewebe und Organe sowie eine Vielfalt biologischer Funktionen. Diese Steuerung der Vorgänge vom Gen zum funktionsfähigen Protein, sowie des Netzwerkes komplexer Interaktionen und Signalkaskaden bedarf des komplexen Zusammenspiels vieler Faktoren. Dafür ist eine komplizierte Informationsverarbeitung notwendig, vielfältige Interaktionen von Signalüberträgern, Hormonen und ihren Rezeptoren. Die störungsfreie Kommunikation der verschiedenen Zellen untereinander, Signale, die übertragen werden, Proteine, die miteinander Wechselwirkungen eingehen, sind Voraussetzung für die fehlerfreie Funktion aller Vorgänge in der Zelle. Aber erst durch eine fein abgestimmte Regulation der einzelnen Interaktionen kann auch die Vielfalt der Eigenschaften und Funktionen der einzelnen Zellen, Gewebe und auch der Unterschiede der Organismen gewährleistet werden. Generell sind die meisten Gene die überwiegende Zeit abgeschaltet. So werden zu einer bestimmten Zeit in einer individuellen Zelle nur etwa 20% aller Gene transkribiert, die die Spezifität dieser Zelle ausmachen. So besitzt zwar auch jede Körperzelle ein Gen für die Augenfarbe des Menschen, es ist dort jedoch nicht aktiv. Aus einer winzigen befruchteten Eizelle kann sich nur deshalb ein gesunder Organismus mit all seinen verschiedenen Organen entwickeln, weil die einzelnen Gene jeweils zu präzisen Zeitpunkten und in bestimmten Zellen exprimiert werden und die Zelle nur dann die entsprechenden Proteine hervorbringen kann. Da in jeder Zelle prinzipiell das gesamte genetische Material zur Verfügung steht, aber nur bestimmte Gene benötigt werden und somit zur Expression kommen, ist eine strenge Regulation notwendig, um dieses spezielle Expressionsmuster aufrechtzuerhalten und speziellen Bedingungen anzupassen. Ist dieser komplizierte Ablauf gestört, kann es zu Fehlfunktionen, wie etwa einer Erbkrankheit oder Krebs, kommen. Eine Erbkrankheit oder Krebs kann entstehen, wenn beispielsweise ein Gen nicht mehr regelrecht reguliert werden kann oder wenn aus defekten Genen Proteine mit fehlerhafter Aminosäuresequenz translatiert werden. Ist ein Gen in einer Zelle angeschaltet, dann erhalten die Ribosomen der Zelle eine Abschrift (mRNA) davon und produzieren mit dieser genetischen Information eine entsprechende Kette aus Aminosäuren, die sich zu einem Protein faltet. Die

Proteine spielen die Hauptrolle im Stoffwechsel einer Zelle, eines Organs und letztlich eines Organismus.

Organismen einer Art unterscheiden sich aus genetischer Sicht nur minimal, selbst Organismen unterschiedlicher, verwandter Arten weisen Abweichungen hinsichtlich der DNA-Sequenz von nur wenigen Prozent auf. Trotzdem sind oftmals schon die kleinsten Abweichungen von der normalen Abfolge der Nucleotidsequenz, wie eine einzige Basensubstitution ausreichend, schwerwiegende Defekte hervorzurufen oder Krankheiten wie Krebs auszulösen. Diese kleinsten Veränderungen können eine Änderung in der Regulation der Transkription oder Änderungen der Tertiärstruktur der betreffenden Proteine bewirken, die so ihre Funktion nicht mehr regelrecht ausführen können und somit die komplexen Regulationsabläufe der Zelle verändern oder blockieren. Nur bis zu 3% der mRNA-Population, so wird angenommen, unterscheiden sich zwischen einer entarteten Krebszelle und der entsprechenden normalen Zelle (Zhang, L. *et al.*, 1997).

So ist trotz aller intensiver Bemühungen bis heute kein allgemeingültiger Durchbruch in der Krebstherapie gelungen. Auch in der heutigen Zeit lautet in Deutschland bei Männern und Frauen nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Ursache aller Todesfälle Krebs. Jeder Dritte stirbt an einer Erkrankung des Herz-Kreislauf-Systems, jeder Vierte an den Folgen einer Krebserkrankung. Eine Übersicht über die häufigsten Todesursachen in Deutschland ist in der Abb. 1-1 dargestellt (siehe auch: <http://www.dkfz-heidelberg.de>). Danach erkranken Männer mit 27.7% etwas häufiger an einer der verschiedenen Krebsarten als Frauen mit 22.5% (unterschiedliche Anfälligkeit der Geschlechter, unterschiedlicher Hormonhaushalt, anderer Lebensstil). Auch sind die unterschiedlichen Krebsarten bei Männern und Frauen verschieden häufig.

Die häufigsten Todesursachengruppen in Deutschland 1999

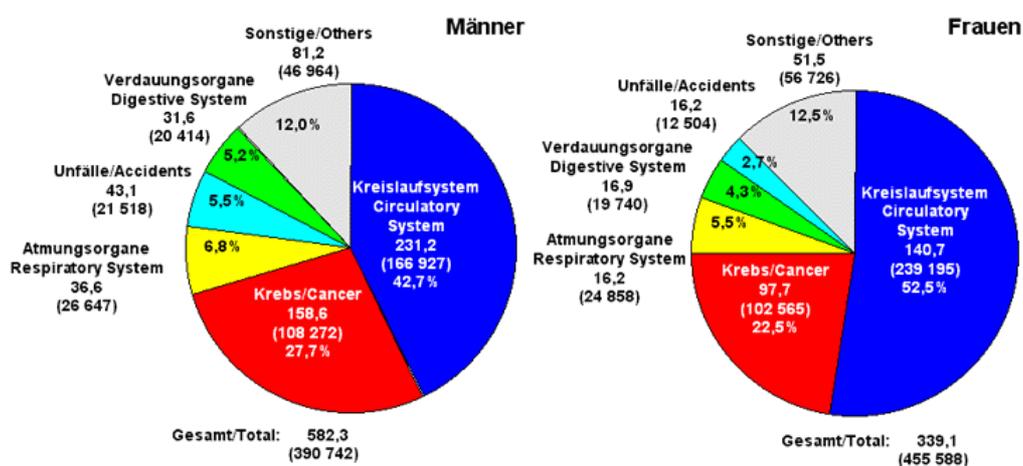


Abb. 1-1 Die häufigsten Todesursachen in Deutschland im Jahr 1999

Dargestellt sind jeweils die Todesursachengruppe, die altersstandardisierte Mortalitätsrate, die Anzahl der Todesfälle sowie der prozentuale Anteil an allen Todesfällen im Vergleich zwischen Männern und Frauen.

(verändert nach <http://www.dkfz-heidelberg.de>)

Jährlich erkranken in Deutschland schätzungsweise 350.000 Menschen an Krebs. Im Jahr 1999 starben mehr als 210.800 an den Folgen dieser Erkrankung. Davon sind bei Männern am häufigsten Lunge, Darm und Prostata betroffen, bei Frauen Brust, Darm und Lunge. Eine Übersicht über die häufigsten Krebstodesursachen bei Männern und Frauen ist in der Abb. 1-2 dargestellt. Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Krebsarten hinsichtlich der prozentualen Verteilung in beiden Geschlechtern zum Teil sehr stark.

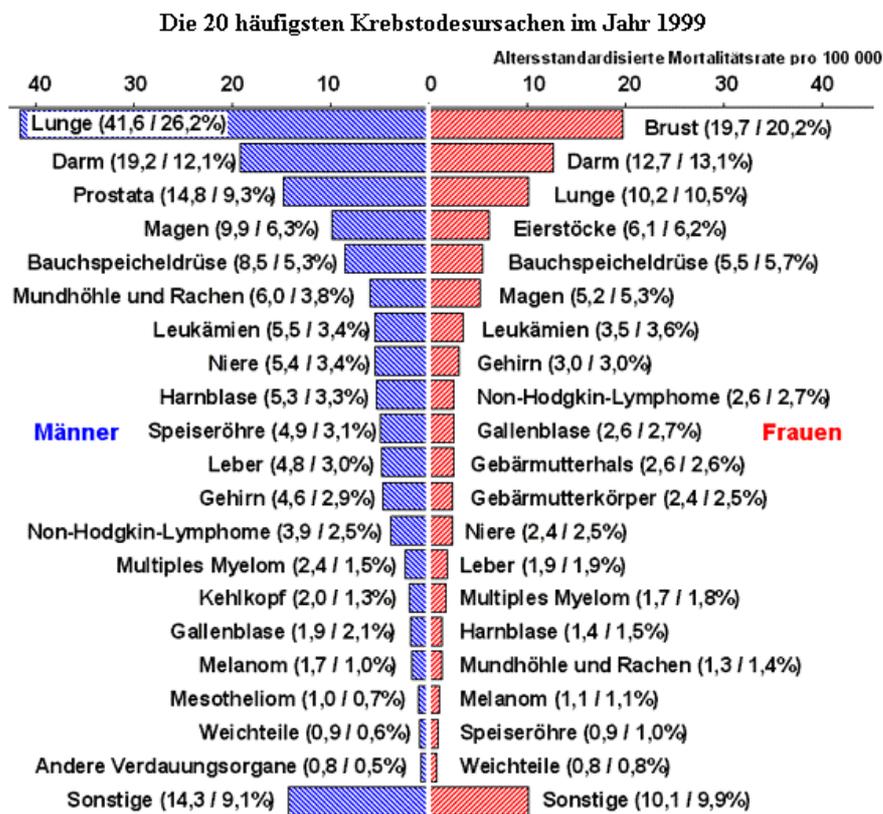


Abb. 1-2 Die häufigsten Krebstodesursachen in Deutschland im Jahr 1999

Dargestellt sind die Krebstodesursachen nach ihrer Häufigkeit im Vergleich zwischen Männern und Frauen. Die am häufigsten von einer Krebserkrankung betroffenen Organe sind in der folgenden Reihenfolge bei Männern: Lunge, Darm und Prostata, bei Frauen: Brust, Darm und Lunge. Dabei sind die verschiedenen Organe bei Männern und Frauen hinsichtlich der prozentualen Verteilung unterschiedlich stark betroffen (**Lunge**: Männer 26.2%, Frauen 10.5%; **Mundhöhle und Rachen**: Männer 3.8%, Frauen 1.4%; **Harnblase**: Männer 3.3%, Frauen 1.5%) (nach <http://www.dkfz-heidelberg.de>).

Die Anzahl der Krebserkrankungen war in den letzten Jahren leicht steigend, nicht zuletzt aber auch zurückzuführen auf die zunehmende Lebenserwartung der Bevölkerung in den Industrieländern. Bleibt der derzeitige Trend bestehen, und werden in nächster Zeit keine durchschlagenden Erfolge in der Krebsprävention und Therapie erzielt werden, könnte sich in einigen Jahren Krebs zur häufigsten Todesursache entwickeln.

Eine besonders umfangreiche und vielfältige Krebsform, wenngleich auch nicht die häufigste, sind die als neoplastische Erkrankungen bezeichneten Entartungen von Zellen des blutbildenden und lymphoretikulären Systems. In immer größerem Maße verstärken sich die Erkenntnisse über eine sehr enge Beziehung zwischen dem cytogenetischen Befund und den klinischen Eigenschaften, wie dem Ansprechen auf bestimmte Medikamente oder der Überlebensrate einer leukämischen Erkrankung (Gebhart, E., 1989). Noch immer gibt es nicht die optimale Therapie, mit der in nahezu allen Fällen eine Aussicht auf Heilung besteht. Die besten Ergebnisse der adulten Leukämien geben eine etwa 60%-ige 5-Jahresüberlebenschance bei einer Leukämie des Typs ALL (akute lymphoblastische Leukämie) (Rubnitz, J. E. *et al.*, 1999(a); Rubnitz, J. E. *et al.*, 1999(b)).

Die klinische Symptomatik verschiedener Leukämieformen ist oft relativ ähnlich, die Behandlung der unterschiedlichen Leukämiearten aber ist sehr verschieden. Daher besteht ein großer Bedarf an differenzierter Diagnostik dieser Subtypen.

Der Trend der Forschung auf diesem Gebiet hin zu umfassenden Untersuchungen der Genexpression ist unumgänglich. Neue Medikamente für wirksamere Therapien zu finden, neue Angriffspunkte für diese Wirkstoffe zu erkennen, dafür sind Techniken und Verfahren in großem Maßstab notwendig. Das Bestreben, neue Techniken zu entwickeln, Hunderte von Sequenzen gleichzeitig zu analysieren, all dies sind Fragestellungen, mit denen sich die moderne Immunologie heutzutage auseinandersetzen muß. Hochdurchsatz-Verfahren entstehen nun auch in der Immunologie und Onkologie in unserer Zeit.

Die in dieser Arbeit zu untersuchenden Zellen sind Zellen des humanen Immunsystems, die von Patienten mit jeweils einer akuten T-Zell-Leukämie bzw. einer akuten NK-Zell-Leukämie isoliert wurden und als Zell-Linien etabliert sind. Zum einen ist dies eine T-Zell-Linie (Jurkat), zum anderen eine Natural Killer-Zell-Linie (NKL). Beides sind Zelltypen, die häufiger in Leukämieerkrankungen involviert sind. Mit der Analyse und dem Vergleich beider Zell-Linien in Bezug auf ihre Genexpression soll sich diese Arbeit befassen.

1.2 Krebs

Ein normales Wachstum, die Entwicklung und Funktion von Zellen eines Organismus benötigen eine präzise und koordinierte Kontrolle der Genexpression. Die Regulation dieser Vorgänge wird hauptsächlich auf der Ebene der mRNA ausgeführt, anhand der Regulation der Produktion der mRNA. Darin involviert sind komplexe Interaktionen zwischen transkriptional aktiven Proteinen und spezifischen regulatorischen DNA-Sequenzen, die Voraussetzung für das Überleben einer Zelle oder eines Organismus sind (Cox, P. M. *et al.*, 1991). Dysregulationen dieser empfindlichen Vorgänge, wie der Transkription, können im Fehlen einiger Gene, die verantwortlich für die zelluläre Differenzierung sind, oder in der Überexpression anderer Gene, die in die Zellteilung involviert sind, resultieren, wodurch Neoplasien und andere Krebsformen verschiedenster Art ausgelöst werden können (Nelson, N. J., 2001).

Krebs ist eine allgemeine Bezeichnung für bösartige Neubildungen (Tumoren). Im engeren Sinne wird damit ein Karzinom (maligner epithelialer Tumor) bzw. ein Sarkom (maligner mesenchymaler Tumor) bezeichnet (Pschyrembel, W., 2002). Krebserkrankungen sind eine heterogene Familie komplexer Erkrankungen, die durch genotypische und phänotypische Veränderungen in einer enormen Variabilität charakterisiert sind und sich im klinischen Erscheinungsbild und Verhalten, den Ursachen sowie den Aussichten auf Heilung unterscheiden.

Mit dem Wort "Krebs" beschreibt man umgangssprachlich bösartige Neubildungen. Gutartige ("benigne") Neubildungen bestehen aus Zellen, die den normalen Zellen ähneln und an sich nicht "bösartig" sind: d.h., sie metastasieren nicht und erzeugen damit keine Tochtergeschwülste, und sie durchdringen beim eventuellen Wachstum das umgebende Gewebe nicht. Die häufigsten benignen Tumoren sind die sogenannten Muttermale, die Fettgeschwülste (Lipome), die Gefäßgeschwülste (Hämangiome) und die Muskelzellgeschwülste (Myome). Die gutartigen Neubildungen können allerdings auch lebensbedrohlich werden: z.B., wenn sie durch ihr Wachstum auf lebenswichtige Organe, wie z.B. das Gehirn oder das Rückenmark, drücken oder wenn sie platzen und dabei eine starke Blutung entsteht.

Bösartige ("maligne") Neubildungen (Krebs), bestehen aus "entarteten" Zellen, die anders aussehen, sich anders und schnell teilen und dabei das gesunde Gewebe zerstören und die meist von dem Ursprungsort aus über das Blut oder das Lymphsystem in andere Organe absiedeln und sich dort als Tochtergeschwülste (Metastasen) weiter vermehren.

Es gibt zwei große Gruppen der bösartigen Neubildungen: zum einen die soliden Tumoren und zum anderen die bösartigen Hämoblastosen. Die soliden Tumoren lassen sich weiterhin einteilen in

- a.) die Karzinome (sie entstehen aus entarteten Epithelzellen der Haut, der Schleimhaut sowie der Drüsenzellen) und
- b.) die Sarkome, die aus entarteten Bindegewebszellen als Fibrosarkome, Muskelzellen als Myosarkome, Fettzellen als Liposarkome, Knochenzellen als Osteosarkome entstehen, um die wichtigsten zu nennen.

Zu den Hämoblastosen gehören z.B. die Leukämien. Sie entstehen aus den Zellbestandteilen des Blutes und der blutbildenden Organe.

Die Malignität ist gekennzeichnet durch Änderungen der morphologischen und biochemischen Eigenschaften der Zellen. Zu den morphologischen Eigenschaften zählen die autonome Zellvermehrung, ein invasives Wachstum, ungeordnete Zell-Zell-Wechselwirkungen und metastatische Ausbreitung der Zellen. Die biochemischen Eigenschaften maligner Zellen beinhalten unter anderem eine hohe aerobe Glycolyse, eine gesteigerte Nährstoffaufnahme, ein verändertes Enzymmuster (vor allem eine hohe Aktivität DNA- und RNA-synthetisierender Enzyme) sowie eine veränderte Methylierungszeit der tRNA. Auch die Abgabe von Katalasen, Kollagenase und Plasminogenaktivator (verursacht Fibrinolyse) nach außen kann beobachtet werden. Dies führt zur Schädigung des angrenzenden normalen Gewebes, zur Freisetzung von Nährstoffen für den Tumor, zur Änderung der Oberflächenbeschaffenheit der Zellen und damit zur Veränderung ihrer Oberflächenantigene (Tumorantigene) (Lodish, H. *et al.*, 1996).

Transformierte Zellen, Zellen, aus denen sich Tumoren entwickeln können, weisen im Vergleich zu den gesunden Zellen, aus denen sie hervorgegangen sind, auch noch einige andere bedeutende Unterschiede auf. Viele dieser Veränderungen sind es, die es ihnen überhaupt erst ermöglichen, unabhängig zu wachsen und zu expandieren. Die Veränderungen transformierter Zellen sind besonders gut in kultivierten Zellen nachzuweisen. Man kann eine Reihe typischer Wachstums- und Teilungsanomalien beobachten, so beispielsweise Veränderungen hinsichtlich der Zellform, der Wechselwirkungen der Zellen untereinander, der Membraneigenschaften, der Strukturen des Cytoskeletts, der Proteinsekretion und der Genexpression. Eine Übersicht über Veränderungen transformierter Zellen ist in der Abb. 1-3 dargestellt.

<p>Veränderung der Wachstumsparameter und weiterer Zelleigenschaften</p> <ul style="list-style-type: none">verminderter Bedarf an Wachstumsfaktoren, autokrine StimulationVerlust der Fähigkeit, das Wachstum zu beendenAdhäsionsverlust, Wachstum auch ohne „Verankerung“Veränderung der Zellform und der WachstumseigenschaftenVerlust der Kontakthemmung der Bewegung <p>Veränderungen der Zelloberfläche</p> <ul style="list-style-type: none">erhöhte Beweglichkeit von Plasmamembranproteinen (veränderte Gestalt der Zellen)erhöhter Glucoseeinstrom (hohe glycolytische Aktivität)verminderter Gehalt oder vollständiger Mangel an Fibronectin auf der Zelloberfläche <p>Verlust der Actin-Microfilamente</p> <ul style="list-style-type: none">erhöhte Beweglichkeit membranständiger Proteine <p>Sekretion von transformierenden Wachstumsfaktoren</p> <ul style="list-style-type: none">Hormone wie TGFα, TGFβ, die eigentlich das Wachstum normaler Zellen stimulieren und das der Embryonalzellen steuern <p>Proteasesekretion</p> <ul style="list-style-type: none">Produktion von Plasminogenaktivator, eventuell besteht ein Zusammenhang dieser Eigenschaft mit der Malignität eines TumorsErleichterung der Durchquerung der Basallamina und somit der Invasion der malignen Zellen <p>Veränderte Gentranskription</p> <ul style="list-style-type: none">mRNA-Muster in normalen und transformierten Zellen weitgehend übereinstimmend, zwar ist der Gehalt einiger mRNA-Arten erhöht oder erniedrigt, aber nur etwa 3% der gesamten mRNA sind für transformierte Zellen spezifisch, wahrscheinlich zählen hierzu mRNAs, die nur in sehr geringer Zahl in der Zelle vorhanden sind <p>Bildung unsterblicher Zell-Linien</p>
--

(Lodish, H. *et al.*, 1996)

Abb. 1-3 Veränderungen transformierter Zellen

Transformationen bewirken vielfältige Veränderungen der Funktion und Struktur der Zellen.

1.2.1 Ethologie der Carcinogenese

Die Entstehung der Krebserkrankungen im Allgemeinen und der Leukämien im Speziellen ist nicht genau geklärt, jedoch beruht sie auf einem komplexen Zusammenwirken verschiedener Faktoren vielfältiger Natur. Winzige Veränderungen auf genetischer Ebene (Punktmutationen, Deletionen) können die Voraussetzung für die Entstehung und Entwicklung eines Tumors sein. Eine Anzahl von Translokationen konnte mit der Entstehung von Leukämien in Zusammenhang gebracht werden. Man vermutet eine mögliche Beziehung zu Lebensstil und Umweltfaktoren. Auch dem höheren sozioökonomischen Status wird eine gewisse Bedeutung an der Entstehung von

Krebserkrankungen beigemessen. Einige Faktoren stehen in Verbindung mit einem erhöhten Risiko, an Krebs zu erkranken (McCauley, D. L., 1992). Es gibt nicht „die einzige Ursache“. Ein Onkogen allein ist nicht in der Lage, malignes Wachstum zu induzieren. Um eine derartige Krankheit auszulösen, sind immer mehrere Veränderungen in der Zelle (Mutation multipler Gene) über einen längeren Zeitraum notwendig. Es gibt zahlreiche Onkogene, von denen bisher mehr als 100 bereits bekannt sind und auf den humanen Chromosomen lokalisiert werden konnten. Verschiedene Onkogene müssen sich in ihrer Wirkung ergänzen (synergistische Wirkung der Onkogene), was für einen Mehrstufenprozeß (*multi stage process*) spricht. Dafür sprechen auch folgende Beobachtungen bei der Carcinogenese:

- a) Die Zahl der Krebserkrankungen nimmt mit fortschreitendem Alter zu,
- b) Es besteht ein Synergismus zwischen den einzelnen Onkogenen, was besonders bei *ras* (GTP-bindendes Protein mit GTPase-Aktivität, intrazellulärer Signalüberträger) und *myc* (an der Regulation der Transkription beteiligtes Protein) zutreffend ist,
- c) Tumoren sind meist monoklonal, das heißt, sie sind aus einer einzigen anomalen Zelle hervorgegangen. Die Krebsentstehung wird daher erst durch mindestens ein zweites, selteneres Ereignis ausgelöst, oder aber nur nach einem längeren Zeitraum und mit geringerer Wahrscheinlichkeit. Nicht alle Individuen, die ein bestimmtes, verändertes Onkogen aufweisen, werden später auch an einer malignen Entartung erkranken.

Die eine Ursache der Carcinogenese gibt es nicht, jedoch eine vielfältige Anzahl möglicher endogener und exogener Faktoren, die in die Krebsentstehung involviert sind. Die Carcinogenese stellt einen Mehrstufenprozeß dar, der sich aus den drei Stufen der Initiation, der Promotion und der Progression zusammensetzt. Ein Überblick über den Mehrstufenprozeß der Carcinogenese ist in der Abb. 1-4 dargestellt.

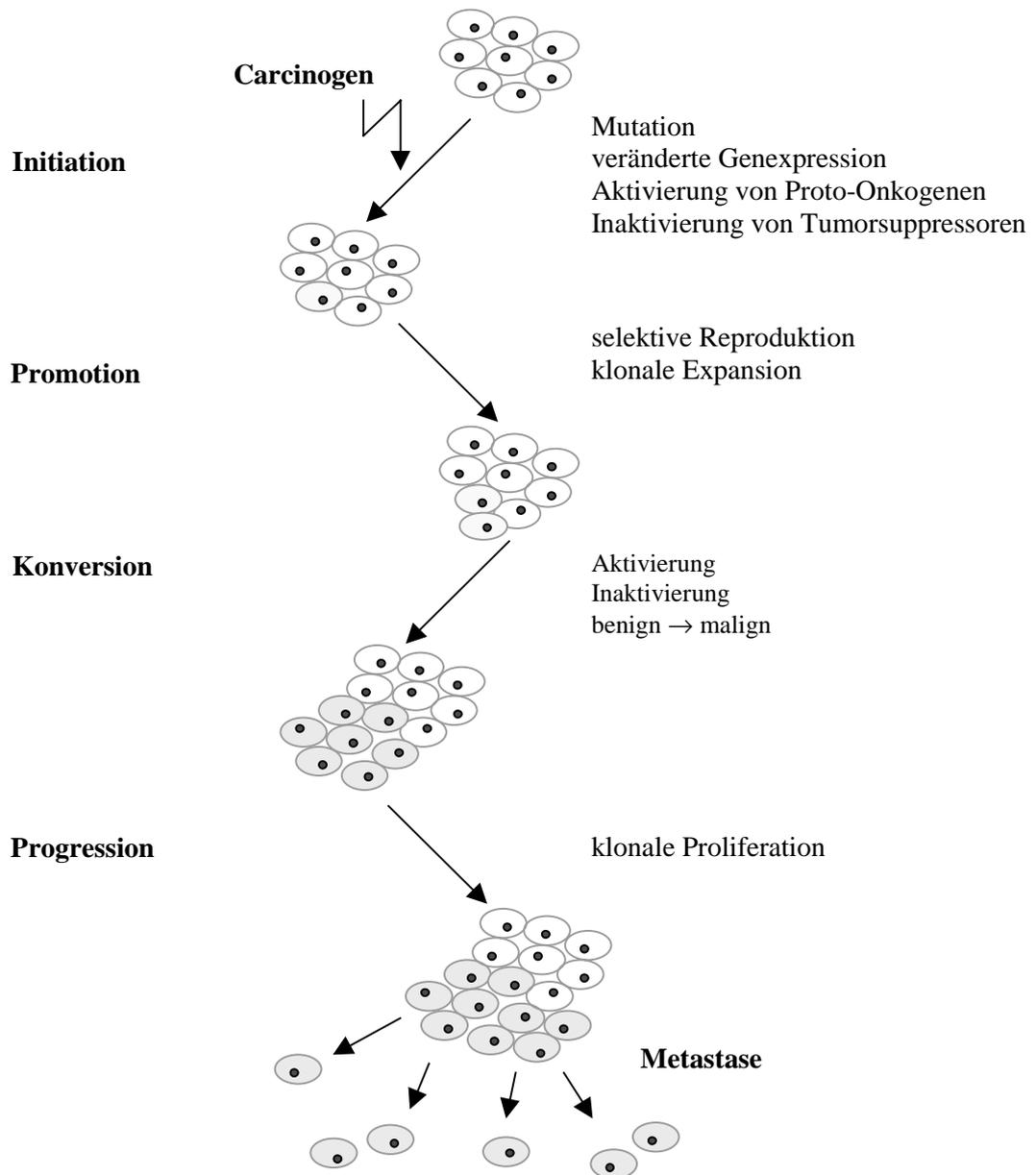


Abb. 1-4 Mehrstufenprozeß der Carcinogenese

Die Carcinogenese ist ein mehrstufiger Prozeß, der mit der Initiation durch ein Carcinogen beginnt, das eine bestimmte Veränderung in der Zelle bewirkt, wie beispielsweise die Aktivierung eines Proto-Onkogens oder die Inaktivierung eines Tumorsuppressors. Diese alterierte Zelle wird während der klonalen Proliferation selektiv vermehrt, ein Vorgang, der als Promotion bezeichnet wird. Weitere Schritte, wie die Aktivierung oder Inaktivierung bestimmter Gene, müssen in der Zelle ablaufen, um die benigne Zelle in eine maligne Zelle umzuwandeln, was mit einem invasiven Wachstum verbunden ist und als Konversion bezeichnet wird. Als Progression bezeichnet man den Schritt, der mit der Proliferation der mehrfach veränderten Zelle einhergeht, die sich nun auch in andere Organe ausbreiten kann (Metastase).

Die Ursachen der Krebsentstehung lassen sich in drei große Gruppen von Risikofaktoren einteilen, die Auslöser für die Carcinogenese sein können oder sie begünstigen. Krebs kann endogen, exogen oder durch Viren bedingt ausgelöst werden. Zu den endogenen Faktoren der Krebsentstehung zählt eine genetische / hereditäre Prädisposition, wie Chromosomenaberrationen (Deletion, Duplikation, Inversion, Translokation), verschiedene angeborene Erkrankungen des Immunsystems sowie diverse Immundefizienzen (congenitale Agammaglobulinämie). Eine Übersicht über die Vielfalt der möglichen Ursachen der Carcinogenese wird in Abb. 1-5 gegeben.

<u>Kategorien bekannter und vermuteter Faktoren der Carcinogenese</u>	
<ul style="list-style-type: none"> • genetisch / hereditär Onkogene / Proto-Onkogene (einige von Retroviren) Translokationen Philadelphia-Chromosom t(9;22); t(4;11), t(1;19) (B-Zell Leukämie) t(8;14), (q24;q32) (T-Zell-Leukämie) Trisomie 21 (Down-Syndrom), Klinefelter-Syndrom (XXY), congenitale Agammaglobulinämie, Neurofibromatosis, Erkrankungen der blutbildenden Systeme (Knochenmarkinsuffizienz) 	
<ul style="list-style-type: none"> • spontane mitotische Defekte 	
<ul style="list-style-type: none"> • Immun-Defizienz 	
<ul style="list-style-type: none"> • exogen / Umweltfaktoren 	
<ul style="list-style-type: none"> Kohlenwasserstoffe Kohlenteer Zigarettenrauch industrielle Faktoren (Asbest) 	<ul style="list-style-type: none"> Medikamente Hormone cytotoxische Drogen
<ul style="list-style-type: none"> Ernährung Fettleibigkeit Alkoholismus 	<ul style="list-style-type: none"> Strahlung ionisierende Strahlung (Röntgenstrahlen) UV-Strahlung
<ul style="list-style-type: none"> chemische Leukämogene Benzol, Chloramphenicol, Phenylbutazon, Zytostatika 	
<ul style="list-style-type: none"> • Viren 	
<ul style="list-style-type: none"> humanes Papilloma Virus (HPV) Herpesviridae Herpes simplex Virus (HSV) Epstein-Barr-Virus (EBV) 	<ul style="list-style-type: none"> Zervixkarzinom B-Zell Lymphom: Hodgkin-Lymphom Burkitt-Lymphom * Nasopharyngeales Karzinom
<ul style="list-style-type: none"> Hepatitis B / C Virus (HBV) (HCV) <i>human T cell lymphotropic virus</i> (HTLV) 	<ul style="list-style-type: none"> Leberkrebs T-Zell-Leukämie

Abb. 1-5 **Mögliche Ursachen der Carcinogenese**

Die Ursachen der Krebsentstehung sind sehr vielfältig und umfassen Gruppen endogener und exogener Faktoren sowie auch verschiedene Viren.

*Vorkommen vor allem bei afrikanischen Kindern bei Infektion mit Malaria.

In der Regel lassen sich bestimmten Tumoren keine spezifischen Chromosomenanomalien zuordnen. Lediglich in einigen Fällen treten bestimmte Anomalien gehäuft auf. So weisen nahezu alle Patienten mit einer CLL (chronische lymphoblastische Leukämie) ein Philadelphia-Chromosom auf, der wohl bekanntesten Translokation $t(9;22)(q34;q11)$. Hierbei kommt es durch eine reziproke Translokation von Teilen der langen Arme der Chromosomen 9 und 22 auf dem Chromosom 22 zur Expression eines onkogenen Fusionsproteins, Bcr-Abl (*breakpoint cluster region*-Ableson-Maus-Leukämie) (de Klein, A. *et al.*, 1982). Das Chromosom 22, welches das Fusionsmolekül aufweist, wird als Philadelphia-Chromosom bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, daß die Expression von Bcr-Abl myeloide Zellen zu transformieren vermag und im Tiermodell CML-ähnliche Krankheitsbilder hervorruft. Bei 95% der Fälle des Vorliegens dieser Translokation kommt es zu einer Ausbildung einer CML (chronische myeloische Leukämie), auch in 20% der ALL-Erkrankungen konnte diese Veränderung nachgewiesen werden. Weitere Translokationen wie z.B. $t(4;11)$ oder $t(1;19)$ konnten bei B-Zell-Leukämien beobachtet werden, andere wiederum bei T-Zell-Leukämien, so die Translokation $t(8;14)(q24;q32)$. Beim Burkitt-Lymphom beispielsweise wurde *c-myc* durch Translokation an ein Antikörper-bildendes Gen transferiert und unterliegt somit der Transkriptionskontrolle und -steuerung dieses Gens. Dadurch wird nun eine kontinuierliche Expression des *c-myc* Gens verursacht, die zur Transformation der Zelle führt und damit zu Krebs aus Antikörper-bildenden Zellen, dem B-Zell-Lymphom. Translokationen sind aber nicht nur Auslöser bestimmter Leukämie- oder Krebsformen, sondern dienen auch der genauen Identifizierung und sind so bei der Diagnostik sowie der Prognose von großer Bedeutung.

Bestimmte Grunderkrankungen und Syndrome weisen ein erhöhtes Risiko der Entstehung einer Krebserkrankung auf. Dazu zählen beispielsweise die Trisomie 21 (Down-Syndrom), das Klinefelter-Syndrom, die congenitale Agammaglobulinämie, die Neurofibromatosis oder Erkrankungen der blutbildenden Systeme (Knochenmarkinsuffizienz). So weisen Patienten mit Down-Syndrom ein stark erhöhtes Risiko (18 - 20-fach) auf, an weiteren Krankheiten zu erkranken, besonders aber an Leukämien (Kriss, V. M., 1999).

Dem erblich erhöhten Risiko zur Tumorbildung, wie z.B. dem Retinoblastom (RB), liegt meist ein Defekt in Tumorsuppressorgenen zugrunde (rezessiver Erbgang) (Cavenee, W. K. *et al.*, 1983). Bei dieser Erkrankung ist ein Allel des RB-Gens mutiert, damit steigt auch die Wahrscheinlichkeit einer Mutation auch auf dem anderen Allel auf 1 von 10^6 .

Auch kann es bei der Zellteilung zu spontanen mitotischen Defekten kommen, die eine Krebserkrankung verursachen können.

Eine wesentliche Rolle in der Krebsentstehung spielen aber auch eine Reihe exogener Faktoren, die sogenannten Umweltfaktoren. Diese umfassen eine große Gruppe verschiedenster Faktoren, der eine noch größere Bedeutung zugeschrieben wird als den endogenen und genetischen Faktoren. In dieser Gruppe sind einige Kohlenwasserstoffverbindungen, industrielle Faktoren (berufsbedingtes erhöhtes Risiko) und chemische Carcinogene / Leukämogene vertreten. Auch bestimmte Medikamente zählen aufgrund ihres Eingreifens in die Wachstumsregulierung zu krebsauslösenden Agenzien, dabei besonders Hormone und cytotoxische Pharmaka. Negativ können sich auch viele Faktoren der Ernährung auswirken, als Beispiel dafür seien Fettleibigkeit und Alkoholismus genannt. Seit langem bekannt ist, daß die Exposition gegenüber verschiedenen Arten von Strahlung -ionisierende Strahlung (Röntgenstrahlen) oder UV-Strahlung- in bestimmten Dosen carcinogen wirken können (Atombombenabwürfe in Hiroshima und Nagasaki). Gerade in letzter Zeit wird auch dem Lebensstil als Ursache eine immer größere Bedeutung beigemessen (Weisburger, J. H., 2001). Es gibt ein erhöhtes Erkrankungsrisiko, das auf die vermehrte Produktion von Sauerstoffradikalen im Körper zurückzuführen ist. Mit den Fortschritten in der Molekularbiologie sind immer mehr auch mutative Ereignisse nachweisbar, die Veränderungen in Tumorsuppressorgenen oder in Onkogenen verursachen (Weinberg, R. A., 1991).

Die dritte Gruppe umfaßt die Alterationen im Genom der Zelle, ausgelöst durch verschiedene DNA- oder RNA-Viren. Einige Viren können die Expression bestimmter Gene oder die Regulation bestimmter Vorgänge in der Zelle so verändern, daß sie Krebserkrankungen auslösen. Sie bewirken auf verschiedene Art und Weise eine Veränderung der Expression der Gene solcher Klassen, die das Zellwachstum kontrollieren. Dazu zählen Tumorsuppressorgene oder Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, intrazelluläre Signalüberträger (*second messenger*) und Zellzyklus-Kontrollgene. Einige DNA- und RNA-Viren besitzen die Fähigkeit, Gene in die infizierten Zellen einzubringen und so kontinuierlich das Wachstum der betreffenden Zelle zu stimulieren.

Die Infektion mit RNA-Viren (dabei besonders Retroviren) kann aufgrund von Promotor- oder Enhancer-Insertion zur Aktivierung eines zum Insertionsort benachbarten Proto-Onkogens führen (LTR der Retroviren). Weiterhin kann es zur Zerstörung von Silencern und zur Amplifikation von Genen und damit ihren Genprodukten, den Proteinen, kommen, wodurch komplizierte Regulationsmechanismen, wie sie z.B. während des Zellzyklus notwendig sind, außer Kraft gesetzt werden. Ein Zusammenhang zwischen einer Virusinfektion und der Carcinogenese war lange Zeit nicht geklärt, da die carcinogene Wirkung der Viren nicht einfach nachweisbar war. Nicht jeder Infizierte erkrankt an Krebs, und vom Zeitpunkt der Infektion bis zum Ausbruch der Krankheit vergehen viele Jahre, bis zu 30 - 50 Jahre. Jedoch kann bei bestimmten Leukämien häufig eine Infektion mit dem HTLV (humanes T-lymphotropes Virus) nachgewiesen werden. Das Burkitt-

Lymphom kann durch das Epstein-Barr-Virus EBV (häufig Kinder in feucht-heißen Gebieten Afrikas) induziert werden. Auch ist dieses Virus an der Entstehung des Nasopharynx-Carcinoms (Südchina) beteiligt. Eine Infektion mit dem Hepatitis B-Virus HBV kann die Entstehung eines primären Leberzell-Carcinoms begünstigen.

1.2.1.1 Bedingungen für die Entstehung von Krebs

Damit Tumoren wachsen oder überhaupt erst entstehen können, müssen auch einige Bedingungen erfüllt sein. Die genetische Veränderung muß für die Zelle von selektivem Vorteil sein, um eine klonale Expansion und Proliferation zu ermöglichen. Das progressive Tumorstadium wird begünstigt durch genetische Instabilität. Solche Instabilitäten können als Chromosomen-Instabilität (CIN), Microsatelliten-Instabilität (MIN) und anhand von Aneuploidien in Erscheinung treten. Als Aneuploidie bezeichnet man eine vom normalen Chromosomensatz abweichende, meist erhöhte Chromosomenzahl.

1.2.1.2 Tumorzell-Widerstandsmechanismen - Escape- und Enhancement-Mechanismen

Einige Tumoren sind nicht immunogen, können also auch nicht vom Immunsystem erkannt werden. Damit aber ein immunogener Tumor wachsen und sich ausbreiten kann, kann und muß er sich durch einige Mechanismen schützen. Solche immunogenen Tumoren können vom Immunsystem eines immunokompetenten Wirtes erkannt werden. Diese Immunogenität der Tumoren wurde bereits in den 50-iger Jahren anhand von chemisch induzierten Tumoren entdeckt. Aber gleichzeitig existiert auch das zentrale Paradoxon des Tumor-Enhancements. Um überhaupt als Tumor wachsen zu können, muß es Mechanismen geben, die es dem Tumor ermöglichen, sich vor dem Immunsystem und seiner Abwehr verbergen und entziehen zu können. Ein progressives Tumorstadium eines immunogenen Tumors ist nur in einem immunokompetenten Wirt möglich. Das Immunsystem selbst fördert das Wachstum des Tumors bzw. unterläßt eine Reaktion gegen ihn. Der Tumor ist zu Beginn seiner Entwicklung einer körpereigenen Zelle zu ähnlich, in späteren Stadien jedoch gibt es keine Abwehr mehr gegen den Tumor, da er nun bereits zu groß ist und auch selbst Mechanismen anwenden kann, um sich vor einer Immunreaktion zu schützen und den Abwehrmechanismen des Immunsystems zu entkommen. Einige Tumoren sind in der Lage, die Immunantwort durch die Produktion des supprimierenden Zytokins TGF β (*transforming growth factor* β) zu inhibieren. Zum Tumor-Enhancement tragen auch die Mechanismen des Verlustes von Oberflächenmolekülen, die für die immunologische Erkennung relevant sind (MHC-Klasse-I oder

II) oder das Fehlen von Adhäsionsmolekülen (E-Cadherin, LFA-1, LFA-3 (*lymphocyte function-associated antigen*)) (Behrens, J. *et al.*, 1992) bei. Auch ein Dazugewinn von Molekülen, die für die metastatische Fähigkeit notwendig sind, kann von Vorteil für die Entwicklung des Tumors sein. Eine Übersicht über die wichtigsten Mechanismen des Tumors, sich dem Immunsystem zu entziehen, wird in der Abb. 1-6 gegeben.

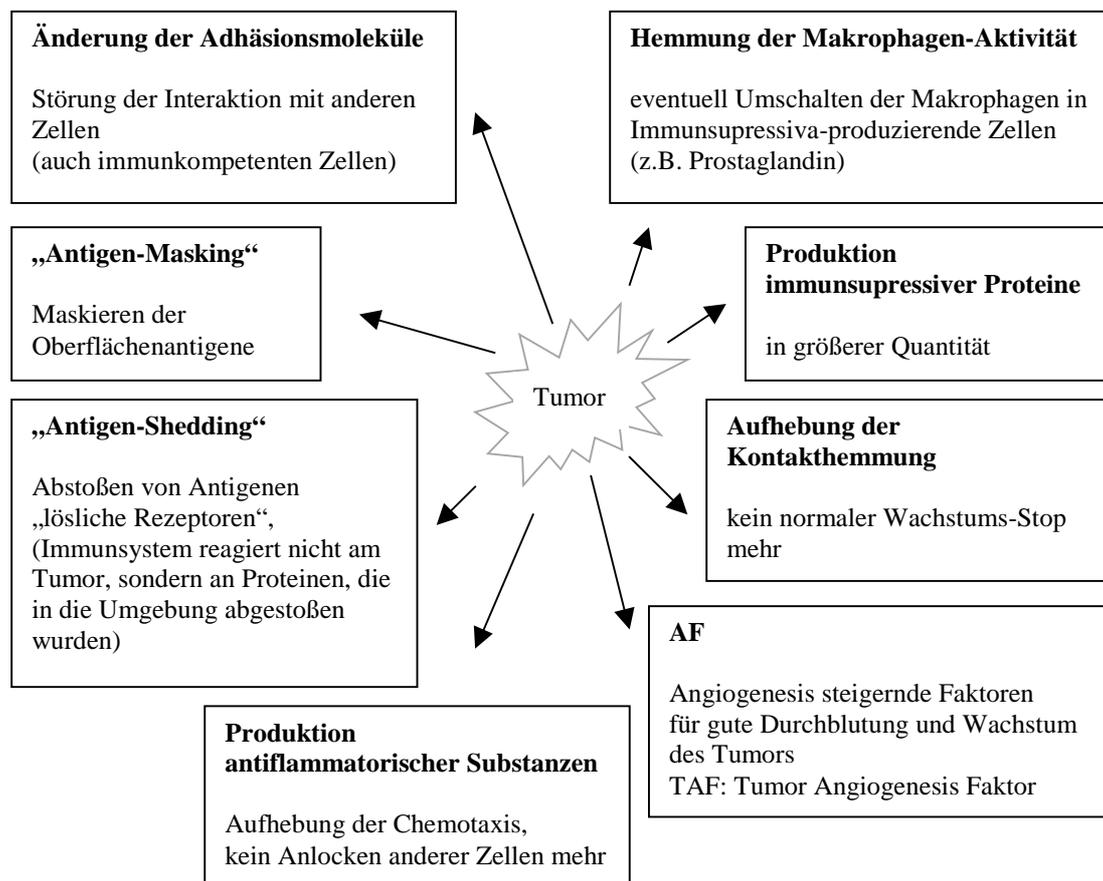


Abb. 1-6 Strategien des Tumor-Enhancement

Dargestellt sind einige der Mechanismen, die Tumoren aktiv gegen die Abwehr durch das Immunsystem einsetzen können.

1.2.2 Proto-Onkogene - Onkogene

Gene, die durch Mutation oder Überexpression eine maligne Transformation von Zellen und die Bildung von Tumoren bewirken können, werden als Proto-Onkogene bezeichnet. Die normalen zellularen Formen werden zelluläre Proto-Onkogene genannt und stellen Gene dar, die im normalen Zellstoffwechsel und Wachstum eines Organismus eine wesentliche Rolle spielen. Onkogene liegen zumeist in der Zelle als Proto-Onkogene vor. Ihre cancerogene Wirkung erhalten

sie durch die Veränderung der Genstruktur oder der Transkriptionsregulation (Fehlregulation der Expression), wodurch sie zu Onkogenen werden können. Zu einer Onkogenaktivierung kann es durch Translokation und Punktmutation (*abl/bcr*), durch Amplifikation (*c-abl*, *c-myb* (*Avian myeloblastosis*)) oder durch den Verlust von Kontrollgenen kommen. Onkogene lassen sich aufgrund ihrer Funktion, mit der sie zur Wachstumskontrolle beitragen, fünf verschiedenen funktionellen Klassen zuordnen.

1.2.2.1 Onkogen-Klassen

Klasse I Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Polypeptidhormone, die von membranständigen Rezeptoren (häufig Thyrosin-spezifische Proteinkinasen) gebunden werden und daraufhin eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen, mit der entweder die Proliferation oder die Differenzierung der Zelle aktiviert wird. Wird durch eine Mutation die Struktur oder die Expression dieser Gene verändert, so bewirken sie als Onkogene dominante Wachstumsveränderungen. Zu den natürlichen Onkogenen dieser Gruppe zählt *sis* (*Simian sarcoma*), das für eine veränderte Form der β -Kette des Wachstumsfaktors PDGF (*platelet-derived growth factor*) codiert. Onkogene können auch künstlich hergestellt werden. So kann das Transferieren eines Gens für einen stimulierenden Faktor in eine Zelle, die bereits einen solchen Faktor besitzt, zu einer autokrinen Induktion und damit zum Wachstum der Zelle durch zusätzliche Produktion von beispielsweise GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*) oder TGF führen.

Klasse II Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und Hormone

Gene für Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und Hormone können zu Onkogenen werden, wenn sie durch Mutationen so verändert wurden, daß sie für Rezeptoren codieren, deren Proteinkinase-Aktivität auch ohne Bindung des entsprechenden Liganden aktiviert ist (*erbA*, *Avian erythroblastosis*).

Klasse III Proteine für die intrazelluläre Signaltransduktion

Die Mehrzahl der Onkogene gehört der Gruppe der intrazellulären Signalüberträger, den sogenannten *second messengers*, an. Diese Gene codieren für Proteine, die in die Signalübertragung zwischen dem Rezeptor und den jeweiligen zellulären Zielproteinen involviert sind. Veränderte Gene für diese Proteine führen zur Veränderung verschiedener Aktivitäten der Zelle. Solche Onkogene sind beispielsweise die G-Proteine (GTP-bindende Proteine) sowie Thyrosin-spezifische Proteinkinasen wie *abl*, *src* (*Rous sarcoma*), *crk* (*Avian sarcoma*).

Klasse IV nucleäre Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren (TF) sind solche Proteine, die durch Bindung an die DNA der RNA-Polymerase II die sequenzgenaue Bindung an den Promotor vermitteln und damit den Start der Transkription überhaupt erst ermöglichen. Transkriptionsfaktoren haben direkten Einfluß auf die Transkriptionsgeschwindigkeit. Sie binden an bestimmte Bereiche der DNA und können somit die Häufigkeit des Transkriptionsstarts verändern. Als Beispiele hierfür gelten *fos* (FBJ *osteosarcoma*) und *jun* (*Avian sarcoma 17*), die für Untereinheiten des TF AP-1 codieren und als Onkoproteine die Transkription bestimmter wachstumsstimulierender Gene aktivieren oder die Transkription wachstumshemmender Gene inhibieren können.

Klasse V Zellzyklus-Kontrollproteine

Die Gene dieser Gruppe werden auch als Tumorsuppressorgene oder Anti-Onkogene bezeichnet, da sie die Entstehung von Krebs verhindern können. Mutationen in den entsprechenden Genen wirken rezessiv, da sie auch in nur verminderter Menge in der Zelle nicht mehr ausreichend supprimierend wirken können. Die Wachstumskontrolle wird aufgehoben, so daß die Zellen selbst unter ungünstigen Bedingungen wachsen können. Zu der Klasse der Zellzyklus-Kontrollproteine, die verändert zu Onkogenen werden können, gehören z.B. die Cycline, RB (Retinoblastom) (Cobrinik, D. *et al.*, 1992), sowie p53.

Seit etwa 1982 werden die Onkogene bestimmten Chromosomen zugeordnet (Gebhart, E., 1989), und es konnten auf jedem Chromosom Onkogene lokalisiert werden (Abb. 1-7).

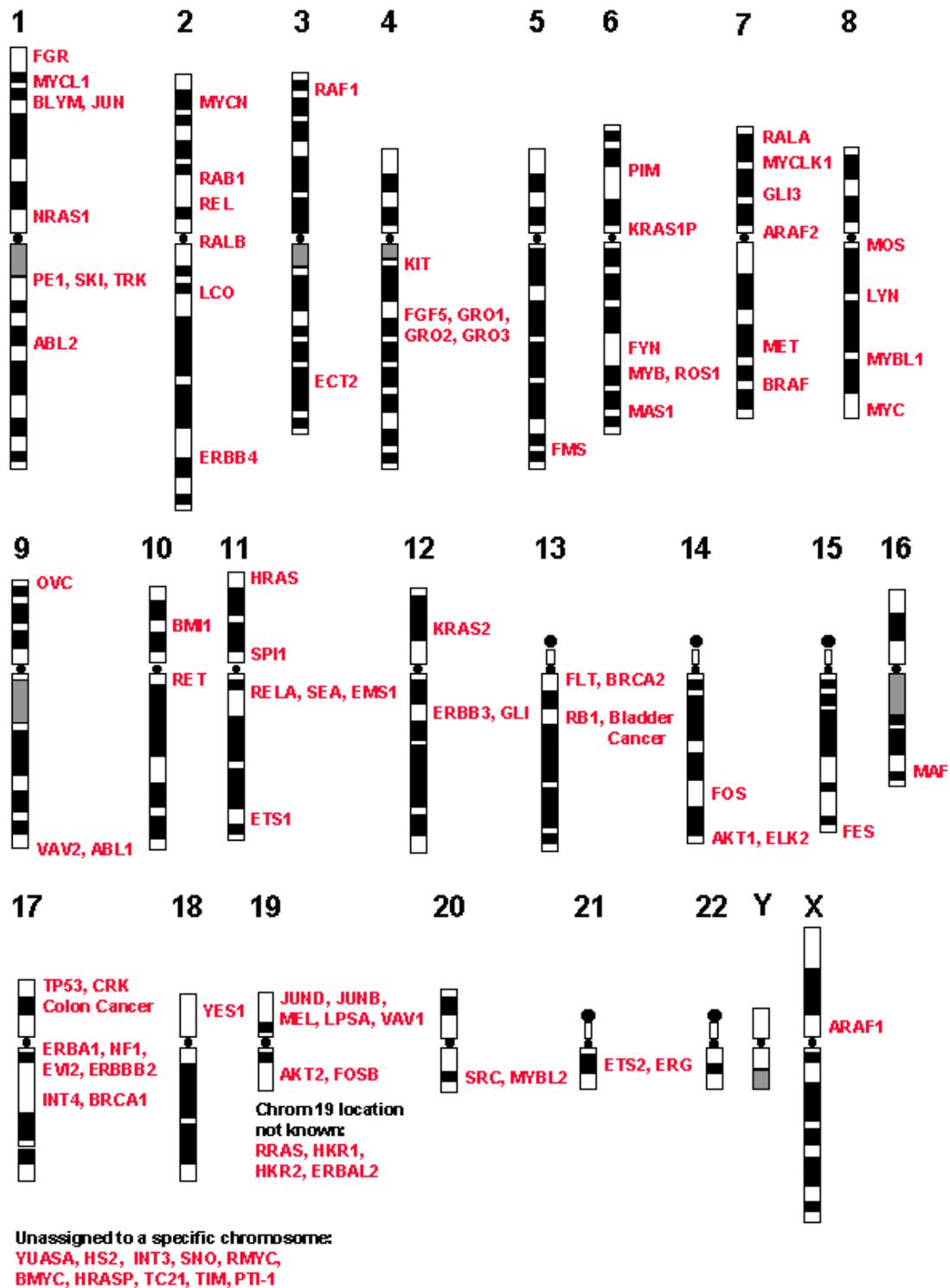


Abb. 1-7 Onkogenlokalisierung auf den humanen Chromosomen

Dargestellt sind die 22 Autosomen sowie die beiden Heterosomen mit einer Auswahl von 98 auf ihnen lokalisierten humanen Onkogenen, Krebsgenen und Tumorsuppressoren.

(Quelle: <http://www.ndsu.nodak.edu/instruct/mcclean/plsc431/cellcycle/cellcycl7.htm>)

1.3 Hämatoblastische Erkrankungen - Leukämien

Leukämien sind maligne Erkrankungen, proliferative Prozesse einer oder mehrerer Zelltypen der Hämatopoese (verschiedener Typen der Population der Leukocyten und ihrer Vorläufer), wobei die maligne Alteration / Entartung und Proliferation auf jeder Stufe der Entwicklung einer Blutzelle mit oder ohne Ausbreitung im Blut stattfinden kann. Ein proliferatives Ereignis auf der Stufe der unreifen Zelle verursacht eine akute Leukämie, wohingegen es auf der Stufe der reifen Zelle zur Ausbildung einer chronischen Leukämie kommen kann.

Die Ursachen für die Entwicklung von Leukämien sind bis heute noch nicht vollständig geklärt, jedoch sind es komplexe Interaktionen verschiedener genetischer und exogener Faktoren. Bekannte Risikofaktoren für die Entwicklung leukämischer Erkrankungen sind z.B. ionisierende Strahlung (Röntgenstrahlen), chemische Leukämogene (Rangan, U. *et al.*, 1997), einige Viren (davon insbesondere RNA-Viren wie das HTLV) oder aber auch genetische / erbliche Faktoren wie chromosomale Veränderungen (Philadelphia-Chromosom $t(9;22)(q34;q11)$ und andere Translokationen ($t(12;21)$ mit daraus resultierender TEL/AML1-Fusion, (Rubnitz, J. E. *et al.*, 1999(b)); Onkogene / Proto-Onkogene; Down-Syndrom) (Pui, C. H. *et al.*, 1999(b)).

Die malignen Zellen teilen sich und wachsen völlig unkontrolliert, sie reifen nicht vollständig aus und können so die für die entsprechenden gesunden Zellen typische und spezifische Funktion nicht aufrechterhalten. Aufgrund der unkontrollierten, uninhibitierten Reproduktion können sich die malignen Leukocyten im blutbildenden Knochenmark wie auch in anderen Organe ausbreiten. Von dort aus können sie ins Blut übertreten.

Leukämien kommen mit einer Häufigkeit von etwa 5% aller Krebserkrankungen vor und zählen damit zu den eher selteneren Krebserkrankungen in der westlichen Welt. In Deutschland und anderen Industrieländern erkranken jährlich etwa 8 - 11 von 100.000 Einwohnern an verschiedenen Arten der Leukämien, wobei Männer häufiger als Frauen betroffen sind (Pui, C. H. *et al.*, 1999(a)). Im Kindesalter liegt die relative Häufigkeit, an Leukämien zu erkranken, wesentlich höher als bei Erwachsenen. Bei Kindern ist die Leukämie mit 45% die häufigste bösartige Erkrankung (Pschyrembel, W., 2002). Ohne eine intensive Therapie würde diese Erkrankung innerhalb kurzer Zeit tödlich enden. Die Anzahl der Leukämieerkrankungen ist in den letzten 2 Jahrzehnten leicht rückläufig. Der Verlauf sowie ein Überblick über die Häufigkeit der Leukämien in Abhängigkeit vom Alter ist in der Abb. 1-8 dargestellt.

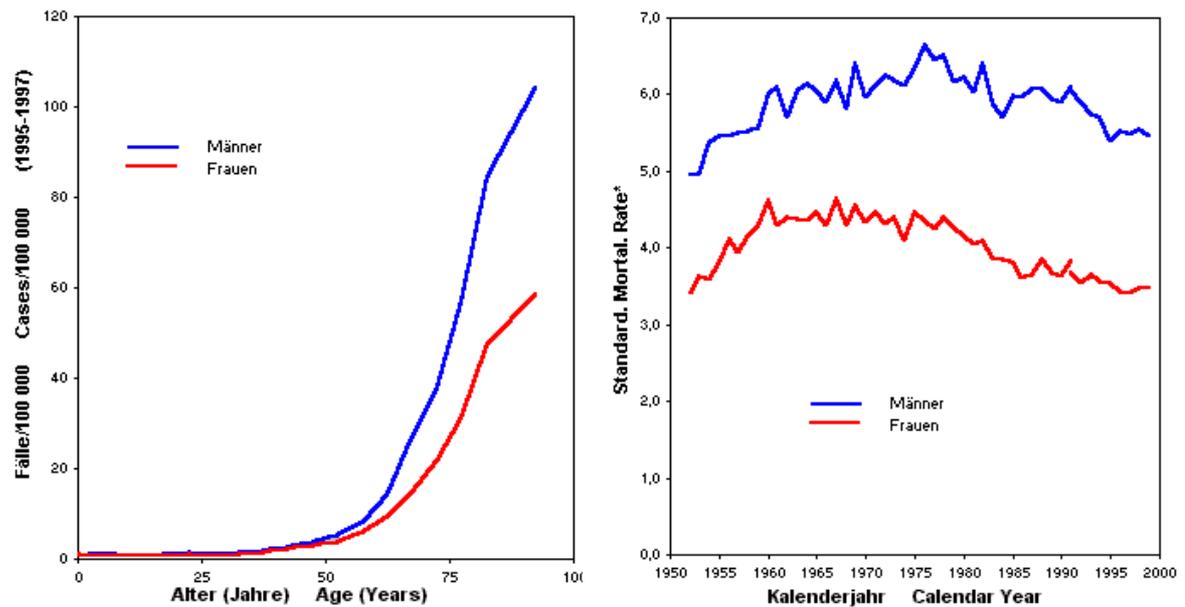


Abb. 1-8 Häufigkeit der Leukämien nach Alter und Jahren

Überblick über das Auftreten von Leukämieerkrankungen bei Männern und Frauen nach dem Alter und über die letzten Jahre betrachtet. Mit zunehmendem Lebensalter steigt auch das Risiko, an einer Leukämie zu erkranken, wobei ein höheres Risiko in der ersten Dekade besteht. Betrachtet über die letzten Jahrzehnte ist die Häufigkeit leicht rückläufig (nach Nikolaus Becker und Evelin Deeg, Abteilung Klinische Epidemiologie, DKFZ Heidelberg).

1.3.1 Einteilung der Leukämien

Die Hauptformen der Leukämie sind eingeteilt in vier Kategorien, die myeloische und die lymphatische (lymphoblastische) Leukämie, wobei jede dieser beiden Formen akut oder chronisch auftreten kann. Ein proliferatives Ereignis auf der Stufe der unreifen Zelle (*immature cell*) resultiert in der akuten Leukämie, wohingegen auf der Stufe der reifen Zelle (*mature cell*) in der chronischen Leukämie.

Akute Leukämien sind schnell fortschreitende Erkrankungen, die meist unreife, primitive Zellen betreffen, die noch nicht vollständig entwickelt oder differenziert sind. Diese unreifen Zellen können so nicht mehr ihrer normalen Funktion nachkommen. Chronische Leukämien hingegen schreiten langsam fort und die Zellen sind in der Regel schon differenzierter, so daß sie wenigstens einige ihrer Funktionen noch ausführen können.

1.3.1.1 Einteilungskriterien der Leukämie

Es gibt verschiedene Kriterien, anhand derer die unterschiedlichen Formen der Leukämie eingeteilt werden können. Die Einteilung kann erfolgen anhand des klinischen Verlaufs (akut und chronisch), anhand morphologischer, zytochemischer und immunchemischer Kriterien (myeloisch und lymphatisch, differenziert wird dann aufgrund der Ähnlichkeit der malignen Zellen zu gesunden Zellen) oder anhand des Differenzierungsgrades (reifzellig und unreifzellig). Auch kann man differenzieren mittels der Leukocytenzahl im Blutbild (sub- oder aleukämisch und leukämisch). Sub- und aleukämisch bezeichnen eine verringerte, leukämisch eine erhöhte Anzahl weißer Blutkörperchen im Blut.

1.3.2 Symptome der Leukämie

Die Symptome der Leukämieerkrankungen sind sehr different. Patienten zeigen gerade in frühen Stadien keine oder oft sehr unspezifische Symptome, wie Müdigkeit und Erschöpfung, Blässe, Gewichtsverlust. Häufig treten als Folge einer Insuffizienz der Hämatopoese und funktioneller Ausfälle bestimmter Blutzellen Hämostasen (Blutungsneigung) mit Nasenbluten und anderen Blutungen auf. Es kann zur Insuffizienz des Sauerstofftransports (Anämie) und der Abwehrfunktion (Infektneigung, wiederholte Infektionen der Haut, Lungen, Nieren) kommen, nicht selten kann Fieber mit oder ohne Infektion auftreten. Im Blutbild läßt sich eine anomale, zumeist erhöhte Leukocytenzahl als Befund feststellen. Oft können auch das Knochenmark und auch alle anderen Organe infiltriert sein. Sonographisch können Hepato- und/oder Splenomegalien (evtl. auch Nierenvergrößerung) festgestellt werden.

1.3.3 Therapie der Leukämie

Für eine optimale Behandlungsstrategie ist das Feststellen der Ausbreitung und der Bösartigkeit der Erkrankung sowie die genaue Diagnostik des Typs der Leukämie sehr wichtig. Anhand dieser Tumorinformationen kann man die richtigen Behandlungsarten wählen. Die Therapie der Leukämie stellt eine komplexe Behandlung dar, die eine Kombination aus mehreren zur Verfügung stehenden Therapieformen ist. Zu Beginn steht die Chemotherapie (chemische / cytostatische Behandlung) sowie die operative Tumorentfernung bei soliden Tumoren. Die Radiotherapie (Bestrahlung) hat besondere Bedeutung bei tumorbildenden Leukämieformen, die Tumoren z.B.

im ZNS oder der Milz bilden. Oft sind die verschiedenen Therapieformen auch begleitet von einer intrathekalen Chemotherapie zur ZNS-Prophylaxe.

Die Hormon- bzw. Immuntherapie setzt sich zum Ziel, durch spezifische und unspezifische Stimulation des Organismus die Abwehr gegen die leukämischen Zellen zu steigern. Sie wird besonders während der Remission zur Remissionserhaltung eingesetzt.

Die Knochenmarktransplantation (KMT) sowie die Stammzell-Transplantation stellen eine Kombination aus cytostatischen und supportiven Therapieformen dar. Sie besteht in der Übertragung von Spenderknochenmark bzw. der Neubesiedlung des Empfängermarkes mit hämatopoetischen Stammzellen eines Spenders und der zuvor erfolgten cytostatischen Chemotherapie und Bestrahlung in (sub)lethaler Dosis, bei der alle eigenen Immunzellen abgetötet werden. Man unterscheidet dabei die auto-KMT und die allo-KMT, wobei hier eine Abwehrreaktion (*graft-versus-leukemia*) teilweise erwünscht ist.

In einigen Fällen kommt auch schon eine Gentherapie zum Einsatz. Dabei werden manipulierte Sequenzen durch Viren in den Patienten transferiert.

1.3.3.1 Behandlungsschema einer Leukämieerkrankung

Die Leukämietherapie setzt sich aus 3 - 4 Phasen der Behandlung zusammen. Sie beginnt mit der Remissionsinduktion, die eine systemische Kombinations-Chemotherapie beinhaltet. Die zweite Stufe ist die ZNS-Prophylaxe. Um einen Befall des Gehirns zu verhindern, wird prophylaktisch eine intrathekale und/oder systemische Hochdosis-Chemotherapie eingesetzt, in einigen Fällen auch eine craniale Bestrahlung. Als dritte Stufe schließt sich die Konsolidierungs- und Intensivierungstherapie an, bei der eine Hochdosis-Chemotherapie eingesetzt wird, um auch die restlichen, noch verbliebenen Leukämiezellen abzutöten. In der vierten Stufe, der Remissionsverlängerung bzw. Remissionserhaltung, wird z.B. eine Niedrig-Dosis-Chemotherapie über mehrere Jahre gegeben, um die Remission aufrechtzuerhalten. Die meisten antileukämischen Medikamente interagieren mit dem genetischen Material der Zelle, der DNA. Einen Überblick über die vielfältigen Wirkprinzipien der in der Leukämietherapie eingesetzten Medikamente gibt die Abb. 1-9. Die Dauer der Behandlung umfaßt im Allgemeinen 1.5 - 3 Jahre (McCauley, D. L., 1992).

Medikamente in der Leukämitherapie

- ∞ **Antitumor-Antibiotika**
interagieren direkt mit der DNA im Zellkern der Zellen, stören so das Überleben
Daunorubicin, Doxorubicin, Mitoxantron
- ∞ **DNA-Reparatur Enzym-Inhibitoren**
sind aktiv an Proteinen der DNA-Reparatur, DNA wird anfälliger gegenüber Beschädigung
Etoposid
- ∞ **DNA-Synthese-Inhibitoren**
verändern die DNA chemisch und verhindern somit das Zellwachstum
Carboplatin
- ∞ **DNA zerstörende Agenzien**
interagieren mit, zerstören und schädigen DNA
Cyclophosphamid
- ∞ **Antimetabolite**
Chemikalien, die den natürlichen Zellbausteinen der DNA und RNA sehr ähnlich sind,
werden anstelle der natürlichen verwendet und blocken die Fähigkeit der Zelle, RNA oder
DNA zu bilden, verhindern so das Zellwachstum
Ara-C, Methotrexat
- ∞ **Inhibitoren der Zellteilung**
interferieren mit Strukturen in der Zelle, die für die Zellteilung verantwortlich sind und können
so die Zellteilungsrate der Leukämiezellen mindern
Vincristine
- ∞ **Enzyme, die die Zellen am Überleben hindern**
L-Asparaginase
- ∞ **Synthetische Hormone**
vernichten Leukämiezellen
Prednison, Prednisolon, Dexamethason

Abb. 1-9 Medikamente der Leukämitherapie

Zur Therapie der leukämischen Erkrankungen stehen Medikamente mit verschiedenen Wirkprinzipien und Angriffsorten zu Verfügung. Bearbeitet nach <http://www.leukemia-lymphoma.org>.

1.3.4 Häufigkeiten der Leukämien und prognostische Marker

Leukämien können in jedem Alter auftreten, das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr. Eine Häufung der Erkrankungen ist jedoch im Kindesalter und bei Erwachsenen älter als 40 Jahre zu beobachten. Männer erkranken etwas häufiger als Frauen an Leukämien (Pui, C. H. *et al.*, 1999(a)).

Mit etwa 10 - 20% ist die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) die seltenere Form der akuten Leukämien. Die ALL ist die häufigste Form der Leukämien im Kindesalter, jedoch umfaßt

sie nur etwa 20% der akuten Leukämien bei Erwachsenen. Mit 80% der akuten Leukämien im Erwachsenenalter treten dagegen die akuten myeloischen Leukämien (AML) weitaus häufiger auf. Die häufigste Form der Leukämien im Erwachsenenalter ist die AML, gefolgt von der CLL und der CML. Die ALL ist eine seltenere Form der Leukämie im Erwachsenenalter.

Leukämien im Kindesalter treten meist als akute Leukämien auf. Von den akuten Leukämien sind mit 80% die lymphatischen Leukämien (ALL) am weitesten verbreitet. Die ALL ist damit die häufigste bösartige Erkrankung im Kindesalter überhaupt. Sie kommt überwiegend bei Kindern in der ersten Dekade und Jugendlichen vor und weist ein Häufigkeitsmaximum etwa vom 2. bis 5. Lebensjahr auf.

20% sind Leukämien mit einem T-Zell-Ursprung, 25% haben ihren Ursprung in einer B-Zelle, 5% entstehen aus reiferen B-Zellen, genannt Burkitt-Lymphom. 70 - 90% der Erwachsenen erreichen eine komplette Remission, 25 - 50% haben eine lange krankheitsfreie Überlebenszeit (Larson, R. A. *et al.*, 1995; Larson, R. A. *et al.*, 1998).

Genauso ist auch die Prognose sehr unterschiedlich und von vielen Faktoren abhängig, wobei die lymphoblastischen Leukämien generell eine bessere 5-Jahres-Überlebensrate aufweisen. Die Leukämieform mit der besten Prognose ist die ALL, gefolgt von der CLL, der AML sowie der CML mit schlechteren Prognosen. Bei Kindern liegen die Überlebensraten im Allgemeinen höher. So zählen beispielsweise das Alter des Patienten und die Leukocytenzahl zum Zeitpunkt der Diagnosestellung zu Prediktoren für die Prognose. Andere prognostische Marker sind die Art der Leukämie sowie das Morphologiestadium (L2, L3 FAB), erhöhte Hämoglobinlevel, eine niedrige Thrombocyten-Zahl, die Präsenz einer Infektion oder Hämorrhagie bei der Diagnosestellung, die Präsenz einer ZNS-Leukämie (Beteiligung des Nervensystems), die „schwarze“ Rasse, das männliche Geschlecht (Pui, C. H. *et al.*, 1999(a)), Lymphadenopathie, Hepato- und Splenomegalie sowie bestimmte HLA-Typen. So haben Patienten mit einer Leukocytenzahl von mehr als 30.000/ μ l eine signifikant kürzere Dauer der Remission verglichen mit Patienten mit einer niedrigeren Leukocytenzahl (Hoelzer, D. *et al.*, 1988; Boucheix, C. *et al.*, 1994; Larson, R. A. *et al.*, 1995). Auch das Vorhandensein bestimmter Translokationen kann die Prognose günstig (Philadelphia-Chromosom, *bcr/abl*) oder negativ (TEL/AML) beeinflussen (Gebhart, E., 1989; Takahashi, Y. *et al.*, 1998; Rubnitz, J. E. *et al.*, 1999(b); Rubnitz, J. E. *et al.*, 1999(c)).

Eine komplette Remission nach intensiver Remissionstherapie durch post-Remissions-Konsolidierung erreichen 75 - 90% der Patienten, nach drei Jahren jedoch liegen die Überlebensraten nur noch bei 25 - 50% (Ong, S. T. *et al.*, 1995). Weniger als 20% der Kinder, die bei der Diagnosestellung jünger als 1 Jahr sind, sind noch in Remission 6 Jahre nach der Diagnosestellung, während 60% der Patienten zwischen 1 und 10 Jahren in fortdauernder kompletter Remission verbleiben.

Da der Begriff der Leukämie viele verschiedene Formen umfaßt und die in dieser Arbeit verwendeten Zell-Linien jeweils in akuten Leukämien involviert sind, soll daher im Folgenden etwas genauer nur auf diesen Subtyp eingegangen werden.

1.3.5 Akute lymphoblastische Leukämien (ALL)

Akute Leukämien sind schnell fortschreitende klonale Krankheiten, die aus der Akkumulation unreifer, funktionsloser Zellen im Blut und Knochenmark resultieren und unbehandelt innerhalb einiger Wochen bis weniger Monate tödlich verlaufen. Am Anfang einer solchen Erkrankung steht meist die Entartung einer Vorläuferzelle, die nicht mehr vollständig ausreifen kann und sich unkontrolliert vermehrt.

Klinisch ist die ALL gekennzeichnet durch Infektanfälligkeit (aufgrund von Granulocytopenie und Granulocytopathie), hämorrhagische Diathese (Neigung zu verschiedenen Blutungen aufgrund von Thrombopenie, selten Koagulopathie bzw. Hyperfibrinolyse), Anämiesymptome und unterschiedlich ausgeprägten Organbefall (Pschyrembel, W., 2002). Die periphere Gesamt-Leukocytenzahl ist in 50% der Fälle erhöht, in 25% normal und in 25% verringert.

Aufgrund unterschiedlicher therapeutischer Ansprechbarkeit und dadurch verschiedener Prognose ist es wichtig, mit zytochemischen Methoden (Färbungen) und durch Immunophänotypisierung eine weitergehende Untergliederung der Leukämie vorzunehmen: z.B. T-Zelle oder B-Zelle, T-Helferzelle oder Precursor B-Zelle.

Die akuten lymphoblastischen Leukämien sind keine einheitliche homogene Krankheit, auch keine Krankheit für sich. Häufig sind sie gekoppelt mit anderen Erkrankungen, die auf Veränderungen des Blutbildes und der damit verbundenen Funktionseinschränkung der einzelnen Zellarten zurückzuführen sind.

Verschiedene Subgruppen weisen unterschiedliche Prognosen auf. Dabei sind viele der initialen Charakteristika (wie oben erwähnt) bei der Diagnosestellung von prognostischer Bedeutung (Takahashi, Y. *et al.*, 1998; Rubnitz, J. E. and Pui, C. H., 1999(a)). Einige Gruppen sprechen sehr gut auf Standard-Therapien an und haben somit eine sehr gute Prognose hinsichtlich einer Heilung oder einer längeren Überlebenszeit, andere hingegen nur eine sehr schlechte (Bleyer, W. A., 1983). Daher ist es sehr wichtig, eine genaue Diagnose mit einer ausreichenden Anzahl an Parametern anhand multipler prognostischer Marker zu stellen.

1.3.6 Warum T-Lymphocyten und Natural Killer-Zellen?

Die Leukocyten, und dabei besonders die Lymphocyten, spielen eine zentrale Rolle in der Fremd-Erkennung und -Abwehr des humanen Immunsystems. T-, Natural Killer- sowie auch die B-Lymphocyten gehören der Gruppe der lymphoiden Zellreihe des hämatopoetischen Systems an, was bedeutet, daß sie einen gemeinsamen Vorläufer in ihrer Entwicklung haben. Sie differenzieren sich aus einer multipotenten lymphoiden Stammzelle. Zur Einordnung der Zellen in das hämatopoetische System sollen an dieser Stelle einige wesentliche Aspekte der Hämatopoese dargestellt werden.

1.3.6.1 Hämatopoese

Alle Zellen des blutbildenden Systems eines Organismus entwickeln sich aus einer einzigen undifferenzierten Vorläuferzelle, der sogenannten pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle. Diese besitzt die Fähigkeit, sich unter Einfluß der verschiedenen Wachstums- und Differenzierungsfaktoren in alle Zellen, die an der Immunantwort beteiligt sind, zu entwickeln. Bei dieser Zelldifferenzierung spielen linienspezifische Zytokine eine wesentliche Rolle. Solche Zytokine sind beispielsweise EPO (Erythropoetin), M-CSF (Macrophagen Kolonie stimulierender Faktor) und G-CSF (Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor). Folgende vier Hauptzell-Linien können von der hämatopoetischen Stammzelle gebildet werden: die Erythrocyten, die Megakaryocyten (Blutplättchen), Zellen der myeloischen Reihe (Granulozyten und Monocyten / Macrophagen) sowie die Zellen der lymphoiden Reihe (B-, T-, NK-Lymphocyten). Die Abb. 1-10 gibt eine Übersicht über die Hämatopoese.

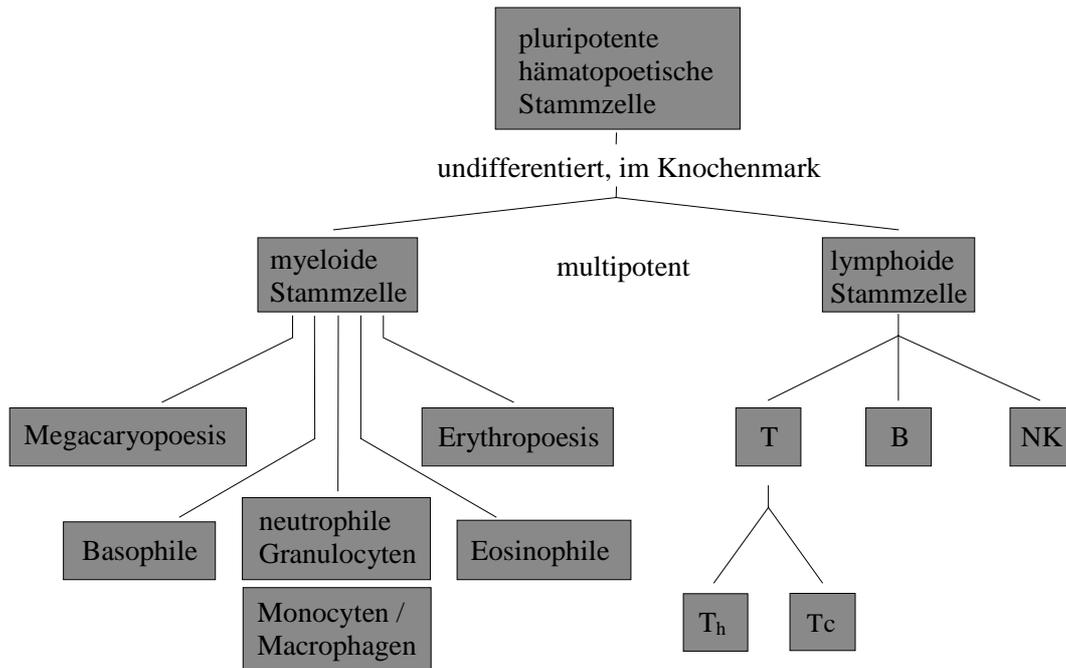


Abb. 1-10 Hämatopoese der Zellen des blutbildenden Systems

Die pluripotente Stammzelle hat die Fähigkeit, sich jeweils in die multipotente lymphoide oder myeloide Stammzelle zu differenzieren, die selbst wiederum in alle spezialisierten Zelltypen des Blutsystems differenzieren können.

1.3.6.2 Molekulare Charakterisierung der T- und NK-Lymphocyten

T-Lymphocyten und Natural Killer-Zellen sind in die Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene wie Viren (Bakterien, Protozoen, Pilze in geringerem Ausmaß) involviert. Sie bilden zusammen mit weiteren immunkompetenten Zellen des hämatopoetischen Systems, wie den B-Lymphocyten, den Macrophagen oder den Granulocyten ein Team, das gemeinsam an der Abwehr von körperfremden Antigenen arbeitet. Beide haben jedoch recht unterschiedliche Aufgaben und Funktionen und somit jeweils ihre ganz eigenen Strategien der Erkennung und Abwehr entwickelt. Der Abwehrmechanismus gegen ein Pathogen ist am Beispiel der B- bzw. T-Zellen in der Abb. 1-11 dargestellt.

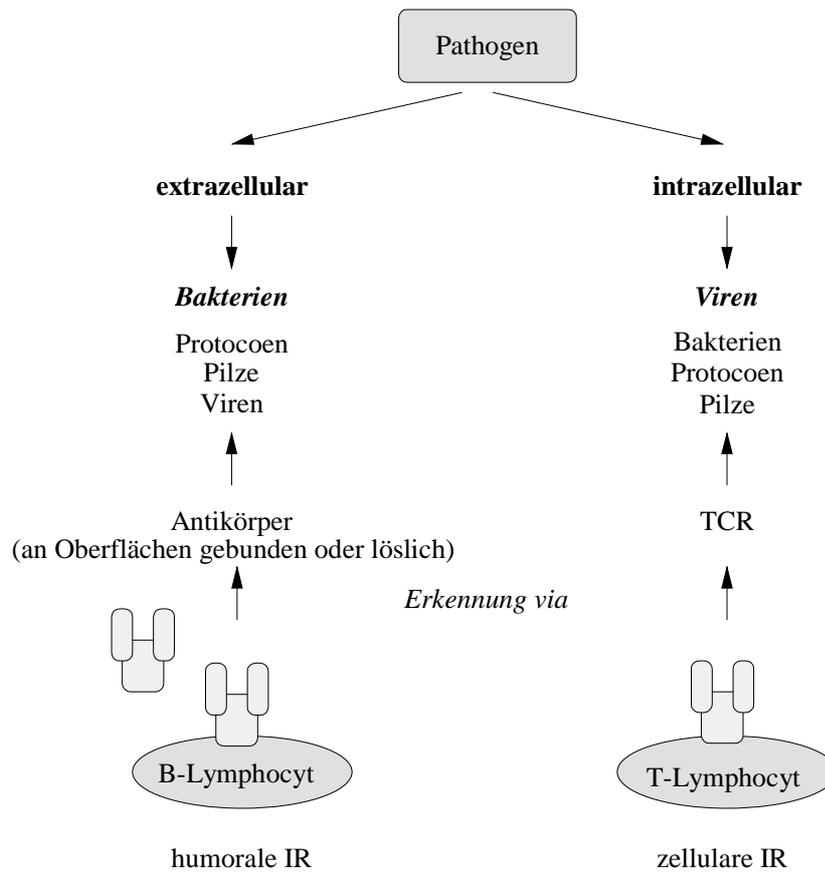


Abb. 1-11 Abwehrmechanismen der B- und T-Lymphocyten

Mechanismen der Abwehr von extra- und intrazellulären Pathogenen durch B- und T-Zellen. Die B-Zellen sind für die Erkennung und Abwehr von überwiegend extrazellulären Pathogenen, wie Bakterien verantwortlich. Sie produzieren gegen diese Pathogene gerichtete Antikörper, die entweder auf der Zelloberfläche gebunden oder löslich vorkommen können. Diese Abwehr wird als humorale Immunantwort bezeichnet. T-Zellen hingegen exprimieren stets einen membranständigen Rezeptor (TCR), der vorwiegend intrazelluläre Pathogene (Viren) erkennt. An der Erkennung sind auch noch weitere Co-Rezeptoren (CD4 oder CD8) beteiligt. NK-Zellen erkennen ebenfalls wie die T-Zellen über membranständige Rezeptoren intrazelluläre Antigene (zelluläre Immunreaktion). IR: Immunreaktion

Die T-Lymphocyten, etwa 70 - 75% aller Lymphocyten und 20 - 30% der Leukocyten, sind eine Gruppe verschiedener funktioneller Subpopulationen, die eine zentrale Rolle bei der antigenspezifischen Immunantwort spielen. Sie erkennen spezifisch Peptidantigen, das nach Antigen-Prozessing auf der Zelloberfläche Antigen-präsentierender Zellen (APC) dargeboten wird. Dies geschieht mit Hilfe ihres membranständigen T-Zell-Rezeptors (TCR) und weiterer assoziierter Membranproteine, wie dem auf ihrer Zelloberfläche exprimierten Co-Rezeptor CD3, der in die Signalübertragung nach Antigenkontakt involviert ist (Abb. 1-12).

T-Zellen werden weiterhin unterteilt in T-Helferzellen (T_h) und cytotoxische T-Zellen (T_c). Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Expression weiterer Oberflächenmoleküle sowie ihrer spezifischen Funktion bei einer Immunreaktion. Zu den wichtigsten Oberflächenstrukturen für die Einteilung in die Subklassen zählen CD4 und CD8.

Cytotoxische T-Lymphocyten CTL ($CD8^+$) erkennen Antigen, das auf MHC Klasse I-Molekülen der APC dargeboten wird. Dabei handelt es sich zumeist um intrazelluläre Pathogene und Microorganismen (endogenes Antigen). Es wird eine Reaktion aktiviert, die gegen die APC gerichtet ist und durch die Freisetzung von Perforinen und TNF in der Lyse der APC endet. Dahingegen werden $CD4^+$ T-Helferzellen von extrazellulärem Antigen, das auf MHC Klasse II-Molekülen dargeboten wird, aktiviert. Dadurch kommt es zu einer Induktion der humoralen Abwehr als auch der zellvermittelten Antwort. Dies geschieht über Zytokinausschüttung, wodurch eine Aktivierung der Antikörper bildenden B-Lymphocyten ausgelöst, das Antigen gebunden und eliminiert wird. Weiterhin kommt es zur Macrophagenaktivierung und damit zur Phagocytose des Antigens. T_c und T_{h1} (cytotoxische T-Zellen und T-Helfer1-Zellen) nehmen an der zellularen Immunreaktion teil, wohingegen die T_{h2} (T-Helfer2-Zellen) in die humorale Immunantwort involviert sind.

Die Entwicklung und Reifung der unterschiedlichen T-Lymphocyten erfolgt über verschiedene Differenzierungsstadien im Knochenmark und im Thymus, dem Ort der immunologischen Prägung. Aus den unreifen Vorläufern der T-Zellen DN (*double negative*, $CD4^-/CD8^-$), die weder CD4 noch CD8 exprimieren, entstehen im Cortex des Thymus die DP T-Zellen (*double positive*, $CD4^+/CD8^+$), die beide Marker, sowohl CD4 als auch CD8, auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Diese wandern in die Medulla und beginnen dort mit der Expression des TCR. Weiterhin müssen sie sich in der Medulla des Thymus einer positiven und negativen Selektion unterziehen und reifen nun zu den SP (*single positive*) Zellen heran, die entweder den Phänotyp $CD4^+/CD8^-$ (T_h) oder $CD4^-/CD8^+$ (T_c) aufweisen.

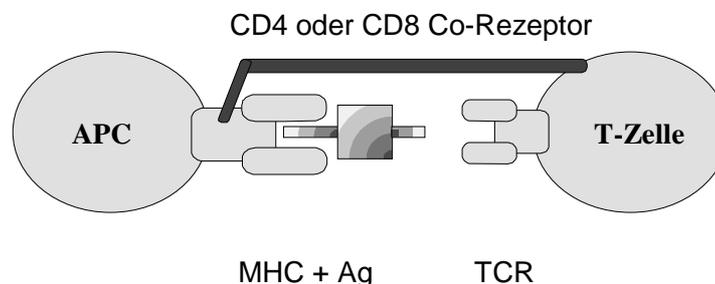


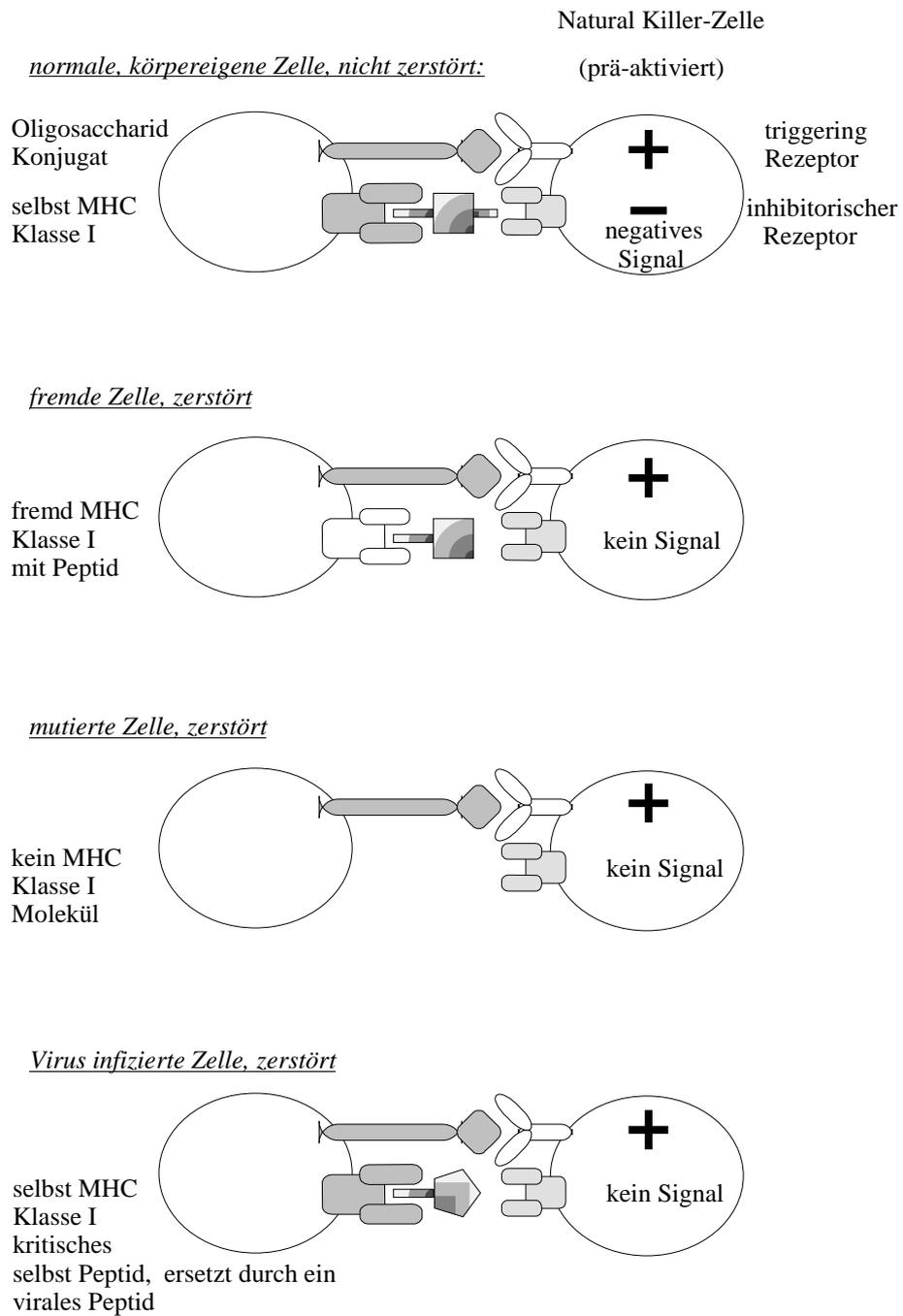
Abb. 1-12 Mechanismus der Antigen-Erkennung bei T-Zellen

Auf dem MHC dargebotenes Antigen wird durch einen Komplex aus dem T-Zell-Rezeptor, dem Co-Rezeptor sowie weiteren assoziierten Komponenten erkannt.

APC: Antigen-präsentierende Zelle, Ag: Antigen, TCR: T-Zell-Rezeptor

Die NK-Zellen sind eine Zellpopulation, die mit 10 - 15% der Lymphocyten im Blut vorkommen und an der unspezifischen Immunabwehr teilnehmen. Sie sind immunologische Zellen, die sich weder den B-Zellen noch den T-Zellen zuordnen lassen, ähneln aber aufgrund ihrer Expression des CD2-Moleküls und ihrer cytotoxischen Aktivität eher den T-Zellen (CTL). Sie exprimieren jedoch kein CD3 und weisen auch keinen vollständig rearrangierten TCR auf. NK-Zellen sind involviert in die angeborene (*innate*), natürliche Immunantwort, die nicht spezifisch durch ein bestimmtes Antigen induziert wird.

Die NK-Zellen weisen eine duale cytolytische Fähigkeit auf. Ihnen stehen so zwei verschiedenartige Reaktionsweisen zur Bekämpfung von „Fremd“ zur Verfügung. Einerseits besitzen sie die Fähigkeit der Erkennung und Abtötung neoplastischer Zellen (Tumoren) und einiger virusinfizierter Zielzellen (Antigen-unspezifische NK-Aktivität), was antikörperunabhängig, ohne MHC-Restriktion und in Abwesenheit eines Antigens erfolgt. Auch ist im Gegensatz zu den T-Zellen keine vorherige Sensibilisierung mit dem Antigen notwendig (*natural killing*). Andererseits weisen die NK-Zellen eine antikörperabhängige zelluläre Cytotoxizität auf (ADCC, *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*), der Lyse der mit Antikörpern behafteten Targetzellen, die durch den Rezeptor für IgG vermittelt wird). Sie sind beteiligt an frühen angeborenen Immunantworten und Antigen-spezifischen humoralen Reaktionen. Die Erkennung von „Fremd“ erfolgt bei diesen Zellen aufgrund der Abwesenheit von selbst-MHC-Molekülen und Proteinen (Kärre, K., 1992; Kärre, K., 1995). Die Abb. 1-13 soll einen Überblick über diesen Mechanismus der „Fremd“-Erkennung geben.



(nach Kärre, K., 1995)

Abb. 1-13 Mechanismus der Antigen-Erkennung bei Natural Killer-Zellen

Natural Killer-Zellen erkennen „Fremd“ nicht direkt, wie z.B. die T-Zellen, sondern anhand des Fehlens von „Selbst“ (Kärre, K., 1995)). Der Verlust der MHC-Moleküle Klasse I scheint ausreichend zu sein, die NK-Aktivität zu induzieren. Auch die Abwehr allogener Antigene scheint eher auf der Abwesenheit des „Selbst“ zu beruhen als auf dem Erkennen des Vorhandenseins des „Fremd“.

Die in dieser Arbeit zu untersuchenden Zell-Linien stammen von Patienten, die an verschiedenen akuten Formen der Leukämien erkrankten. Dabei handelt es sich zum einen um T-Lymphocyten und zum anderen um NK-Zellen. Die Zell-Linie Jurkat stammt von einem männlichen Patienten mit akuter T-Zell-Leukämie (ALL), die NKL-Zell-Linie von einem männlichen Patienten mit akuter NK-Zell-Leukämie (NK-LGL). Beide sind Zellen des Immunsystems, humane Lymphocyten, die involviert sind in die zelluläre Immunabwehr. Beide Zell-Typen, T- und NK-Lymphocyten, weisen Ähnlichkeiten in der Morphologie und der allgemeinen Funktionen in der Immunresponse auf, haben ontogenetisch eine ähnliche Entwicklung durchlaufen und können beide an jeweils einer malignen Erkrankung beteiligt sein. Trotz ihrer morphologischen Ähnlichkeit sind beide Lymphocytentypen aber hinsichtlich ihrer spezifischen Funktion in der Immunresponse und Proteinproduktion gut unterscheidbar.

Daraus folgt, daß zahlreiche Gene beiden Zelltypen gemeinsam sind, um die spezifischen Aufgaben der Immunresponse realisieren zu können oder eventuell auch solche Gene, die an der Entstehung der malignen Entartung beteiligt sind. Natürlich muß es aber auch Unterschiede in der Expression bestimmter Gene geben, die die Diversität der beiden Zelltypen ausmachen. Welche Gene es sind, die die Spezifität der beiden Zell-Linien ausmachen, welche spezifisch in T-Zellen zur Expression kommen und welche für NK-Zellen spezifisch sind, soll mit Hilfe dieser beiden etablierten Zell-Linien und der Methode des Oligonucleotid Fingerprintings untersucht werden. Eine weitere interessante Fragestellung, bei deren Klärung Analysen dieser Zellen beitragen können, ist die der Beteiligung bestimmter Gene an Immunreaktionen oder der Carcinogenese.

1.4 Array-Techniken in der Immunologie

Bisherige Techniken in der Immunologie, besonders der Diagnostik von Leukämien und der genaueren Identifizierung, verlassen sich auf Methoden, mit denen man größtenteils die Expression nur einiger weniger Gene oder Marker auf einmal untersuchen kann. Leukämien und Lymphome wurden anhand einer Kombination morphologischer, immunphänotypischer und cytochemischer Marker und der Merkmale des Karyotyps diagnostiziert. So wurden Leukämien bisher meist anhand von somatischen Mutationen, einschließlich Translokationen, Deletionen sowie Insertionen charakterisiert (Gilliland, D. G., 1998).

Diesen Methoden sind jedoch relativ enge Grenzen gesetzt, und sie können dem immer größer werdendem Informationsbedarf nicht mehr gerecht werden. Ein extensives Immunphänotypisieren wäre ohne größeren Aufwand nicht durchführbar. So konnte bisher meist nur eine geringe Anzahl von 3 Markern per Ansatz -zumeist von den Zellen auf ihrer Zelloberfläche präsentierte CD-Antigene- analysiert und zur Phänotypisierung genutzt werden, z.B. in der Flow-Cytometrie (Gray, S. G., 2001). Große Fortschritte liegen in der Diagnose dieser Erkrankungen, die auf chromosomaler sowie molekularbiologischer / genetischer Ebene immer detaillierter gestellt werden können, worauf später in diesem Kapitel eingegangen werden soll.

Trotz des enormen Forschungsaufwandes in den letzten Dekaden gibt es noch immer Erkrankungen, darunter auch Krebserkrankungen wie Leukämien, für die es keine effektiven Behandlungen gibt (Bubendorf, L., 2001). Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen der Carcinogenese und der Progression der Krebserkrankungen sind die Grundlage der Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Strategien.

Aber auch in der Immunologie haben mittlerweile Techniken Einzug gehalten, die es ermöglichen, Einblick in das gesamte Genexpressionsmuster eines Gewebes zu erhalten und somit gleichzeitig die Expression einer großen Anzahl von Genen zu charakterisieren. Die Komplexität der Daten sorgt für die Möglichkeit einer viel detaillierteren phänotypischen Analyse, benötigt allerdings auch ausgeklügelte komplexe bioinformatische Methoden. Die ersten Anwendungen fand das Expressions-Profiling in der Klassifizierung von Krankheiten, dort besonders auf dem Gebiet der Onkologie. Microarray-Techniken können nicht nur genutzt werden zur Untersuchung maligner Erkrankungen, sondern auch für Erkrankungen, für die bisher keine ausreichenden diagnostischen Methoden mit genügend hoher Resolution zur Verfügung stehen (Autoimmunerkrankungen). Mit ihrer Hilfe wird es möglich, neue Einsichten in Signaltransduktions-Pathways und metabolische Abläufe sowie deren Abnormitäten zu erlangen und so neue therapeutische Targets zu finden.

Die Identifizierung der Gene, die Krebserkrankungen verursachen oder an deren Entstehung und Progression maßgeblich beteiligt sind, ist ein zentrales Ziel in der Forschung (DeRisi, J. *et al.*,

1996). Häufig werden in neuerer Zeit Resultate des HUGO-Projektes als Grundlage oder Ausgangspunkt für die weitere Forschung genutzt (Futreal, P. A. *et al.*, 2001). Das *Human Genome Project* hat gerade in der letzten Zeit maßgeblich zum erheblichen Fortschritt in der Konstruktion physikalischer und genetischer Mappen und der Identifikation bestimmter, an Erkrankungen beteiligter humaner Gene sowie in der Entwicklung neuer Technologien, besonders der Chip-Technologie beigetragen. Diese genetischen Profile geben die Möglichkeit zur Definition neuer pathologischer Subklassen, die mit den bisherigen klassischen klinischen Methoden nicht erkennbar sind. Weiterhin wird es möglich sein, neue Marker für die Empfänglichkeit bestimmter Individuen bestimmten Krankheiten gegenüber und neue prognostische Marker zu entdecken oder Methoden zur Vorhersage über die Reaktionen auf bestimmte Medikamente und Behandlungen zu entwickeln (Bertucci, F. *et al.*, 2001).

Da viele Targets für Medikamente (Angriffsorte für Wirkstoffe und Therapien) häufig Komponenten komplexer Pathways sind, ist es von großer Wichtigkeit, diese komplexen Netzwerke und Signalkaskaden mit Bedeutung bei inflammatorischen Vorgängen und der Entstehung von Krebserkrankungen verstehen zu lernen und zu erkennen, was für Konsequenzen Eingriffe in diese Abläufe haben können. cDNA-Microarrays können verwendet werden, die Auswirkungen aufgrund der Aktivierung von Genen anhand der mRNA-Produktion sichtbar zu machen (Zanders, E. D., 2000) oder genauere Vorhersagen über die Toxizität in der klinischen Onkologie (Kanamaru, R., 2000) treffen zu können.

Genomics beinhaltet vor allem die systematische Untersuchung aller Gene eines Organismus und offeriert eine neue Quelle der systematischen Produktivität der pharmazeutischen Industrie. Die Isolation der Mehrheit der humanen Gene führt zur Kreation neuer Medikamente basierend auf humanen Proteinen, Antikörpern, Peptiden und Genen (Haseltine, W. A., 2001).

Die neuen Technologien von Genomics bis hin zu Hochdurchsatz-Biowissenschaften (*high throughput bioscience*), der kombinatorischen Chemie, dem Medikamentendesign und der molekularen Pharmakodynamik sowie den bildgebenden Techniken erhöhen die Geschwindigkeit der Entdeckung neuer Krebsmedikamente (Garrett, M. D. *et al.*, 1999). Diese Daten, die man aus solchen Analysen erhält, sollen zu großem Fortschritt in den Gesundheits- und Biowissenschaften beitragen. Zusätzlich zu einem verbesserten Wissen über die komplexen Interaktionen und Netzwerke gesunder und kranker Gewebe ermöglichen sie eine präzisere genetische Charakterisierung der molekularen Mechanismen, die in die Entstehung von Krankheiten, der Pathogenese, involviert sind.

Microarray-Techniken verschiedenster Art sind heute schon verbreitet. Sie finden Anwendung bei Erkrankungen unterschiedlicher Art, besonders bei malignen Tumorerkrankungen, beispielsweise dem Prostatakrebs (Grouse, L. H. *et al.*, 2001) oder Leukämien. Diese neuen Methoden machen sich Robotertechniken zur Herstellung von Arrays zunutze, die Tausende

verschiedener exprimierter Gene enthalten können. Solche Arrays stellen Tools dar, die die Möglichkeit der Darstellung der Expression Tausender Gene gleichzeitig bieten.

Einige Untersuchungen im großen Maßstab wurden schon durchgeführt und auch schon erfolgreich in verschiedenen Studien eingesetzt. Alle beruhen im Allgemeinen auf Hybridisierungs-experimenten radioaktiv oder fluoreszenzmarkierter Proben wie Oligos (Southern, E. M. *et al.*, 1992; Chee, M. *et al.*, 1996; Lockhart, D. J. *et al.*, 1996; Alizadeh, A. *et al.*, 1999) oder Antikörper (Belov, L. *et al.*, 2001) auf immobilisierte cDNA-Klone, die auf Membranen (Meier-Ewert, S. *et al.*, 1993; Drmanac, R. *et al.*, 1993(b)) oder Glas (Schena, M. *et al.*, 1996; Shalon, D. *et al.*, 1996) angeordnet sind. Zur Anwendung kommen heute schon verschiedenartige Biochip-Technologien einschließlich der Analyse

- 1) der Prädisposition mittels SNP-Analyse (*single nucleotide polymorphism*)
- 2) des globalen Genexpressionspattern mittels cDNA- oder Oligonucleotid-Microarrays
- 3) der Konzentrationen, funktioneller Aktivitäten und Interaktionen von Proteinen mittels Proteom-Biochips
- 4) verschiedener Zelltypen, Gewebe und Krankheitsbilder assoziiert mit molekularen Targets mittels Gewebe-Biochips.

In Zukunft wird es möglich sein, ein individuelles Krebsrisiko anhand eines durch das Macro- oder Microarray-Profil bestimmten Aktivitätslevels von Tausenden von Genen vorherzusagen (Kallioniemi, O. P., 2001; Kallioniemi, O. P. *et al.*, 2001). Das umfangreiche Genexpressionspattern ermöglicht es, das Stadium einer Erkrankung, wie beispielsweise einer Leukämie, zu charakterisieren. Weiterhin können sie einen großen Nutzen beim Screening von Mutationen und Polymorphismen haben (Brugarolas, J. *et al.*, 2001).

Das Genexpressions-Profil macht sich verschiedene Array- und Hybridisierungstechniken zunutze, die alle auf der Anordnung verschiedener biologischer Moleküle, wie der cDNA, Oligonucleotiden oder Antikörpern beruhen und in Form von Micro- oder Macroarrays auf geeigneten Materialien immobilisiert sind. Die so gewonnenen Informationen können genutzt werden, Profile verschiedenster Erkrankungen zu erstellen, aber auch diagnostische und prognostische Marker zu identifizieren (Triche, T. J. *et al.*, 2001).

Ein neuer Ansatz liegt in der Nutzung der Microarrays zur molekularen Klassifizierung und Unterscheidung verschiedener Krebsarten, insbesondere verschiedener Leukämietypen (Golub, T. R. *et al.*, 1999; Liotta, L. *et al.*, 2000). Mit Hilfe des Genexpressions-Monitoring kann man Vorhersagen treffen und Tumoren zu bestimmten, schon bekannten Klassen zuordnen oder auch Klassen von Krebs neu identifizieren. Mit der Untersuchung von 6.817 humanen Genen, die in einem Microarray (Affymetrix) angeordnet sind, war es mittels sogenannter *self organizing maps* (SOMs) möglich, die AML von der ALL abzugrenzen und ebenfalls die T-ALL aufgrund des

Expressionsmustern von der B-ALL zu unterscheiden. Die Zuordnung noch nicht identifizierter Tumoren zu bereits bekannten Klassen läßt sich für die Vorhersage der Medikamentenresponse und der Überlebenschance eines Patienten nutzen.

Das läßt sich auch auf andere Leukämien anwenden. So können Chips hilfreich bei der recht schwierigen Diagnosestellung bei beispielsweise vier histologisch sehr ähnlichen Leukämieformen des Kindesalters, dem Neuroblastom, dem Rhabdomyosarkom, dem Non-Hodgkin-Lymphom und einigen Fällen des Ewing-Sarkom sein. Unter Nutzung sogenannter *artificial neural networks* (ANNs) zur Unterscheidung des Expressionspatterns ist es gelungen, zwischen den verschiedenen Leukämieformen zu differenzieren. Das ist deshalb von besonderer Wichtigkeit, da diese Erkrankungen jeweils verschiedene Therapien für eine optimale Behandlung benötigen (de Boer, J., 2001; Khan, J. *et al.*, 2001).

Krebs ist gekennzeichnet durch komplexe molekulare Defekte, die zu variablen klinischen Symptomen führen. Daß Genexpressionsprofile, die diesen Störungen zugrunde liegen, eng mit klinischen Merkmalen (einschließlich der Patienten-Überlebensrate und des Krankheitsstadiums) beispielsweise der humanen B-CLL in Zusammenhang stehen, konnte in einer in großem Umfang durchgeführten Studie von Stratowa *et al.* dargelegt werden (Stratowa, C. *et al.*, 2001). Mit Hilfe von cDNA-Microarrays, die 1.024 ausgewählte Gene repräsentierten, konnten Gene identifiziert werden, die in ihrer Expression signifikant mit dem Überleben des Patienten und dem klinischen Stadium korrelierten. Die meisten dieser Gene codieren für Zell-Adhäsionsmoleküle (L-Selektin, Integrin- β 2) oder Faktoren, die diese zu induzieren vermögen (IL-1 β , IL-8, EGR1).

Es ist bekannt, daß verschiedene Lymphocyten auch verschiedene Oberflächenmoleküle, die sogenannten CDs (*cluster of differentiation*) exprimieren, anhand derer man sie differenzieren kann. Zur Immunophänotypisierung von Leukämien wurde ein Antikörper-Array mit 60 gegen CD-Antigene gerichteten Antikörpern erstellt und damit wesentlich zur Erhöhung der Effizienz und Präzision der Phänotypisierung beigetragen. Anhand der Expression dieser Antigene kann man zwischen normalen Leukocyten und verschiedenen Leukämien einschließlich der CLL unterscheiden, was zur Diagnostik genutzt werden kann. Diese neue Technik ebnet den Weg für die Identifizierung neuer prognostischer Marker und Antigene, um auch minimale residuale leukämische Zellen nach der Behandlung nachweisen zu können (Belov, L. *et al.*, 2001; Gray, S. G., 2001).

Alizadeh *et al.* entwickelte einen Microarray, den sogenannten Lymphochip, der mit Genen angereichert ist, die in lymphoiden Zellen exprimiert werden oder von immunologischer oder onkologischer Relevanz sein können (Alizadeh, A. *et al.*, 1999). Der Lymphochip ist entstanden aus ausgewählten Proben aus cDNA-Bibliotheken von Wildtyp-Zellen und malignen B-Zellen sowie Genen, die im Zellzyklus und dessen Regulation sowie in Krebserkrankungen involviert sind. Mit Hilfe dieses Chips ist es möglich, simultan die Expression von mehr als 20.000 Genen zu

quantifizieren. Die Analyse der Genexpression kann so die diagnostische Resolution erhöhen und etabliert damit eine weitere Grundlage für die molekulare Klassifizierung dieser Krankheit, basierend auf der Genexpression und ermöglicht die Identifizierung neuer Subklassen.

Erfolge auf dem Gebiet der molekularen Genetik beginnen nun auch zu Erfolgen in der Krebsbehandlung zu werden. Dieser Fortschritt wird anhand einiger neuer cytotoxischer Medikamente ersichtlich, wie der Topoisomerase I Inhibitoren oder neuer Purine, die auch schon Einzug in die klinische Praxis gehalten haben. Auch der Einsatz der monoklonalen Antikörper-Therapie beispielsweise gegen das CD20-Antigen des B-Zell-Lymphoms oder gegen das Her2/neu Onkogen des Brustkrebses hat mittlerweile Wirksamkeit bewiesen (Sikic, B. I., 1999). Untersuchungen des Expressionsprofils einer myeloischen Leukämie-Zell-Linie (LTR6) der Maus mittels eines Oligonucleotid-Microarrays mit 11.000 mRNA-Spezies zu verschiedenen Zeitpunkten nach p53-Aktivierung ergab neue Einsichten in die Regulation der p53-vermittelten Apoptose und des Zellzyklus-Arrests (Kannan, K. *et al.*, 2001). Für die Entwicklung neuer anti-Krebsmedikamente konnten schon eine Anzahl potentieller molekularer Targets identifiziert werden. Dazu zählen insbesondere Gene und regulatorische Proteine des Zellzyklus, wie der Cycline und der CDKs (*cyclin dependent kinase*) (Buolamwini, J. K., 2000). Einige neue Gene, die spezifisch für das Glioblastom sind, konnten mittels Array-Technologie detektiert werden und können in Zukunft dabei helfen, die Mechanismen der Transformation normaler Gliazellen in maligne Zellen zu identifizieren (Ljubimova, J. Y. *et al.*, 2001). Auch stehen schon vielversprechende Modelle zur Vaccination als eine neue Krebstherapie zur Verfügung (Horton, H. M. *et al.*, 1999). Im Zuge der neuen Genomstrategien, der Identifizierung der steigenden Zahl an Genen, die für Tumorantigene codieren, ergibt sich vielleicht schon in naher Zukunft die Möglichkeit, mit einem Impfstoff Krebserkrankungen vorzubeugen und zu bekämpfen.

Anhand neuer Methoden zur Expressionsanalyse lassen sich nunmehr neue Gene und Pathways der Krebsentwicklung und -Progression oder als Targets für neue Therapien identifizieren. Die Ergebnisse daraus lassen sich beispielsweise in den sogenannten Gewebe-Microarrays (TMA, *tissue microarray*) in *in situ*-Hybridisierungen testen. DNA-Microarrays und TMAs stellen somit effektive Verfahren dar, mit deren Hilfe neue Kandidatengene identifiziert und ihre klinische Relevanz verifiziert werden können (Bubendorf, L., 2001).

Die Gen-Microarray-Technologie mit Tausenden von Genen parallel bedarf aber auch der komplexen Analyse und intensiver Computerunterstützung. Die Microarray-Technologie ist somit eng gekoppelt mit der Bioinformatik und komplexen Analyse-Tools, die die fundamentale Basis bilden. Eine der wichtigsten Aufgaben der Analyse ist das Clustering, das Identifizieren von Tumor- und normalem Gewebe, von relevanten Subgruppen, die von klarer biologischer

Bedeutung in Bezug auf Therapie und Prognose oder zur Zeit noch richtungsweisend für die zukünftige Forschung sind (Alon, U. *et al.*, 1999; Getz, G. *et al.*, 2000).

Genomics, die Analyse des Genoms, hat heutzutage als ein breites Feld in der molekularen Onkologie Fuß gefaßt. Aber allein nur auf der Ebene der Gene lassen sich heute keine größeren Entdeckungen mehr machen. Nur die Sequenz einiger Gene zu kennen, ist nicht ausreichend, molekulare Diagnostik zu betreiben und Medikamente zu entwickeln, sondern immer wichtiger wird die simultane Anwendung, die vergleichende Analyse mehrerer Tausend von Genen von gesundem oder erkranktem Gewebe auf dem Genom- und Transkriptom-Level. Die Analyse des Genoms wird komplettiert durch Proteomics, der globalen Analyse der Proteinexpression, auf dem Gebiet der Erklärung der Pathophysiologie, der Funktion der Gene, der molekularen Diagnose und der Entwicklung neuer Krebsmedikamente, was von immer größerer Bedeutung wird (Jain, K. K., 2000).

Je nach Form und Subtyp der Leukämie oder einer anderen Krebserkrankung und den prognostischen Markern ergibt sich eine unterschiedliche Prognose aus der auch eine verschiedenartige Therapie resultiert. Um eine optimale Therapie zu gewährleisten, ist es notwendig, möglichst genau zu diagnostizieren und zu klassifizieren. Die Biochip-Technologie und -Diagnostik kann die Basis für eine individuelle Behandlung bilden und so eine Entscheidungshilfe für Krebspatienten sein.

Die verschiedenen, heutzutage zur Verfügung stehenden Chemotherapien besitzen zum Teil ein sehr hohes kuratives Potential, d.h., viele Patienten erreichen nach Behandlung eine Remission. Später jedoch erleiden sie einen Relaps und haben dann nur sehr geringe Überlebensraten. Viele der Patienten zeigen zu diesem Zeitpunkt eine Mehrfachresistenz (*multidrug resistance*, *mdr*) einem weiten Spektrum an antineoplastischen Medikamenten gegenüber, die strukturell verschieden sein können. Dieses Phänomen tritt auch bei anderen Tumorerkrankungen (Darm, Niere) auf. Untersuchungen dazu lieferten erste Hinweise auf ein Gen *mdr1*, das in diese Mehrfachresistenz involviert ist (Lum, B. L. *et al.*, 1993; Pui, C. H. *et al.*, 1999(a); Norgaard, J. M. *et al.*, 2000). Dieses Gen codiert für ein Oberflächenglycoprotein, eine energieabhängige Pumpe, die cytotoxische Stoffe aus der Zelle transportiert. Ein Array von Genen immunologischer Zellen kann in weiteren Experimenten hilfreich sein, weitere Ansatzpunkte für die Aufklärung und die molekulare Charakterisierung dieser Medikamentenresistenzen sein.

Jeder Tumor ist einzigartig und exprimiert eine Vielfalt verschiedenster -für ihn charakteristische- intra- und extrazellulärer Proteine (*molecular signature*). Microarrays ermöglichen es, 10 bis 100mal mehr Information bereitzustellen, als bisher von klinischer Bedeutung ist (Wooster, R., 2000). Eine sehr große Anzahl an zu untersuchenden Genen

ermöglicht zwar eine genauere Differenzierung, ist aber auch anfälliger, eine zu detaillierte Diagnose aufgrund von Markern zu stellen, die für eine Therapie nicht relevant sind. Ein minimales Set von vielleicht 10 bis 20 Genen könnte robustere Ergebnisse und gleichzeitig aber auch genügend, für die Therapie ausreichend detaillierte Informationen liefern. Experimente mit vielen Tausenden von Genen könnten angesehen werden als Analyse, um herauszufinden, welches dieses Set sein könnte, wieviele Gene oder Sequenzen notwendig sind, um eindeutige Ergebnisse mit ausreichendem diagnostischen Potential zu erzielen.

All die unterschiedlichen Techniken der Micro- oder Macroarrays, so verschieden sie auch in der Realisierung der Methodik sind, haben einiges gemeinsam. Alle haben zum Ziel, experimentell nicht nur etwas über ein Gen oder eine Kaskade, sondern als globale Technologien mehr über die molekularen Netzwerke zu erfahren und so die komplexen Interaktionen und Zusammenhänge der Abläufe, die auf molekularer Ebene in der Zelle stattfinden, verstehen zu lernen, um so gezielt in den veränderten Ablauf bei einer Erkrankung wie Krebs eingreifen und interagieren zu können. Gesucht sind dabei mögliche neue Therapieansätze mit besseren Überlebens- und Heilungschancen für ein weites Spektrum von Krankheiten, insbesondere der Neoplasien. Im Vordergrund stehen dabei die Suche nach neuen Angriffsstellen für Medikamente (*drug targets*), die verfeinerte Diagnostik sowie die Prognose anhand neuer prognostischer Marker (Beziehung zwischen klinischem Befund und der Therapierbarkeit einer bestimmten Krebserkrankung). Um diese Informationen zu erhalten, ist ein genomweites Screening notwendig, was mit Hilfe dieser neuen Methoden schneller und einfach in der Anwendung zu realisieren ist.

1.5 Oligonucleotid Fingerprinting

1.5.1 mRNA – Spiegel der Expression der Zelle

RNA wird in Vertebraten an der DNA gebildet. Als Träger der Kopie der genetischen Information dient sie als Matrize zur Proteinbiosynthese. Auch in Phagen, Pflanzen- und Tierviren ist sie als Träger der genetischen Information (mit eigenem Informationsgehalt) zu finden. RNA kommt etwa 5 bis 10mal häufiger in der Zelle vor als DNA. Sie macht somit den Großteil der Nucleinsäuren in den Zellen aus. Ihre wesentliche und am besten verstandene Aufgabe besteht in der Translation der genetischen Information in die Proteine.

In der Zelle gibt es mehrere Typen an RNA mit unterschiedlichen Aufgaben. Ungefähr 70 - 80% der zellulären RNA im Cytoplasma sind verschiedene rRNA-Typen (ribosomale RNA), als wichtiger Bestandteil der Ribosomen, die in die Aufgabe der Translation involviert sind. Weitere etwa 15% (10 - 20%) werden von den tRNAs ausgemacht, die an der Proteinbiosynthese beteiligt sind. Weniger als 5% (durchschnittlich 1 - 3%) der zellulären RNA ist die in dieser Arbeit interessierende mRNA-Population, die sich aus Tausenden verschiedener RNA-Typen zusammensetzt und als Transkriptionsprodukt der DNA die genetische Information für die Synthese von Proteinen enthält. Andere in der Zelle vorkommende RNAs, die zusammen mit Proteinen an der Bildung von Spleißosomen beteiligt sind, sind nucleäre Ribonucleinsäuren, wie die hnRNA und snRNA. Einige RNAs besitzen Endonucleasefunktionen oder können auch regulatorische Aufgaben übernehmen, so die antisense-RNA, die durch komplementäre Basenpaarung an mRNA regulierend wirkt.

Die mRNA stellt einen Spiegel der zellulären Aktivität dar. Auf dem mRNA-Level sind so Veränderungen in der Expression der Zelle, einer Zell-Linie oder eines Gewebes direkt nachweisbar. Einige mRNAs sind besonders häufig und normalerweise in jeder Zelle in relativ gleicher Menge exprimiert. Dabei handelt es sich um Gene des Grundstoffwechsels, die sogenannten *house keeping genes*. Andere mRNAs codieren für zell- oder gewebespezifische Proteine, wie bestimmte Hormonrezeptoren, Enzyme und Hormone, die ausschließlich nur in den dafür bestimmten Organen zur Expression kommen (Schilddrüse, Niere, Leber, Bauchspeicheldrüse). Wieder andere Gene werden nur zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung eines Organismus aktiv oder kommen nur unter bestimmten Bedingungen (äußere Einflüsse, Autoimmunerkrankungen oder Krebs) zur Expression bzw. werden in ihrer Aktivität verändert.

Um die Expression einiger Gene in einer Zelle anhand des mRNA-Levels zu messen, stehen eine Reihe verschiedener molekularbiologischer Methoden, wie beispielsweise die Northern-Hybridisierung, zur Verfügung. Diese Untersuchungen für alle RNAs der Zelle durchzuführen, ein

Expressionsprofil der Zelle zu erstellen, wäre eine sehr aufwendige Arbeit, vor allem, wenn mehrere Zell-Linien oder Gewebe verschiedener Entwicklungsstufen miteinander verglichen werden sollen.

Mit den Array-Technologien stehen nun Techniken zur Verfügung, die es ermöglichen, Expressionsanalysen von Hunderten, sogar Hunderttausenden von Genen in einem einzigen Experiment durchzuführen und so einen Überblick über Veränderungen der Expressionslevel all dieser Gene zu bestimmten Zeitpunkten und Stadien der Entwicklung, unter verschiedenen Bedingungen oder auch vor und nach der Anwendung von Therapien zu bekommen.

Das Oligonucleotid Fingerprinting als eine der Array-Techniken stellt ein Tool dar, das zwei Methoden in sich vereint. Zum einen ist dies die Expressionsanalyse der in einer Zelle vorkommenden mRNAs, zum anderen die Sequenzierung der mRNA-Population mittels Hybridisierung (SBH, *sequencing by hybridization*). Das ONF ermöglicht es, in großem Umfang und mit einem relativ geringen Aufwand an Zeit und Kosten, die Expression verschiedenster Gene in einer Zelle, einem Gewebe oder Organ, gemessen an der in cDNA revers transkribierten mRNA zu untersuchen.

1.5.2 cDNA-Bibliotheken - direktional klonierte Bibliotheken

Eine cDNA-Bibliothek ist eine Sammlung von cDNA-Kopien aus einer mRNA-Population einer Zelle oder eines Gewebes, vermehrt in einem Vektor und gewöhnlich in *E. coli* kultiviert. Sie ist Voraussetzung für umfangreiche Analysen der Genexpression und sollte folgende Kriterien erfüllen: Sie sollte

- groß genug sein, um Repräsentanten aller Sequenzen zu enthalten, auch solche mit geringerer Abundanz,
- eine nur geringe Anzahl von Klonen enthalten, die nur kleine cDNA-Fragmente darstellen (≤ 500 bp),
- zusammengesetzt sein aus cDNA-Inserts, die etwa der vollen Länge (*full length*) der Kopien der mRNAs entsprechen.

Dabei können die cDNA-Fragmente entweder zufällig (bidirektional) oder richtungsorientiert (direktional) kloniert werden. Direktional klonierte Bibliotheken enthalten Inserts, die in einer spezifischen Richtung relativ zum Transkriptionsstart der originalen mRNA kloniert sind. Diese Art der Klonierung findet speziell bei Expressionsanalysen, wie dem ONF Anwendung und wurde auch in dieser Arbeit verwendet.

1.5.3 Oligonucleotid Fingerprinting und Clustering-Analyse

Das Oligonucleotid Fingerprinting (ONF), als eine Methode der Sequenzierung durch Hybridisierung, ist sehr effizient, da hoch parallel und automatisiert und kann mit hohem Durchsatz realisiert werden. Daher ist diese Methode prädestiniert zur Analyse der Genexpression einer Zell-population oder eines zu untersuchenden Gewebes in cDNA-Bibliotheken sowie auch der genomischen Sequenzierung (Lehrach, H. *et al.*, 1990; Lennon, G. G. *et al.*, 1991; Milosavljevic, A. *et al.*, 1996(b); Clark, M. D. *et al.*, 1999; Schmitt, A. O. *et al.*, 1999). Das ONF ist heute eine etablierte Methode. Sie wurde erst möglich durch die Automatisierung verschiedener Prozesse und Vorgänge und die Entwicklung automatisierter Systeme, die das Übertragen von Kolonien oder den Transfer von PCR-Produkten auf Nylon-Membranen übernehmen konnten und kam erstmals vor etwa einer Dekade zur Anwendung (Poustka, A. *et al.*, 1986; Lehrach, H. *et al.*, 1990; Drmanac, R. *et al.*, 1991; Drmanac, R. *et al.*, 1993(a); Drmanac, R. *et al.*, 1993(b)). Diese Methode basiert auf der hochstringenten Hybridisierung sequenzspezifischer Oligonucleotide auf sogenannten cDNA-Arrays, Spots von PCR-Produkten Tausender einzelner Klone, immobilisiert auf Nylon-Membranen. Das Hybridisierungsmuster der einzelnen Klone, das sich aus den Signalen der Hybridisierung mit etwa 200 bis 250 verschiedenen Oligonucleotiden ergibt, der sogenannte Fingerprint, ist charakteristisch für die jeweilige DNA-Sequenz und ermöglicht daher die Identifizierung von Gruppen identischer oder ähnlicher Klone, die ein gleiches oder ähnliches Transkript repräsentieren.

Als Oligonucleotide verwendet man radioaktiv markierte Dekamere bekannter Sequenz (Pools von Dekameren mit einem oktameren Core: NXXXXXXXXN). Diese Proben wurden selektiert auf der Basis von etwa 15.000 humanen Sequenzen aus der GenBank/EMBL Datenbank, aufgrund der Fähigkeit, einen Pool von Sequenzen in jeweils zwei Gruppen zu teilen. Die informativsten Oligonucleotide sind solche, die -optimalerweise- mit durchschnittlich 50% der Klone hybridisieren. Das heißt, die Hälfte aller Klone beinhaltet zum Oligo komplementäre Bereiche und kann so ein Signal geben, die zweite Hälfte dagegen kann keine Hybridisierung aufweisen. So erhält man ein Set von Proben, mit dem man alle bekannten humanen Gene hoch informativ unterscheiden kann. Die Abb. 1-14 stellt das Prinzip des ONF dar.



Abb. 1-14 Prinzip des Oligonucleotid Fingerprintings

Das Prinzip des ONF beruht auf der sukzessiven Hybridisierung kurzer, zumeist radioaktiv markierter Oligonucleotide an komplementäre Bereiche der zu untersuchenden cDNA und der sich daraus ergebenden Hybridisierungssignale.

positives Hybridisierungssignal: ■ = 1
kein Hybridisierungssignal: □ = 0

Wie in der Abb. 1-14 ersichtlich, ergibt sich aus den Hybridisierungen mit den drei Oligonucleotiden der folgende Fingerprint: 010. Führt man im Folgenden Hybridisierungen mit mehreren verschiedenen Oligonucleotiden durch, so ergibt sich ein für diesen Klon spezifischer Fingerprint: , ein für ihn charakteristischer Vektor von numerischen Werten (binär für den dargestellten Fall ausgedrückt: 010011000100101000100001). Diese Hybridisierungen werden für alle Klone (Klone 1 bis n) der Bibliothek und mit etwa 200 Oligonucleotiden (Oligo 1 bis n) durchgeführt, so daß man dann die Fingerprints aller Klone erhält.

Im Idealfall ist der Fingerprint eines Klones ein binärer Vektor, der anzeigt, ob das Oligonucleotid als Probe einen komplementären Bereich in der Sequenz des cDNA-Klones gefunden hat, was sich in einem starken Signal widerspiegelt (1), oder ob der Klon keinen solchen Bereich aufweist, die Hybridisierung also kein Signal ergeben hat (0).

Dieser für einen jeden Klon typische Fingerprint ist die Voraussetzung für alle weiteren Analysen. Dem Clustering liegt dabei eine Vielfalt von Aufgaben zugrunde. Das Zusammenfassen von Kopien desselben Gens, die sich durch gleiche oder ähnliche Fingerprints identifizieren lassen, in sogenannte Cluster und das Trennen von Kopien verschiedener Gene ist dabei wohl die grundlegendste Aufgabe (Herwig, R. *et al.*, 1999; Herwig, R. *et al.*, 2000). Die daraus resultierenden Ergebnisse lassen sich nun nutzen, um umfangreiche Bibliotheken von cDNA-Sequenzen mittels Datenbankabgleichs anhand der Fingerprints zu identifizieren. Auch der

Abgleich verschiedener Motive oder Genfamilien ist somit möglich. Mit Hilfe des Clusterings wird in z.T. hohem Maße die natürliche Redundanz der Gene verringert, die sonst zu hoch wäre, alle Klone einer cDNA-Bibliothek sequenzieren zu können. So lassen sich z.B. solche cDNA-Sequenzen zur Sequenzierung selektiv auswählen, die keinen signifikanten Datenbank-Match aufweisen, und somit bisher unbekannte Gene darstellen. Einen Überblick über das Prinzip des Clusterings gibt die Abb. 1-15.

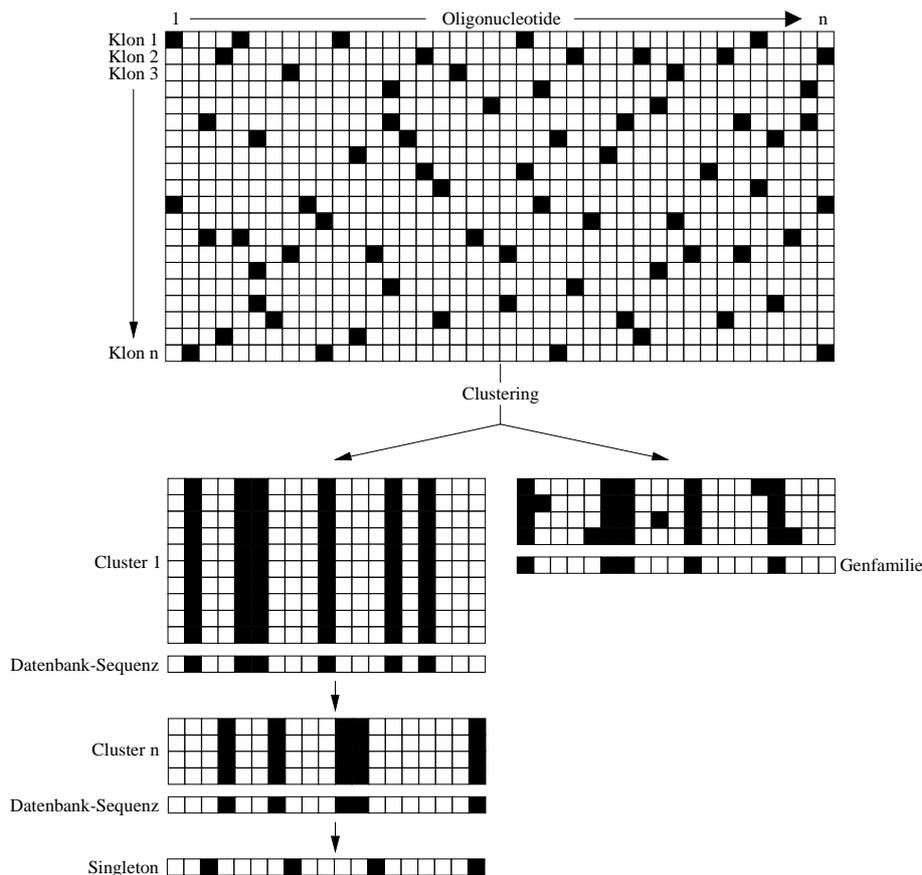


Abb. 1-15 Prinzip des Clusterings

Gleiche oder ähnliche Sequenzen werden anhand gleicher oder ähnlicher Fingerprints, die sich aus allen Hybridisierungssignalen ergeben, in sogenannte Cluster zusammengefaßt, die jeweils ein bestimmtes Gen oder eine Genfamilie repräsentieren.

Das Oligonucleotid Fingerprinting ist ein multifunktionelles Verfahren, das in erster Linie genutzt wird, um in großem Maßstab Expressionsprofile der aktiven Gene gleichzeitig (parallel) von mehreren Zellen, Geweben oder verschiedenen Stadien einer Erkrankung zu erstellen. Ein weiterer großer Vorteil des ONF besteht darin, daß für das Fingerprinting die gesamte vorliegende cDNA-Sequenz eines Klons in Betracht gezogen wird, d.h., die Oligos können verteilt über die gesamte Länge des cDNA-Fragments hybridisieren und so Aufschluß über die entsprechende

Sequenz geben. Bei der herkömmlichen Sequenzierung von ESTs (*expressed sequence tags*) (Sanger, F. *et al.*, 1977), ist es nur möglich, die DNA jeweils vom 5`- bzw. 3`-Ende her zu sequenzieren und sich die Gesamtsequenz schrittweise zu erarbeiten (Adams, M. D. *et al.*, 1991; Adams, M. D. *et al.*, 1992; Adams, M. D. *et al.*, 1993).

Das ONF findet breite Anwendung in einer Reihe von weiteren Versuchen und ist gleichzeitig Voraussetzung für weiterführende Experimente. So können die aus dem Fingerprinting erhaltenen Sequenzinformationen genutzt werden, um neue Gene zu identifizieren (Poustka, A. J. *et al.*, 1999) oder mit Hilfe der Methode des Clusterings Klone zu identifizieren, die zu einer Gruppe (einem Cluster) gleicher oder ähnlicher Sequenzen gehören (Meier-Ewert, S. *et al.*, 1998; Herwig, R., 2000).

Viele Gene sind heute schon sequenziert, wenige sind noch unbekannt. Um mehrfach in einer Bibliothek vorkommende oder schon bekannte Gene von weiteren Analysen auszuschließen, kann das Fingerprinting zur Präselektion von Klonen beispielsweise großer Shotgun-Bibliotheken eingesetzt werden (Radelof, U. *et al.*, 1998), wobei eine weitere Charakterisierung und Analyse der Gene dann durch die herkömmliche Art der Sequenzierung erfolgen kann. Desweiteren kann das ONF als Tool-Produzent z.B. bei der Erstellung von nicht redundanten Unigene-Sets aus cDNA-Bibliotheken dienen, bei dem der jeweils repräsentative Klon der Cluster zur weiteren Analyse selektiert wird, wodurch die initiale Redundanz der Klone minimiert wird.

Ausgangspunkt für das Fingerprinting sind die cDNA-Bibliotheken eines oder mehrerer Gewebe. Dazu wird die aus den Zellen isolierte mRNA in cDNA revers transkribiert, in einen Vektor kloniert und in einen geeigneten Bakterienstamm transformiert. Die erhaltenen Klone werden mit Hilfe eines Roboters von Agarplatten in Microtiterplatten überführt (*picking*), in einer PCR amplifiziert und mittels eines Roboters auf Nylon-Membranen transferiert (*spotting*). Anschließend an die Oligonucleotid Fingerprinting-Hybridisierungen mit etwa 200 - 250 radioaktiv markierten Oligos folgt die Clustering-Analyse, einer Methode zur Identifizierung von Klonen mit gleichen oder ähnlichen Sequenzen (detektiert anhand des gleichen bzw. ähnlichen Hybridisierungsmusters, dem sogenannten Fingerprint) und das Ordnen dieser Klone in Cluster. Im Anschluß daran können im Co-Clustering die Genexpressionsmuster der zu untersuchenden Bibliotheken miteinander verglichen werden, um Unterschiede in der Genexpression beider zu finden. Durch Datenbankabgleiche der sich aus den Hybridisierungssignalen ergebenden experimentellen Fingerprints eines Clusters mit den anhand von *in silico*-Hybridisierungen der Oligos mit Sequenzen aus den Datenbanken erstellten theoretischen Fingerprints und Sequenzierungen können die Cluster bekannter Gene identifiziert und neue Gene (solche Gene, die sich keinem bekannten Cluster zuordnen lassen) gefunden werden. Diese neuen Kandidatengene

können nun selektiert und neu angeordnet werden (*rearranging*), um sie durch weitere analytische Methoden näher charakterisieren zu können.

Die Methode des Oligonucleotid Fingerprintings eröffnet auch die Möglichkeit der Erstellung eines Unigene-Sets, eines Arrays nicht redundanter cDNA-Klone einer Bibliothek oder der in mehreren Bibliotheken differentiell exprimierten Gene. Dies erlaubt die weitere Charakterisierung bestimmter differentiell exprimierter Gene, wie die nähere Identifizierung und quantitative Analyse der Expression oder aber auch die Komplex-Hybridisierung. Das ONF kann die bewährten Methoden nicht vollständig ersetzen, aber eine Auswahl treffen, den Umfang der Bibliotheken eingrenzen und somit den Arbeitsaufwand stark minimieren.

Die Verwendung einer großen Anzahl von Oligonucleotiden unterschiedlicher Sequenz für die Hybridisierungen ermöglicht die Identifizierung auch seltenerer Transkripte in der Bibliothek oder die Unterscheidung von Klonen mit nur geringen Unterschieden zueinander. So können mit der richtigen Auswahl der Oligonucleotide auch Spleißvarianten bestimmter Gene unterschieden werden.

1.6 Ziel der Arbeit

In zunehmendem Maße wurden in den letzten Jahren die Erkenntnisse über den engen Zusammenhang zwischen dem Befund einer hämatoblastischen Erkrankung und deren klinischen Eigenschaften, wie der Therapierbarkeit oder der Überlebensrate, immer deutlicher. Diese Eigenschaften beruhen auf der Regulation und der Expression bestimmter Gene. Die mRNA einer Zellpopulation spiegelt ihr Genexpressionspattern wider, Veränderungen des Levels der Genexpression lassen sich zurückführen auf veränderte Aktivitäten der Gene in der Zelle.

Im Zuge der Entwicklung neuer Technologien können immer umfangreichere Daten gesammelt werden, die es ermöglichen, Diagnosen differenzierter zu stellen und somit die Behandlung der Patienten zu verbessern. Neoplastische Zell-Linien erweisen sich dabei als sehr nützlich und hilfreich, um mehr über die Biologie der immunologischen Zellen und insbesondere über ihre Alteration und Entartung erfahren zu können. Bei den in dieser Arbeit zu untersuchenden Zellen handelt es sich um zwei etablierte Zell-Linien, die ursprünglich aus Patienten mit akuten Leukämien (T-ALL und NK-LGL) isoliert wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen cDNA-Bibliotheken aus der mRNA beider Zell-Linien erstellt werden, die die exprimierten Gene dieser Zell-Linien umfassen.

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Charakterisierung dieser beiden Bibliotheken hinsichtlich ihrer Genexpression mit Hilfe der Methode des Oligonucleotid Fingerprintings. Dabei sollen die Muster der Genexpression beider Bibliotheken miteinander verglichen werden, um die Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den klinisch ähnlichen Krankheiten zu erkennen. Welche Gene gemeinsam und welche Gene spezifisch -differenziell- in den beiden Zell-Linien exprimiert werden, dies mit Hilfe der ONF-Technik herauszufinden und ein sogenanntes globales differentielles Display (*global differential display*) erstellen zu können, soll eine der Aufgaben dieser Arbeit sein. Das Ziel der Arbeit besteht nicht in der Identifizierung eines jeden Transkriptes, sondern vielmehr darin, ein umfassendes Ausgangsmaterial für weiterführende Untersuchungen bereitzustellen, in dem der Umfang der Bibliotheken hinsichtlich der Redundanz vieler Transkripte stark minimiert wird. Besonderes Interesse dabei liegt in der Identifizierung neuer, bisher noch unbekannter Gene immunologischer Relevanz, besonders in Bezug auf Leukämien und andere onkologische Erkrankungen.

Ein weiteres Vorhaben der Arbeit besteht in der Erstellung eines nicht redundanten Sets an Genen, abgeleitet von der ursprünglichen Leukämie-Zell-Bibliothek, eines sogenannten Unigene-Sets. Damit steht ein bisher einzigartiges Tool zur Verfügung, welches neben all den in der normalen Zelle exprimierten Genen auch seltener zur Expression gelangende oder in ihrer Expression veränderte Gene enthält, die spezifisch für die entsprechende Leukämieform sind. Mit

diesem Unigene-Set ist es möglich, vergleichende Komplex-Hybridisierungen durchzuführen, so beispielsweise zum Screening leukämischer Patienten.

Die Untersuchungen der beiden Bibliotheken sowie eines Unigene-Sets können einen Beitrag zu Studien über neue Angriffsstellen für Medikamente (*drug targeting studies*) leisten, die für neue wirksamere Therapien von wesentlicher Bedeutung sein können, sowie der molekularen Charakterisierung der Medikamentenresistenz (*drug resistance*) oder der Identifizierung neuer prognostischer Marker der Leukämien.

Da NK-Leukämien und -Lymphome seltener als die der anderen Zelltypen sind und so auch bisher wenige Zell-Linien dieses Zelltyps etabliert und untersucht wurden, können die Experimente dieser Arbeit hilfreich in der weiteren, detaillierteren Diagnostik oder der Klassifizierung von Subtypen dieses Leukämietyps sein.

Die gerichtete Klonierung der cDNA-Fragmente in einen Proteinexpressionsvektor ermöglicht in weiterführenden Experimenten eine Expression der für Proteine codierenden Fragmente. Die Bibliotheken können so genutzt werden, um die Expression einiger interessierender Proteine zu untersuchen oder Antikörper zu generieren.