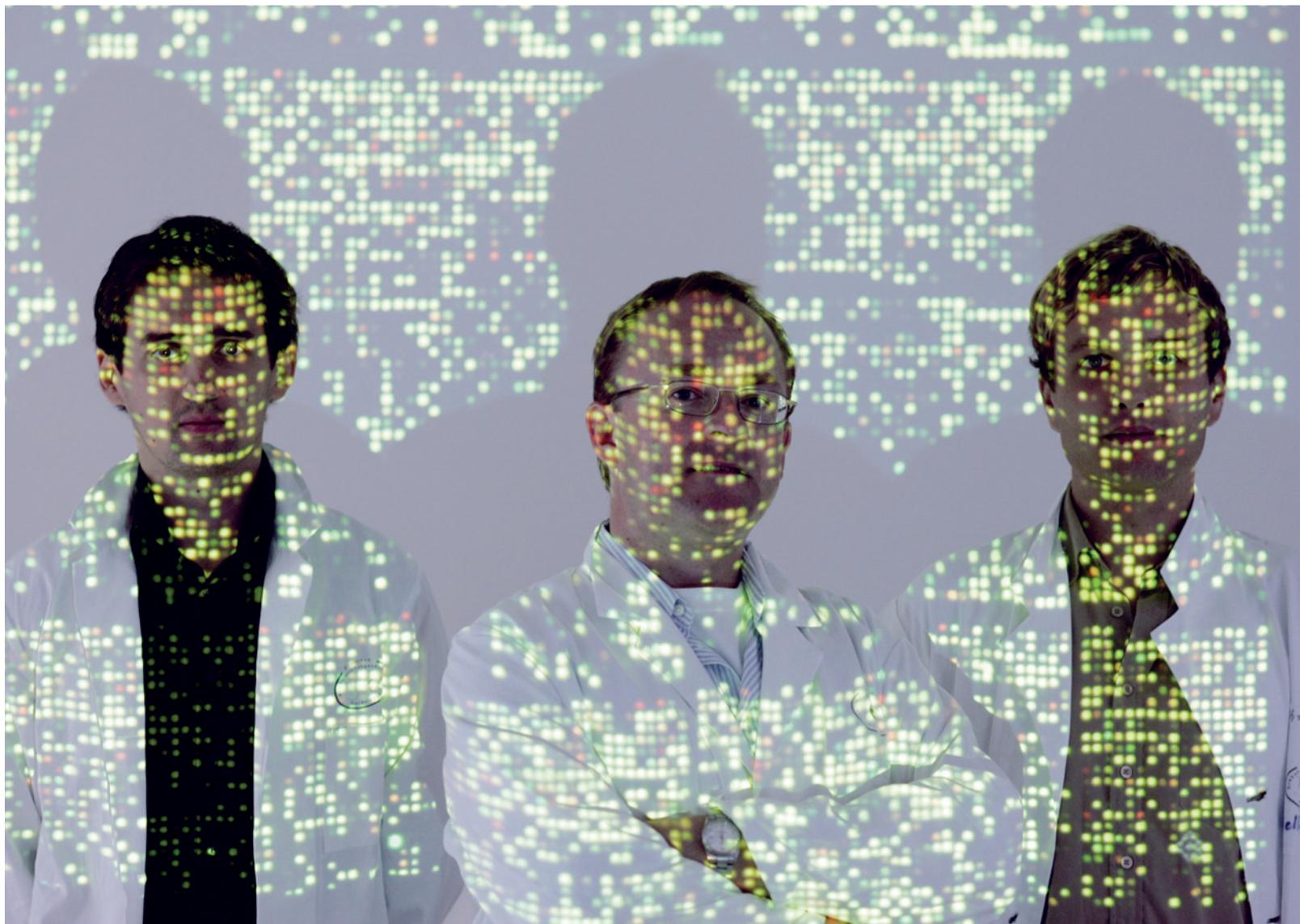


GENOMXPRESS

SONDERAUSGABE

NGFN
Nationales
Genomforschungsnetz

Nationales Genomforschungsnetz



Inhalt

| | |
|---|---|
| Inhalt | 2 |
| Editorial | 4 |
| Das Nationale Genomforschungsnetz | 5 |

Krankheitsorientierte Genomnetze (KG)

| | |
|---|----|
| Herz-Kreislauf-Erkrankungen: Gene beeinflussen den Motor unseres Lebens | 6 |
| Auf dem Weg zur maßgeschneiderten Therapie von Infektions- und Entzündungskrankheiten | 9 |
| Klassische Mittel: Stahl, Strahlen und Zellgift Kampf dem Krebs durch integrierte funktionelle Genomforschung | 11 |
| Bösartigem Kinder-Krebs Neuroblastom auf der Spur Neue Biomarker für das klinische Management | 14 |
| Hirntumoren als große Herausforderung Forschung im Hirntumor-Netzwerk des NGFN | 17 |
| Auf der Suche nach Krankheitsgenen und neuen Therapien Das NeuroNetz untersucht häufige Erkrankungen des Nervensystems mit modernsten molekulargenetischen Methoden | 20 |
| Übergewicht – liegt es doch an den Genen? Genetisch bedingtes extremes Übergewicht als Risiko der modernen Gesellschaft und assoziierte Erkrankungen | 23 |

| | |
|--|----|
| Schlaganfall: Dem Gehirn helfen, sich selbst zu reparieren Neuverschaltung der Nervenzellen stimuliert – Ausfälle des Gehirns bleiben gering | 27 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Gefährliche Wechselwirkung zwischen Genen und Lebensstil Häufigkeit von umweltbedingten Erkrankungen steigt seit einigen Jahrzehnten | 29 |
|--|----|

Systematisch Methodische Plattformen (SMP)

| | |
|---|----|
| Regulatorische Netzwerke verstehen, Krankheitsprozesse untersuchen Plattform „Systematische Sequenzierung und Analyse von Sequenzvarianten“ | 32 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| Ein Programm für jeden Zelltyp Analyse der epigenetischen Interpretation der genetischen Information des Menschen | 35 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| Tausende von Messungen in jedem einzelnen Experiment Gensignaturen für das klinische Management und Verständnis menschlicher Erkrankungen | 37 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| RNA-Interferenz: ein Gen (k)ein Protein NGFN-Wissenschaftler der RNAi-Plattform optimieren die RNAi-Technologie | 40 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| Das menschliche Genom – viel komplexer als vermutet Ressourcen und Anwendungen für die Hochdurchsatz-Funktionsanalyse von Krankheitsgenen | 43 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| Proteinnetzwerke als Grundlage für neue Therapieansätze | 45 |
| Die alternde Gesellschaft – eine Herausforderung für die Forschung Das Human Brain Proteome Project untersucht das Protein-Netzwerk im Gehirn | 48 |
| Unersetzliche Werkzeuge für Genprodukte Die Antikörperfabrik – Antikörper für die funktionale Genomforschung | 51 |
| Mäuse als Modelle für menschliche Erkrankungen | 53 |
| Wie man aus Interventionseffekten über Signalwege in einer Zelle lernen kann | 56 |
| Aufwändige Erforschung komplexer Krankheiten Die Genetisch-Epidemiologischen Methodenzentren im Nationalen Genomforschungsnetz | 59 |
| Die Einheit für Service und Ressourcen als Serviceanbieter Die besondere Stellung der SMP Zentrale Einheit für Service und Ressourcen als Infrastruktur | 61 |

Explorative Projekte (EP)

| | |
|---|----|
| Neue Ansätze für neue Methoden Explorative Projekte im NGFN | 63 |
|---|----|

Akteure und Aktivitäten im NGFN

| | |
|---|----|
| Das Lenkungsgremium und die Evaluation des Nationalen Genomforschungsnetzes | 65 |
| Das Projektkomitee des NGFN | 66 |
| Das Projektmanagement des NGFN | 66 |
| Qualitätsmanagement im Nationalen Genomforschungsnetz | 68 |
| Von der Forschung auf den Markt Technologietransfer im Nationalen Genomforschungsnetz | 69 |
| Glossar | 71 |

Buchbesprechung: Aufgelesen

| | |
|--|----|
| Gott-Gen und Großmutterneuron Geschichten von Gehirnforschung und Gesellschaft | 72 |
|--|----|

| | |
|-----------------------------|----|
| Science Digest | 73 |
|-----------------------------|----|

| | |
|------------------------|----|
| Impressum | 80 |
|------------------------|----|

Editorial

Forscher im Nationalen Genomforschungsnetz entdeckten Varianten eines menschlichen Gens, die das Risiko für Diabetes bestimmen. Sie fanden Erbgutveränderungen, die das Herzinfarktrisiko dramatisch erhöhen. Gemeinsam mit internationalen Kollegen haben sie den Aufbau des menschlichen Chromosoms 8 aufgeklärt.

Diese und viele andere Forschungsergebnisse aus dem Nationalen Genomforschungsnetz belegen eindrucksvoll, dass die Wissenschaftler es in bemerkenswert kurzer Zeit geschafft haben, wertvolle Erfolge im komplexen und langwierigen Forschungsfeld der krankheitsorientierten Genomforschung zu erzielen. Zunehmend werden diese Ergebnisse der Humangenomforschung auch von der Öffentlichkeit wahrgenommen.

Wissenschaftler gehen heute davon aus, dass der Bauplan des menschlichen Organismus aus 25 000 bis 30 000 Genen besteht. Sie sind geordnet in einem Chromosomensatz mit 23 Chromosomenpaaren. Darin enthalten sind schätzungsweise etwa drei Milliarden Buchstaben – das entspricht etwa der Summe von Ziffern und Zahlen in 600 Telefonbüchern –, die eine noch unbekannte Zahl von genetischen Informationen festlegen. Nur acht Variationen dieser genetischen Informationen reichen statistisch gesehen aus, um 24 000 Individuen zu unterscheiden. Da es aber schätzungsweise über 2,5 Millionen solcher Unterschiede im menschlichen Erbgut gibt, gleicht – abgesehen vom Sonderfall eineiiger Zwillinge – kein Mensch dem anderen. In einem komplizierten Zusammenspiel bestimmen die individuellen Gen-Varianten in unserem Erbgut viele Merkmale mit, die den Menschen ausmachen. Sie legen z. B. fest, ob der eine leichter Übergewichtig wird oder eher zu Herz-Kreislauf-Erkrankungen neigt als der andere.

Die Steuerung des Organismus durch die Gene ist also ein äußerst komplexer Prozess. Dies gilt auch für die Entstehung von Krankheiten, die ebenso wie physiologische Prozesse zusätzlich noch durch Umweltfaktoren und

individuelle Lebensgewohnheiten beeinflusst wird. Um zu verstehen, wie Krankheiten entstehen, ist es daher notwendig, das biochemische Drehbuch unseres Körpers lesen zu lernen und alle molekularen Abläufe mithilfe eines genauen Schaltplans vorhersagbar zu machen.

Bei dem Bemühen zu verstehen, wie Gene und Umweltfaktoren bei der Entstehung von Krankheiten zusammenwirken, wurde schnell deutlich, dass eine Wissenschaftsdisziplin allein sehr schnell an ihre Grenzen stößt. Erst durch eine intensive Kooperation von Genomforschern, Klinikern, Statistikern und anderen Spezialisten können die genetischen Ursachen häufiger Krankheiten entschlüsselt werden.

Mit dem Nationalen Genomforschungsnetz wurde diesem Aspekt in Deutschland Rechnung getragen. Das Großprojekt wurde 2001 vom Bundesministerium für Bildung und Forschung auf den Weg gebracht. Gemeinsam sind die Wissenschaftler hier angetreten, um die neuen Chancen einer interdisziplinären Forschung zu nutzen und einen sichtbaren Mehrwert für die Gesellschaft zu schaffen. Die Strategie der Vernetzung von Wissenschaftlern aller Fachrichtungen hat international große Beachtung gefunden und Forscher aus anderen europäischen Ländern und den USA nach Deutschland geführt.

Im Nationalen Genomforschungsnetz werden die genetischen Ursachen von Krankheiten untersucht, die durch ihr häufiges Auftreten oder durch anhaltendes Leid und frühen Tod der Betroffenen von besonderer gesundheitspolitischer Bedeutung sind. Im Genomnetz „Umweltbedingte Erkrankungen“ gehen die Forscher beispielsweise Entzündungskrankheiten auf den Grund, welche durch das Zusammenspiel von Umwelteinflüssen und genetischen Veränderungen ausgelöst werden. Die Alzheimer-Krankheit, Parkinson sowie Suchterkrankungen gehören zu den Themen der Wissenschaftler im Genomnetz „Erkrankungen des Nervensystems“. Im Bereich „Herz-Kreislauf-Erkrankungen“ wird nach den molekularen



Ursachen von Bluthochdruck, Herzschwäche, Herz-Rhythmusstörungen und Herzfehlbildungen gefahndet. Die Forscher des „Krebs“-Genomnetzes haben genetische Veränderungen, die bei Krebserkrankungen eine Rolle spielen, im Visier. Im Genomnetz „Infektion und Entzündung“ werden die Reaktionen des menschlichen Körpers auf Infektionen durch verschiedene Krankheitserreger sowie Entzündungen untersucht.

Die NGFN-Wissenschaftler erarbeiten aber auch innovative zielgerichtete Therapien und untersuchen, inwieweit Gene die Wirksamkeit von Medikamenten beeinflussen. So kann in naher Zukunft, um nur ein Beispiel zu nennen, zahlreichen Blutkrebs-Patienten geholfen werden. Eine Studie des Nationalen Genomforschungsnetzes zeigte, dass bei einem Teil der Blutkrebspatienten spontane Mutationen auftreten, die ein bestimmtes Krebsmedikament wirkungslos werden lassen. Die genaue Kenntnis dieser Mutationen eröffnet nun Wege für die Therapie mit Medikamenten der „zweiten Generation“.

Die vorliegende Sonderausgabe des GenomXPress gibt einen Einblick in diese Arbeiten jedes einzelnen Forschungsschwerpunktes im Nationalen Genomforschungsnetz. Lassen Sie sich mitnehmen auf eine spannende Lesereise, und blicken Sie den Wissenschaftlern bei ihrem Laboralltag über die Schultern.

Viel Spaß bei dieser Lektüre wünscht Ihnen Michael Thielen, Staatssekretär im Bundesministerium für Bildung und Forschung

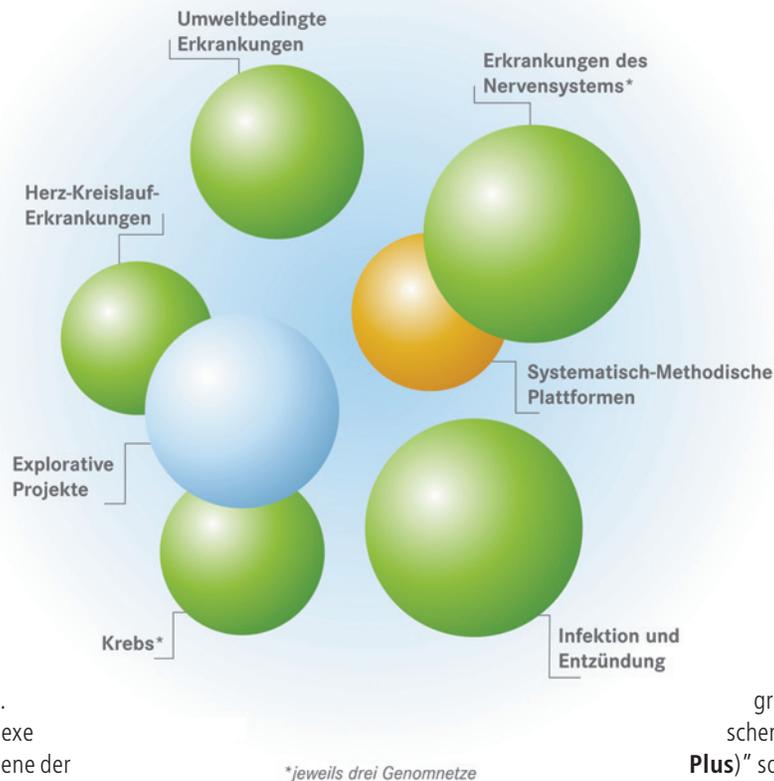
Das Nationale Genomforschungsnetz

Seit 2001 fördert das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) das Nationale Genomforschungsnetz (NGFN), um die Funktion der menschlichen Gene aufzuklären. Im Mittelpunkt der Arbeiten im NGFN steht die Erforschung der genetischen Ursachen von häufigen Krankheiten. Hierfür wurde eine einzigartige Netzwerkstruktur geschaffen, in der führende Experten aus der systematischen Genomforschung und der klinischen Forschung eng zusammenarbeiten. Gemeinsam wollen sie das komplexe Regelwerk unseres Körpers auf Ebene der DNA, RNA und der Proteine verstehen, um Ansatzpunkte für die Behandlung bisher unheilbarer Krankheiten zu finden.

Das NGFN baut auf dem Deutschen Humangenomprojekt (DHGP) auf, in dem von 1995 bis 2004 grundlegende genetische Analysen für die Entschlüsselung des menschlichen Genoms und anschließend Funktionsanalysen durchgeführt wurden. Bereits in der ersten Förderphase des NGFN von 2001 bis 2004 konnten die Wissenschaftler eindrucksvolle Ergebnisse erzielen. 2003 wurden die Arbeiten des NGFN von einem internationalen Expertengremium evaluiert. Die Ergebnisse der Begutachtung waren Anlass für die zweite, aktuelle Förderphase, die noch bis Ende 2007 andauert.

Krankheitsorientierte und systematische Genomforschung

In neun krankheitsorientierten Genomnetzen erforschen NGFN-Wissenschaftler, welche Prozesse Krankheiten wie Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Erkrankungen des



Nervensystems zugrunde liegen. Außerdem untersuchen sie Krankheiten, die auf Infektionen und Entzündungen sowie Umweltfaktoren beruhen. Die patientenorientierte Forschung geht im NGFN Hand in Hand mit der systematischen Analyse des Genoms, Transkriptoms und Proteoms. Um den hierfür nötigen Kosten- und Zeitaufwand auf ein vertretbares Maß zu reduzieren, werden solche groß angelegten Untersuchungen von den Arbeitsgruppen der Systematisch-Methodischen Plattformen (SMP) übernommen. In zwölf SMP wenden hoch spezialisierte Fachleute leistungsfähige Technologien der modernen Hochdurchsatzforschung an und entwickeln diese kontinuierlich weiter. Außerdem stellen sie allen NGFN-Wissenschaftlern eine effiziente Datenverarbeitung zur Verfügung. Seit 2004 wurde mit den Explorativen Projekten (EP) darüber hinaus ein Instrument geschaffen, das neue Technologien und An-

wendungsgebiete für die Humangenomforschung erschließen soll. In insgesamt 19 EP können Wissenschaftler ihre innovativen Forschungsideen überprüfen und umsetzen.

Ausblick

Im Februar 2007 wurde eine neue Ausschreibung vom BMBF für eine dritte Förderphase des Nationalen Genomforschungsnetzes veröffentlicht. Diese umfasst zwei Fördermaßnahmen. Die erste Maßnahme „Integrierte Verbünde der medizinischen Genomforschung (NGFN-Plus)“ soll das Verständnis molekularbiologischer und pathophysiologischer Prozesse bei Volkskrankheiten unter klinischer Ausrichtung erweitern und Ansatzpunkte für die Entwicklung innovativer Verfahren und Produkte für die Diagnose und Therapie schaffen. Hierfür werden molekularbiologischer Sachverstand, einschlägige klinisch-medizinische Expertise und systematische sowie systembiologische Ansätze miteinander kombiniert.

In der zweiten Fördermaßnahme „Innovationsallianzen der medizinischen Genomforschung (NGFN-Transfer)“ soll der Transfer von wissenschaftlichen Ergebnissen aus der medizinischen Genomforschung in die Anwendung unterstützt werden. Ziel ist es, die Ergebnisse aus der akademischen Forschung schneller in die industrielle Anwendung zu bringen und damit die Entwicklung neuer Diagnostika und Medikamente zu fördern. Forschende Unternehmen, Hochschulen und außeruniversitäre Forschungseinrichtungen sollen gemeinsam in enger Zusammenarbeit marktrelevante und transfertaugliche Innovationen generieren.

Krankheitsorientierte Genomnetze (KG)

Herz-Kreislauf-Erkrankungen: Gene beeinflussen den Motor unseres Lebens

Hugo Katus, Jeanette Erdmann, Heribert Schunkert, Christian Hengstenberg, Tillman Dahme, Wolfgang Rottbauer, Ralph Knöll, Gerd Hasenfuß

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind mit weitem Abstand, noch vor den Tumorerkrankungen, die häufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern. Durch den Rückgang anderer Todesursachen wie beispielsweise Infektionskrankheiten oder Mangelernährung werden auch in den heutigen Entwicklungsländern zukünftig immer mehr Menschen an Herz-Kreislauf-Erkrankungen sterben.

Wir alle wissen, dass Risikofaktoren wie Rauchen, Übergewicht, Bewegungsmangel und ungünstige Blutfettwerte die Entstehung schwerer Herz-Kreislauf-Erkrankungen begünstigen können. Nicht jeder Raucher oder Übergewichtige erkrankt aber tatsächlich. Auf der anderen Seite gibt es den jungen, sportlichen Patienten, der sich gesund ernährt, nie ge-

raucht hat und dennoch schwer an Herzmuskel-schwäche erkrankt oder einen Herzinfarkt erleidet, sich einer Transplantation unterziehen muss oder sogar verstirbt. Dies lässt vermuten, dass eine entsprechende erbliche Disposition mitunter eine dominierende Rolle für den Krankheitsprozess spielen kann.

Interaktion von Genen und äußeren Faktoren

Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind komplexe Erkrankungen, die nicht auf eine einzelne Ursache wie beispielsweise ein mutiertes Gen zurückführen sind. Ein Herzinfarkt oder Bluthochdruck ist immer das Ergebnis einer äußerst komplexen Interaktion zwischen dem individuellen Genom des Patienten und exter-

nen Faktoren, d. h. der Umwelt und dem persönlichen Lebensstil. Dadurch ist es besonders schwierig, die genetischen Ursachen und molekularen Mechanismen aufzuklären.

Innerhalb des Nationalen Genomforschungsnetzes haben sich klinische Wissenschaftler, Biologen, Epidemiologen und Statistiker zum Herz-Kreislauf-Netz zusammengeschlossen, um die genetischen Hintergründe und neue therapeutische Ansätze für die wichtigsten und epidemiologisch bedeutendsten Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie z. B. Kardiomyopathien, Koronare Herzkrankung, Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, Bluthochdruck oder Störungen der Blutgerinnung zu erforschen.

Aus den zahlreichen Ergebnissen, die innerhalb des Herz-Kreislauf-Netzes gewonnen werden konnten, werden beispielhaft drei Ergebnisse der Forschung dargestellt. Detaillierte Informationen zu anderen Forschungsprojekten des Herz-Kreislauf-Netzes sind unter www.herz-kreislauf-netz.de zu finden.

Umfangreiche Studien zeigen Risikogene für den Herzinfarkt

Gemeinsam mit Kollegen aus Leicester (Großbritannien) publizierten die Arbeitsgruppen aus Lübeck und Regensburg die bislang umfangreichste genomweite Assoziationsstudie (GWA) [> Glossar] zum Herzinfarkt im *New England Journal of Medicine*. Diese Studie veranschaulicht eindrücklich das Potenzial genomweiter Assoziationsstudien für die Aufklärung von komplexen Erkrankungen.

Die Arbeit basiert zum einen auf einer GWA aus England (WTCCC) und zum anderen auf einer GWA aus Deutschland (Deutsche Herzinfarkt-Familienstudie). Die beiden Studien umfassen insgesamt mehr als 4 500 gesunde Probanden, die als Kontrolle untersucht werden, sowie 2 500 Patienten, in deren Familien-

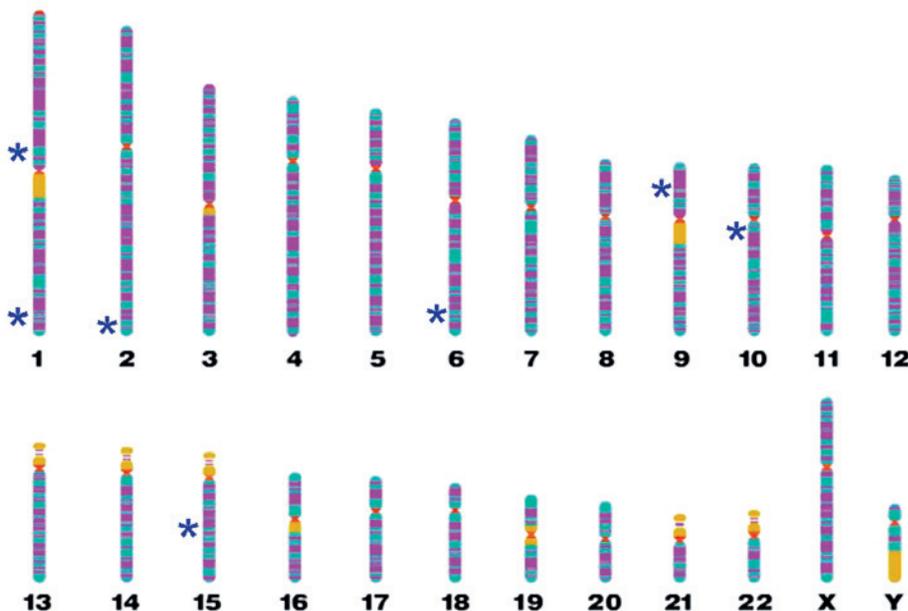


Abb. 1: Darstellung der menschlichen Chromosomen. Die Sternchen zeigen die sieben Genorte, die mit der Koronaren Herzkrankheit bzw. Myokardinfarkt assoziiert sind und die durch genomweite Assoziationen identifiziert wurden.

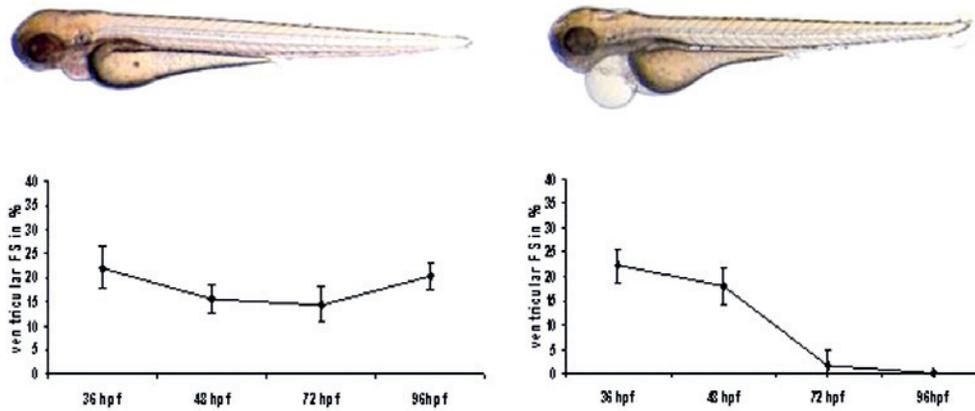


Abb. 2: Die Herzen von *msq*-mutanten Zebrafischen zeigen eine zunehmende Herzschwäche.

(A) 72 Stunden alter Wildtyp Zebrafischembryo (B) Im gleichen Stadium zeigen *msq*-mutante Zebrafische eine Vergrößerung des Herzbeutels und ein lang gestrecktes Herz. (C) Die Pumpfunktion des Herzens bleibt im Wildtyp zwischen 36 und 96 Stunden weitgehend konstant, (D) dagegen nimmt die Pumpfunktion des Herzens in *msq*-Mutanten zwischen 48 und 72 Stunden deutlich ab. Nach 96 Stunden schlugen die *msq*-mutanten Herzen nicht mehr.

vorgeschichte Koronare Herzkrankheit (KHK) bzw. Myokardinfarkt (HI) vorkommt. Im ersten Schritt der Analyse wurden zunächst die positiven Genregionen aus der WTCCC Studie in der deutschen Studie bestätigt. Insgesamt konnten dabei drei Genregionen, in den Chromosomenabschnitten 2q36.3, 6q25.1 und 9p21.3, verifiziert werden.

Interessanterweise wurde der Genort auf Chromosom 9p21.3 auch in zwei weiteren GWAs zum HI gefunden. Damit ist diese Region die bislang am sichersten mit dem genetischen Risiko für KHK oder HI assoziierte Genregion. Hier liegen zwei Gene (*p16INK4a* und *p15INK4b*), die eine Rolle bei der Regulation des Zellwachstums spielen. Ein unkontrolliertes Wachstum von Gefäßzellen ist unter anderem an der Entstehung einer Arteriosklerose beteiligt. In einer zweiten Analyse wurden die Daten beider GWAs kombiniert. Dabei konnten vier weitere neue Genregionen identifiziert werden, die äußerst stark mit KHK/HI assoziiert sind (auf Chromosom 1p13.3, 1q41, 10q11.21 und 15q22.33). Damit wurden in dieser Arbeit insgesamt sieben Genregionen ermittelt, die substantiell zum HI-Risiko beitragen. Bemerkenswert dabei ist, dass die risikobehafteten Allele [[> Glossar](#)] relativ häufig sind (zwischen 16 und 50%) und diese das assoziierte Erkrankungsrisiko nahezu verdoppeln können.

Zebrafisch – ein hervorragendes Modell

Das Herz hat die Fähigkeit, seine Leistung stets an die akute Belastung anzupassen. Um Schwankungen des Blutdrucks und der Herzfüllung wahrnehmen zu können, besitzt der Herzmuskel spezielle Dehnungssensoren (mechanosensing). Als Antwort auf diese Unregelmäßigkeiten werden dann biochemische Signale ausgesendet (mechanotransduction), die zu einer

Anpassung der Pumpkraft führen. Dieser Mechanismus scheint auch im Zusammenhang mit Herzmuskelerkrankungen von großer Bedeutung zu sein.

Der Zebrafisch ist ein hervorragender Modellorganismus zur Erforschung von Herzerkrankungen und deren Ursachen. Da der Zebrafisch während der Entwicklung durchsichtig ist, können Struktur und Funktion des Herz-Kreislauf-Systems im lebenden Organismus beobachtet werden. Auch können Zebrafischembryonen während der Embryonalentwicklung ohne intaktes Herz-Kreislauf-System leben, da der Sauerstoff über Diffusion in die Zellen gelangt. Das Herz-Kreislauf-System entwickelt sich im Zebrafisch sehr schnell. Schon 72 Stunden nach der Befruchtung der Eizellen ist das Herz weitgehend ausgereift und entspricht in der Struktur und Funktion dem eines neugeborenen Säugers. Mithilfe von sogenannten Mutagenese-Screens können durch bestimmte Chemikalien zufällige Mutationen hervorgerufen werden. Eine so entstandene mutante Zebrafischlinie trägt den Namen *main squeeze* (*msq*). Die Herzen dieser Zebrafische verlieren im Laufe der Entwicklung an Pumpkraft, was zu völligem Herzversagen führen kann (Abb. 2). Dies erinnert stark an eine genetisch bedingte Herzmuskelschwäche im Menschen, die sogenannte *dilatative Kardiomyopathie* [[> Glossar](#)], bei der Patienten auch oft eine rasch zunehmende Herzinsuffizienz entwickeln, die letztlich eine Herztransplantation erforderlich macht.

Herzmuskelzellen mit defektem Dehnungssensor

Durch die Dehnung von Herzmuskelzellen werden bestimmte Gene verstärkt aktiviert. Einige dieser Gene, beispielsweise das Gen für den atrialen natriuretischen Faktor (ANF) und für den Vascular Endothelial Growth Factor

(VEGF), sind in *msq*-mutanten Zebrafischembryonen jedoch fast vollständig inaktiviert. Daher ist anzunehmen, dass die Pumpschwäche der Herzen von *msq*-mutanten Zebrafischen durch einen Verlust der Wahrnehmung und Verarbeitung des Dehnungszustandes der Herzmuskelzellen bedingt ist. Als Ursache für die mangelnde Wahrnehmung dieser Dehnung und die daraus resultierende Pumpschwäche der Herzen in den *msq*-mutanten Zebrafischen konnte eine Mutation im Gen der Integrin-linked Kinase (ILK) identifiziert werden. Integrine befinden sich in der Zellmembran und können dort Signale von außen an das Zellinnere weiterleiten. Daher wurde spekuliert, dass Integrine an der Wahrnehmung des Dehnungszustandes von Herzmuskelzellen beteiligt sein könnten.

Durch Antikörperfärbung konnte zudem nachgewiesen werden, dass sich die ILK innerhalb von Herzmuskelzellen im Bereich der sogenannten Z-Scheibe befindet, einer Struktur, die für die Verankerung der krafterzeugenden Myofilamente von Bedeutung ist, und die vor allen Dingen als der wohl wichtigste Ort der Dehnungswahrnehmung von Herzmuskelzellen angesehen wird. Die *msq*-Mutation führt zu einem Austausch der Aminosäure Leucin308 durch die Aminosäure Prolin (ILKL308P). Es war bereits bekannt, dass an diese Region der ILK zwei weitere Proteine, β -Parvin/Affixin und Paxillin, binden können. Entsprechend war es naheliegend, dass die Bindung der ILK an diese Proteine eine wichtige Rolle bei der Entdeckung von Dehnungssignalen spielen könnte. Durch biochemische Analysen konnte in der Tat gezeigt werden, dass ILKL308P zwar weiterhin an Paxillin, nicht mehr jedoch an β -Parvin/Affixin binden kann. Eine Inaktivierung des β -Parvin/Affixin Gens im Zebrafisch führte darüber hinaus zu der gleichen Art Herzschwäche,

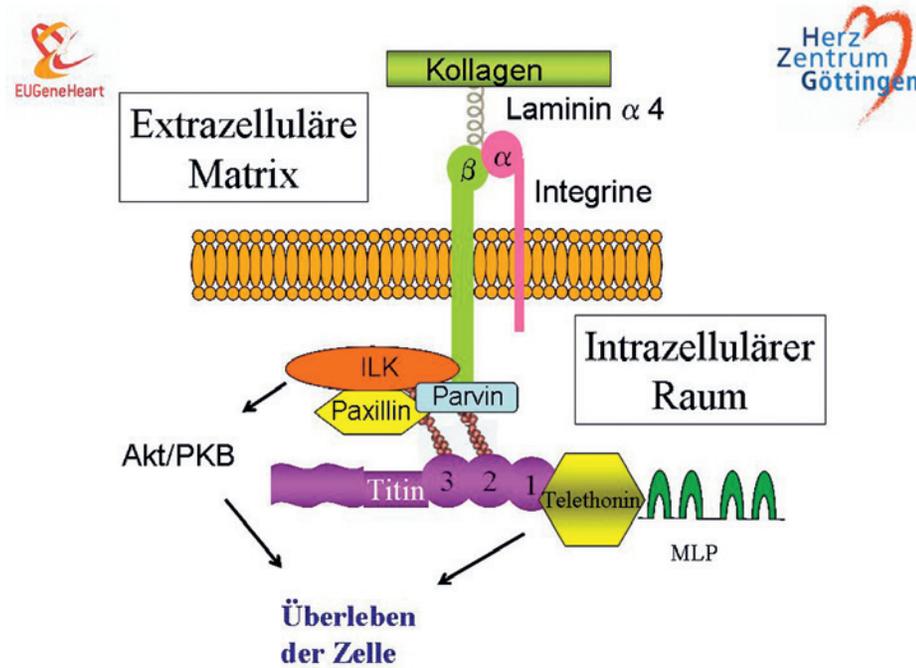


Abb. 3: Die Abbildung zeigt, dass Laminin alpha 4 über Integrine mit der Integrin linked kinase verbunden ist, und dass über diese Verbindung Signale für das Überleben der Zellen ausgesendet werden. Mutationen in diesen Bestandteilen führen zum Zelltod.

wie sie in den *msq*-Mutanten auftritt, was auch hier mit einer fehlenden Dehnungswahrnehmung und unzureichender Aktivierung von ANF und VEGF einhergeht. Entsprechend kann man postulieren, dass für eine korrekte Wahrnehmung der Dehnung eine intakte Proteinbindung zwischen der ILK und β -Parvin/Affixin erforderlich ist.

Als Proteinkinase kann die ILK normalerweise andere Proteine wie zum Beispiel die Protein Kinase B (PKB) in der Zelle durch Phosphorylierung aktivieren. Tatsächlich konnte die Herzinsuffizienz der *msq*-mutanten Zebrafische durch Injektion einer besonderen Proteinkinase, die nicht mehr durch Phosphorylierung aktiviert werden muss, verhindert werden. Hieraus kann man ableiten, dass die spezifische Phosphorylierung der PKB durch die ILK in Herzmuskelzellen ein essenzieller Schritt in der Weiterleitung von Dehnungssignalen ist. Aktivierte PKB kann zu vermehrter Bildung des Hormons VEGF führen. An einer anderen Zebrafischmutante *dead beat (ded)* konnte zuvor gezeigt werden, dass VEGF zu einer vermehrten Kalziumfreisetzung im Herzen und damit einer Steigerung der Pumpkraft führt. Die Injektion von VEGF in *msq*-mutante Zebrafische konnte die Entstehung von Herzinsuffizienz verhindern.

Insgesamt scheint also die Dehnung von Herzmuskelzellen durch das Integrin/ILK/ β -Par-

vin/Affixin Netzwerk erkannt zu werden, wodurch die ILK aktiviert wird, die ihrerseits die PKB durch Phosphorylierung aktiviert und zur vermehrten Freisetzung von VEGF aus den Herzmuskelzellen führt und über eine Erhöhung der Kalziumkonzentration die Pumpkraft der Herzmuskelzellen steigert. Die Identifikation dieses neuen Signalweges im Herzen hat das Verständnis des Mechanismus, durch den das Herz seine Pumpkraft an den Bedarf anpassen kann, entscheidend verbessert. Die beteiligten Moleküle spielen höchstwahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Herzinsuffizienz beim Menschen. Das Verständnis dieses Anpassungsmechanismus eröffnet die Möglichkeit für neue und spezifische Therapieansätze von Herzmuskelerkrankungen.

Ursachen für Herzschwäche

Die diastolische Dysfunktion ist eine Störung der Blutfüllung des Herzens während der Diastole (Erschlaffung nach der Kontraktion) aufgrund gestörter Nachgiebigkeit des Herzmuskels. Erst in den letzten Jahren ist sie als eigenständige Erkrankung des Herzens anerkannt worden. Deshalb gibt es bislang nur wenige gesicherte epidemiologische Daten. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass bis zu 50 Prozent aller Herzinsuffizienzserkrankungen primär durch eine diastolische Dys-

funktion verursacht werden. Auch Kardiomyopathien, primäre Erkrankungen des Herzmuskels, können mit einer diastolischen Dysfunktion bzw. einer diastolischen Herzinsuffizienz einhergehen. Im Rahmen des NGFN Projektes *Genomics of diastolic heart failure – susceptibility, progression and therapeutic outcome* wurden deshalb besonders die genetischen Ursachen dieser Erkrankung analysiert.

Bislang konnten fast alle genetischen Ursachen der Kardiomyopathien auf Mutationen in muskelspezifischen Genen zurückgeführt werden. Nun wurde überprüft, ob Herzmuskelerkrankungen auch durch Defekte in Genen verursacht werden, die für extrazellulär lokalisierte Proteine kodieren und die ubiquitär, also nicht nur in Muskelzellen, exprimiert werden.

Interessant war hierbei besonders das Laminin alpha 4 Gen, ein Bestandteil der extrazellulären Matrix. Es konnten durch Analyse von über 500 Patienten mit Kardiomyopathie und diastolischer Dysfunktion zwei verschiedene Mutationen nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen an Zebrafischen führten zu der Entdeckung, dass Laminin alpha 4 über Bestandteile von Zelloberflächen (sogenannte *Integrin* Moleküle) mit dem Enzym ILK verbunden ist, und dass Mutationen des ILK-Gens auch beim Menschen zu einer Herzerkrankung führen können.

Insgesamt konnte man erstmals zeigen, dass Endothelzellen (also die Auskleidung von Blutgefäßen) maßgeblich an der Entwicklung einer Herzinsuffizienz und einer diastolischen Herzinsuffizienz beteiligt sein können, und dass eine Herzinsuffizienz auch von Bestandteilen, die außerhalb der Herzmuskelzellen lokalisiert sind, ausgelöst werden kann.

Literatur

- Samani, N.J. et al. *Genomewide association analysis of coronary artery disease. N Engl J Med.* (2007) 357(5):443-53.
- Bendig, G. et al. *Integrin-linked kinase, a novel component of the cardiac mechanical stretch sensor, controls contractility in the zebrafish heart. Genes Dev.* 20 (2006), 2361-72.

Kontakt

Prof. Dr. Hugo Katus
 Universität Heidelberg, Uniklinik
 Im Neuenheimer Feld 410, 69120 Heidelberg
 E-Mail: hugo.katus@med.uni-heidelberg.de

Auf dem Weg zur maßgeschneiderten Therapie von Infektions- und Entzündungskrankheiten

T. Chakraborty, I. Ruocco, H. Hossain, G.-R. Burmester, S. Ehlers, T. Häupl, R. Horstmann, R. Lang, A. Radbruch, H. Wagner

Die jährliche Grippewelle, SARS, zunehmende Resistenzen gegen Antibiotika – trotz der immensen medizinischen Fortschritte beherrscht der Mensch die Infektionskrankheiten noch lange nicht: Mehr als 13 Millionen Menschen fallen auch heute noch weltweit jedes Jahr übertragbaren Krankheiten zum Opfer. In der Regel antwortet der Körper auf krankheits-erregende Viren und Bakterien mit einer Entzündung, also einer komplexen Abwehrreaktion des Immunsystems zum Schutz des Organismus, die aber auch, wie bei der bakteriellen Blutvergiftung (Sepsis), außer Kontrolle geraten und zu vielfältigen Funktionsstörungen und schließlich Multiorganversagen mit tödlichem Ausgang führen kann. Entzündungen können jedoch auch unabhängig von einer Infektion entstehen, so zum Beispiel bei der rheumatoiden Arthritis, einer entzündlichen Erkrankung der Gelenke. Das krankheitsorientierte Genomnetz „Infektionen und Entzündungen“ widmet sich der Erforschung der unterschiedlichen Entzündungsformen.

Ziel ist es, mithilfe der Genomforschung zu verstehen, welche molekularen Prozesse Entzündungen steuern. Mit diesem Wissen können sich die in dem Netzwerk untersuchten Erkrankungen besser diagnostizieren und therapieren lassen. Auch der Behandlungserfolg von Infektions- und Entzündungserkrankungen könnte besser vorhergesagt werden. Das Infektions- und Entzündungsnetz (Abb. 1) verbindet klinische Forschung und Grundlagenforschung und besteht aus den Arbeitspaketen „Sepsis“, „Gastrointestinale Infektionen“, „Virusinfektionen“, „Parasitosen“, „Tuberkulose“ und „Chronisch-entzündliche rheumatische Erkrankungen“. Die Bereiche „Datenmanagement und Bioinformatik“, „Modelle der angeborenen Immunabwehr/Microarray and Bioinformatics Core Unit“ sowie „Zelltypisierung und -sortierung“ sind dem Netzwerk als sogenannte Brückenprojekte angegliedert.

Patientenorientierte Forschung

Die Arbeitspakete „Sepsis“, „Parasitosen“, „Tuberkulose“ und „Chronisch-entzündliche rheumatische Erkrankungen“ befassen

sich mit patientenorientierter Forschung, für die sehr umfangreiche Personengruppen (Kohorten) rekrutiert wurden (Abb. 2). Um potenzielle molekulare Marker zur Diagnose und Therapie bei Sepsis und chronisch-entzündlichen rheumatischen Erkrankungen zu ermitteln, wenden die Wissenschaftler das Verfahren der Genexpressionsanalyse an. Dabei wird die Aktivität aller Gene des Erbgutes in einem definierten biologischen Kontext – also z. B. einem erkrankten Gewebe – untersucht. Die Genaktivitäten können grafisch dargestellt werden und ergeben zusammen das Genexpressionsprofil. Auf diese Weise lassen sich geeignete Kandidatengene identifizieren, die in Zusammenarbeit mit der Industrie für die Entwicklung neuer Diagnostika genutzt werden sollen.

In den Arbeitspaketen „Parasitosen (Malaria)“ und „Tuberkulose“ werden umfangreiche populationsgenetische Studien zur Ermittlung der natürlichen Anfälligkeit und Resistenz gegenüber den untersuchten Erkrankungen durchgeführt, die völlig neue Erkenntnisse darüber erwarten lassen, warum bestimmte Per-

sonen erkranken und andere nicht, obwohl sie dem gleichen Erkrankungsrisiko ausgesetzt sind.

Biochip-Analysen zur Sepsis

Die schwere Sepsis und der septische Schock sind noch immer die führenden Todesursachen auf nicht-kardiologischen Intensivstationen. Ziel des Arbeitspaketes „Sepsis“ ist es, neue Ansätze für die Diagnose dieses Krankheitsbildes zu finden, da sich auch heute noch ein septischer und damit lebensbedrohlicher Zustand weder frühzeitig noch eindeutig diagnostizieren lässt. Zu diesem Zweck wurden Blutproben von drei großen Patientenkohorten mit hohem Sepsisrisiko (Patienten mit Polytrauma, schwerer Lungenentzündung und Frühgeborene, die vor der 32. Schwangerschaftswoche zur Welt kamen) entnommen und Biochip-Analysen durchgeführt. In der Studie an Polytraumapatienten zeigte sich, dass die aus peripherem Blut mithilfe von Biochips erstellten Genexpressionsprofile sehr gut als molekulare Marker für die Diagnose einer Sepsis geeignet

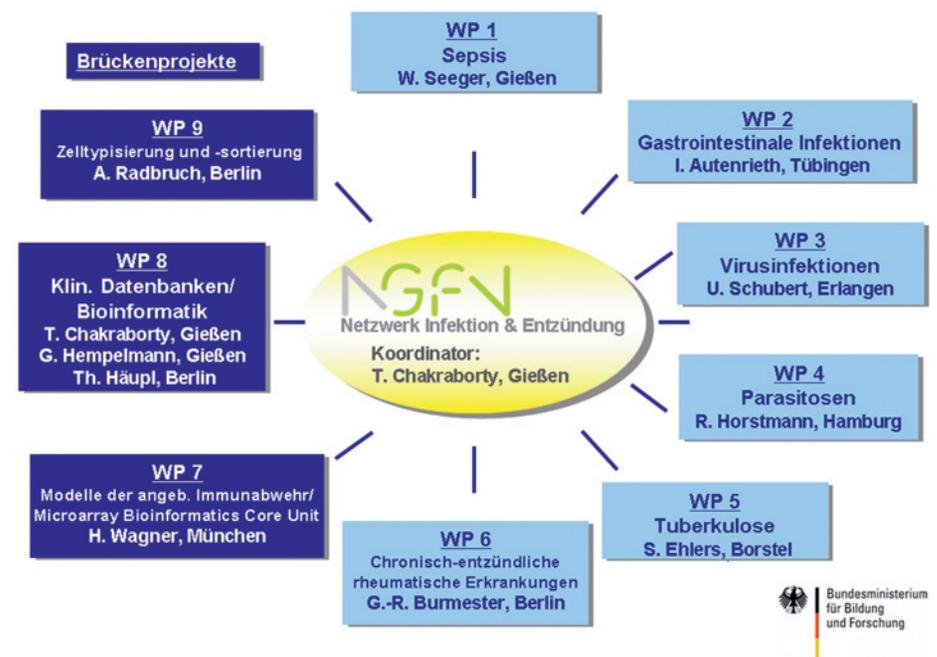


Abb. 1: Die Struktur des Infektions- und Entzündungsnetzes.



Abb. 2: Infektionen und Entzündungen sind weit verbreitete Volkskrankheiten. Allein in Deutschland erkranken jährlich rund 100 000 Menschen an einer Blutvergiftung. Von rheumatischen Erkrankungen, z. B. der rheumatoiden Arthritis, sind in Deutschland zurzeit etwa 1 Million Menschen betroffen. Krankheiten wie Tuberkulose und Malaria breiten sich weltweit wieder aus, u. a. verursacht durch Bevölkerungsexplosion und Verarmung in vielen Teilen der Welt. Umfangreiche genetische Studien an gut definierten populationsrepräsentativen Patientenkohorten im Infektions- und Entzündungsnetz sollen helfen, Ursachen solcher Krankheiten und humangenetische Einflüsse zu ermitteln, um letztendlich mit verbesserten Therapien deren Verbreitung einzudämmen.

sind. Dank dieser Profile können bereits 12 bis 24 Stunden nach erfolgtem Trauma diejenigen Patienten identifiziert werden, die eine Sepsis erleiden werden. Anhand von Genexpressionsprofilen aus Nabelschnurblut konnten Frühgeborene, die eine Sepsis entwickeln werden, von Kindern unterschieden werden, die nicht durch eine Blutvergiftung gefährdet sind. In zusätzlichen Genomstudien wurde die Variation eines Gens für den Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) ermittelt, dessen Träger ein deutlich erhöhtes Risiko haben, im Falle einer Verletzung eine Sepsis mit tödlichem Ausgang zu entwickeln. TNF α löst Signalmechanismen aus, die bei den Abwehrreaktionen des Körpers eine wichtige Rolle spielen.

Chronisch-entzündliche rheumatische Erkrankungen

Die meist unklaren entzündlich-rheumatischen Erkrankungen sind klinisch eine große Herausforderung. Frühzeitige Diagnose und rechtzeitige, für den Patienten maßgeschnei-

derte Therapien sind entscheidend.

Mit genomweiten Genaktivitätsanalysen wurden verschiedene Zellarten untersucht und die Ergebnisse in eine neu entwickelte Online-Datenbank eingegeben (www.bioretis.de). Dabei stellte sich heraus, dass es zahlreiche Gene gibt, deren Aktivität charakteristisch für eine bestimmte rheumatische Erkrankung ist. So sind zum Beispiel bei der rheumatoiden Arthritis (RA), dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) oder der ankylosierenden Spondylitis (AS) jeweils unterschiedliche Gene aktiv. Insbesondere Monozyten, die zu den weißen Blutkörperchen gehören, zeigten bereits krankheitstypische Merkmale noch bevor sie in das Entzündungsgewebe einwandern. Mit molekularen Analysen kann man inzwischen auch nachweisen, ob RA-Patienten erfolgreich mit TNF-alpha Blockern behandelt wurden. Die in diesen Untersuchungen identifizierten Gene (*Siglec-1*, *CD11c*, *Twist1*) werden derzeit als neue Biomarker für den Routineeinsatz im Blut getestet. Zusätzlich wurden auch neue Autoan-

tigene gefunden, die sich als Biomarker zur Früherkennung und Therapieoptimierung eignen und in Streifen-tests als neue kostengünstige Diagnostika Anwendung finden sollen.

Neue Erkenntnisse zur Malaria

Sichelzell-Hämoglobin, Hämoglobin C und weitere Krankheiten, bei denen die Hämoglobinbildung in den roten Blutkörperchen gestört ist (Thalassämien), sind seit Jahrzehnten bekannte Erbkrankheiten, die vor schwerer Malaria schützen. Untersuchungen an 4 500 Kindern ergaben das unerwartete Ergebnis, dass Thalassämie und Hämoglobin C – im Gegensatz zum Sichelzell-Hämoglobin S – nicht allgemein vor lebensbedrohlicher Malaria schützen, sondern vor ganz speziellen Komplikationen wie schwerster Blutarmut oder Koma, was die Betrachtung dieser klassischen Erbkrankheiten grundlegend änderte.

Ein genomweiter Vergleich von 450 Geschwisterkindern aus Ghana, die acht Monate lang wöchentlich auf Malaria hin untersucht worden waren, zeigte, dass eine bestimmte Region auf Chromosom 10 die Häufigkeit von Malariaanfällen beeinflusst. Die Region wurde inzwischen auf zwei Gene eingegrenzt, deren Funktion beim Menschen noch unbekannt ist.

Im Vordergrund des Malariaprojektes steht inzwischen eine genomweite Suche nach Unterschieden zwischen Kindern mit lebensbedrohlicher Malaria und gesunden Kindern. Dazu wurden bei jedem der 2 500 Kinder 1,8 Millionen Genvarianten analysiert, die über das ganze Genom verteilt sind. Diese Daten werden zurzeit ausgewertet. Es werden völlig neue Erkenntnisse darüber erwartet, warum einige Kinder an Malaria sterben und andere nicht einmal erkranken, obwohl sie gleichermaßen infektiosen Mückenstichen ausgesetzt sind.

Anfällig für Tuberkulose?

Die Tuberkulose (TB) hat nach wie vor weltweit unter allen bakteriellen Infektionskrankheiten mit ca. 8,8 Millionen Neuerkrankungen und 1,6 Millionen Todesfällen pro Jahr die höchste Krankheitshäufigkeit und Mortalität. Nur 5-10 % derjenigen, die mit dem Erreger *Mycobacterium tuberculosis* infiziert sind, entwickeln jedoch eine aktive TB im Laufe ihres Lebens.

Am MPI für Infektionsbiologie in Berlin wurde das Blut von TB-Patienten und deren Kontaktpersonen untersucht. Dabei fand man drei Kandidatengene (*Lactoferrin*, *CD64*, *Ras-assoziierte GTPase 33A*), anhand deren Aktivität

sich mit 85-prozentiger Wahrscheinlichkeit feststellen lässt, ob eine Person mit TB-Verdacht gesund oder krank ist.

Am Forschungszentrum Borstel werden TB-resistente und -empfindliche Mausstämmen untersucht. Die Analysen zeigten, dass diejenigen Mäuse, deren Immunsystem besonders gut funktioniert und die Bakterien besonders gut abwehren konnte, früher verstarben als ihre Artgenossen.

Am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in Hamburg haben Untersuchungen an einzelnen Kandidatengenomen bisher nicht erkennen lassen, dass der Schutz vor Infektion oder Krankheitsausbruch von bestimmten Genvarianten beeinflusst wird. Zurzeit werden in einer umfangreichen Genomstudie bei 1 000 Patienten je 1,8 Mio. Genvarianten untersucht, um zu erforschen, ob es eine genetische Veranlagung für die Empfänglichkeit und Resistenz gegenüber TB gibt.

Modellsysteme für Infektions- und Entzündungsprozesse

Die Arbeitspakete „Gastrointestinale Infektionen“, „Virale Infektionen“ und „Modelle der angeborenen Immunabwehr“ arbei-

ten ausschließlich mit Modellsystemen in Form von Zellkulturen, Organ- und Tiermodellen. Hierbei geht es um die Analyse der an Infektions- und Entzündungsprozessen beteiligten Signal- und Stoffwechselwege.

Die Netzwerkpartner an der TU München haben analysiert, mit welchen molekularen Mechanismen der Körper auf eine Infektion mit Mykobakterien oder Chlamydien bzw. auf eine Blutvergiftung durch mehrere Krankheitserreger (polymikrobielle Sepsis) reagiert.

Ein weiterer Forschungsschwerpunkt untersucht Komponenten des angeborenen Immunsystems, die bei der Abwehr von krankmachenden Mikroorganismen eine wichtige Rolle spielen, indem sie Strukturmerkmale von Krankheitserregern erkennen und binden. Die wichtigste Familie dieser Sensor-Moleküle ist die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLRs). Das NGFN-Projekt geht der Frage nach, welche Strukturkomponenten der bakteriellen DNA und RNA durch die Toll-like Rezeptoren TLR7, 8 und 9 erkannt werden.

In diesem Zusammenhang wurde eine Schlüsselrolle für das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA identifiziert. Durch weitere Untersuchungen konnte in diesem Projekt gezeigt wer-

den, dass die TLR-Stimulation vom Adapterprotein *Myd88* abhängig ist.

Ausblick

Die Forschungsergebnisse des Infektions- und Entzündungsnetzwerkes konnten nur im interdisziplinären und vernetzten Forschungsverbund, wie er durch das Nationale Genomforschungsnetz ermöglicht wird, erreicht werden. In der dritten Förderphase des NGFN sollen die hier erarbeiteten Forschungsergebnisse in Kooperation mit der Industrie verstärkt in die Praxis umgesetzt werden. So könnten die Forschungsergebnisse vielleicht schon in den nächsten Jahren zur Entwicklung dringend benötigter neuer Diagnostika und Medikamente zur Behandlung von Infektions- und Entzündungskrankheiten führen.

Kontakt

Prof. Dr. Trinad Chakraborty
*Institut für Medizinische Mikrobiologie
 der Justus-Liebig-Universität
 Bereich Genomforschung*
 Frankfurter Straße 107, 35392 Gießen
 E-Mail: Trinad.Chakraborty@
 mikrobio.med.uni-giessen.de

Klassische Mittel: Stahl, Strahlen und Zellgift

Kampf dem Krebs durch integrierte funktionelle Genomforschung

Roland H. Stauber und Walter Birchmeier

Die klassischen Mittel der Onkologie sind Stahl, Strahlen und Zellgifte. Doch sowohl die operative Tumorentfernung, die Bestrahlung als auch die Chemotherapie ziehen ebenso gesunde Teile des Organismus in Mitleidenschaft und bewirken oftmals keine endgültige Heilung. Das Krebsnetz hat sich zum Ziel gesetzt, die Aufklärung der Funktion krebssrelevanter menschlicher Gene sowie deren biomedizinische Umsetzung voranzutreiben. Durch funktionelle systematische Genomforschung engagiert sich das Krebsnetz innerhalb des Nationalen Genomforschungsnetzes hinsichtlich der Prävention und Behandlung von drei gesundheitspolitisch und volkswirtschaftlich hochrelevanten Krebserkrankungen: Brustkrebs, Darmkrebs und Leukämie. Das Krebsnetz setzt sich dabei aus 31 Teilprojekten zusammen, welche

in einem interdisziplinären und interaktiven Zusammenschluss die Arbeitsschwerpunkte *Akute Leukämien* und *Funktionelle und therapierelevante Analyse krebssrelevanter Gene* bearbeiten. So werden wissenschaftliche Expertisen und Technologien gebündelt, um in enger Zusammenarbeit mit klinischen Zentren zu einer verbesserten Prävention und Behandlung dieser Krebserkrankungen zu gelangen. Das durch die Vernetzung im Krebsnetz erarbeitete Wissen über die molekularen Vorgänge in der Zelle wie auch im gesamten Organismus hat bereits zu entscheidenden Fortschritten im grundlegenden Verständnis von Krebserkrankungen beigetragen und zur Entwicklung darauf basierender therapeutischer und präventiver Interventionen geführt.

Eiweiße als erste Regulatoren

Nach Angaben des Robert Koch-Instituts erkranken in Deutschland jährlich rund 420 000 Menschen neu an Krebs, und im Jahr 2005 starben 211 400 an den Folgen dieser Erkrankung. Mit der Zunahme des Durchschnittsalters der Bevölkerung ist auch in Zukunft mit einem vermehrten Auftreten von Krebserkrankungen zu rechnen. Dies stellt nicht nur ein soziales, sondern ebenso ein gesundheitspolitisches Problem dar. Trotz guter Therapieerfolge aufgrund von Früherkennung und innovativer Behandlungsmethoden kommt es bei vielen Patienten mit fortgeschrittenen Karzinomen nach der Erstbehandlung zu einem Wiederauftreten des Tumors (Rezidiv), und oftmals treten Fernmetastasen und Therapieresistenzen auf. Obwohl die diesen Komplikationen

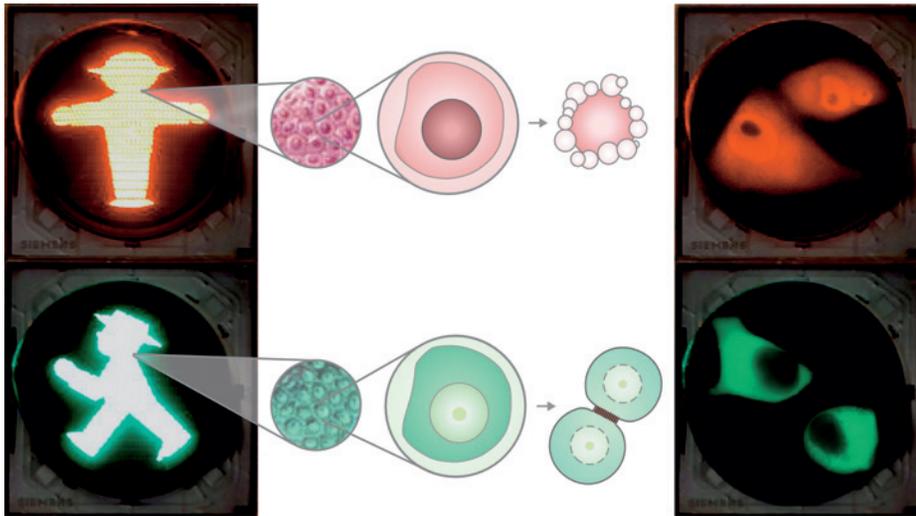


Abb. 1: Ortsabhängige Wirkung von Survivin in Krebszellen. Während zytoplasmatisches Survivin (grün) Krebszellen vor der Apoptose schützt und ihnen erlaubt, sich weiter zu teilen, signalisiert eine vermehrte Lokalisation von Survivin im Zellkern einen Stopp für Tumorzellen (rot). Es werden jeweils zwei Zellen gezeigt.

zugrunde liegenden vielfältigen molekularen Veränderungen noch nicht in ihrer Gesamtheit verstanden sind, konnten mithilfe der systematischen Genomforschung bereits erste regulatorische Eiweißstoffe und Mechanismen identifiziert werden, die mit der Krebsentstehung in Zusammenhang stehen.

Widerstände der Tumorzellen

Die Ergebnisse der Arbeiten mehrerer Forschergruppen des Krebsnetzes belegen eindeutig, dass Tumorzellen von Brust-, Darm- und Blutkrebspatienten Resistenzmechanismen zum Schutz gegen den durch Krebstherapien induzierten Zelltod entwickeln. Das beeinträchtigt den Behandlungserfolg drastisch und begünstigt die Metastasierung. In indikationsübergreifenden Studien konnte durch genomweite sogenannte Genchip-Analysen das Protein *Survivin* – abgeleitet vom englischen *survive* (überleben) – als eine Art „General-schlüssel“ identifiziert werden. Dieser wird von den Tumorzellen missbraucht, um sich gegen

jene Mechanismen zu schützen, die in der Zelle den programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen, sobald eine Schädigung erkannt wird. Vor allem wenn Survivin aus dem Zellkern hinaus ins Zytoplasma geschleust wird, ist der Krebs besonders aggressiv und widersteht der Therapie. Diejenigen Patienten, bei denen der Transport gestört ist, so dass das Survivin vorwiegend im Zellkern bleibt, haben bessere Überlebenschancen. Krebsforscher der Universität Mainz und des Max-Planck-Instituts in Martinsried suchen nun nach Substanzen, welche

einen Transportstopp für Survivin und bestimmte andere Eiweiße verhängen und somit als potenzielle Grundlage für neue Therapiestrategien dienen können (Abb. 1).

Von besonderer Bedeutung sind auch die Entdeckung und die molekulare Charakterisierung der Resistenzentwicklung von Leukämien gegenüber dem Kinase-Inhibitor Imatinib. Bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) befindet sich das *Abl*-Gen von Chromosom 9 durch Translokation in der Nachbarschaft zum *Bcr*-Gen auf Chromosom 22. Das dadurch neu entstandene *Bcr-Abl*-Gen kodiert für ein funktionsfähiges Protein mit Enzym-eigenschaften (*BcrAbl*-Kinase). Die Kinase aktiviert permanent einen Signalweg, der Zellwachstum und -teilung aktiviert, so dass sich die Zellen unkontrolliert vermehren.

Das Medikament Imatinib lagert sich in die ATP-Binderegion des Enzyms. Dadurch kann ATP nicht binden und *Bcr-Abl* ist inaktiv. In der fortgeschrittenen Phase der CML werden aber bei einem Teil der Patienten die Krebszellen resistent gegenüber Imatinib und wuchern wie zuvor. Wissenschaftler des Krebsnetzes konnten zeigen, dass die nach Imatinib-Gabe eintretende Resistenz auf unterschiedliche Mutationen in der *BcrAbl*-Kinase zurückzuführen ist. Diese Mutationen bewirken eine Strukturveränderung im *Bcr-Abl*-Protein und eine Verformung der Bindungsstelle für Imatinib. Die Bindung von Imatinib wird dadurch verhindert und

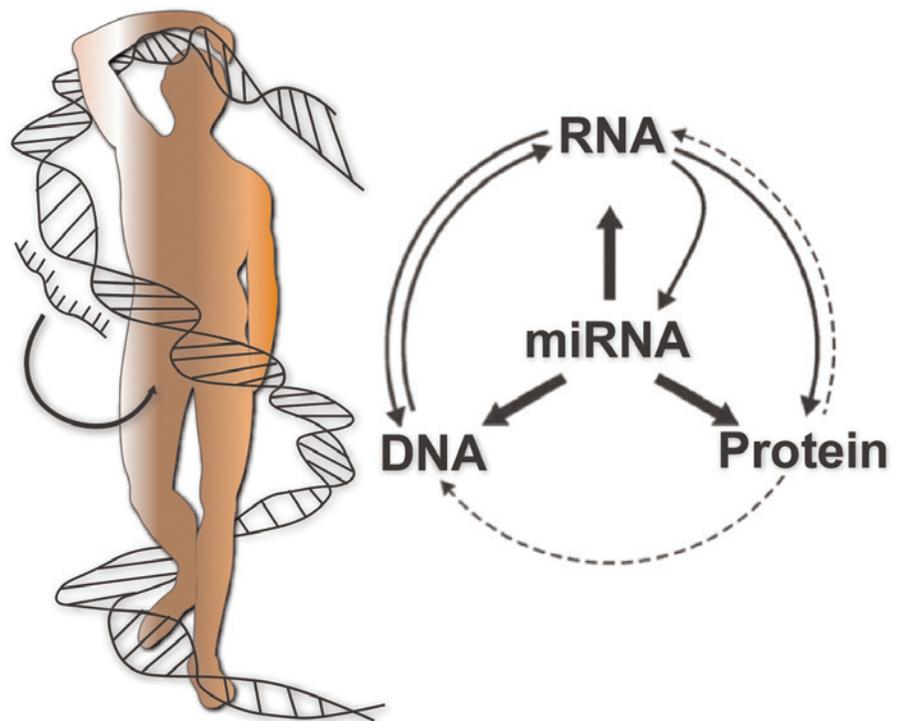


Abb. 2: miRNAs – kleine Moleküle mit großer Wirkung. Bei den meisten bekannten Regulatoren der Zellvermehrung handelt es sich um Proteine. Die in Form von DNA gespeicherte Erbinformation wird in RNA übersetzt, anhand derer Proteine gebildet werden. Die moderne Genomforschung zeigt jedoch, dass nicht alle RNAs zur Entfaltung ihrer Wirkung in Proteine übersetzt werden müssen. Die sogenannten micro- oder auch miRNAs können wichtige regulatorische Funktionen wahrnehmen und auch an Krebserkrankungen ursächlich beteiligt sein.

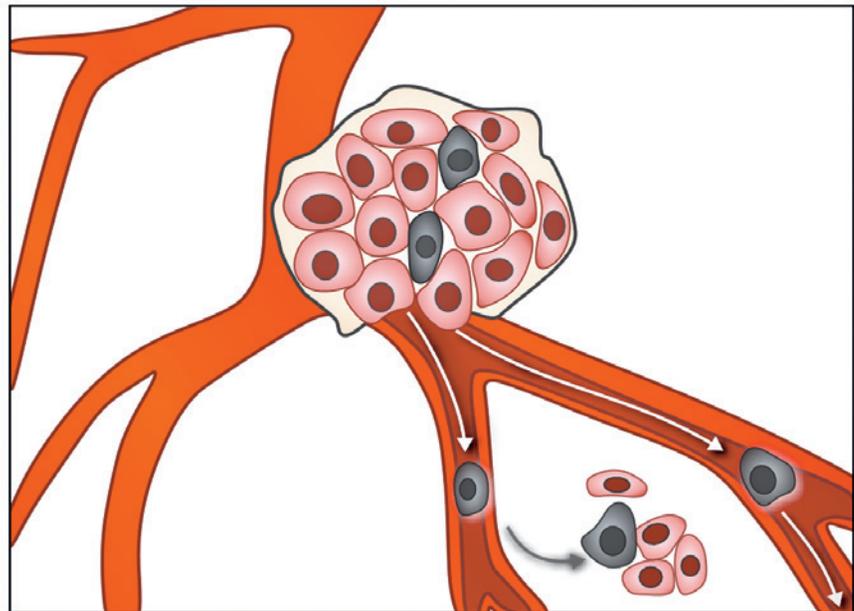
das Medikament verliert seine Wirkung. Die genaue Kenntnis dieser Mutationen ermöglicht nun die Therapie resistenter Tumorzellen mit einem Medikament der „zweiten Generation“.

Jetzt, nachdem man diese Zielstrukturen identifiziert hat und deren biologische Funktion kennt, kann man nach genetischen oder pharmakologischen Inhibitoren suchen, welche spezifische Eigenschaften dieser Faktoren blockieren und somit als Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Krebsmedikamente dienen (*from bench to bedside*).

Zellen aus dem Takt

Eine der Überraschungen bei der Sequenzierung des menschlichen Genoms im Rahmen des Humanen Genomprojektes war die Erkenntnis, dass das menschliche Genom nur zu einem geringen Prozentsatz für Proteine kodiert. Der überwiegende Teil des Genoms besteht aus sogenannter nicht-kodierender DNA, also Erbmateriale, welches nicht als „Blaupause“ für zelluläre Eiweiße dient. Dieses „Füllmaterial der Evolution“ scheint jedoch auch beim Menschen wichtige regulatorische Funktionen in Form kleiner nicht-kodierender RNAs auszuüben (Abb. 2). So vermutet man, dass bis zu 30 % aller menschlichen Gene durch diese microRNAs [miRNAs > Glossar] reguliert werden können. miRNAs sind somit auch für die Tumorentstehung und den Krankheitsverlauf anscheinend enorm wichtig. Wie bei den krebserrelevanten Proteinen kann man auch miRNAs in zwei Klassen unterteilen: die sogenannten Onco-miRs, also miRNAs, die – ähnlich den Onkogenen – das Tumorstadium vorantreiben, und die Tumorsuppressoren. Unterdrückt letztere microRNA ein Onkogen, kann auf diese Weise in der gesunden Zelle das Wachstum kontrolliert werden, die miRNA wirkt als Tumorsuppressor. Fällt diese Kontrolle jedoch aus, so wird die reife RNA des Onkogens nicht mehr reguliert, das Onkoprotein in zu großen Mengen gebildet und somit das Tumorstadium gefördert.

Um das Ausmaß der genomweiten Expression von miRNAs, deren kausale Beteiligung an der Krebserkrankung sowie deren Potenzial für die Krebsvorsorge systematisch beurteilen zu können, entwickelten Heidelberger Forschergruppen des Krebsnetzes eine neue Hochdurchsatztechnologie, den sogenannten miRNA-Genchip (*miChip*). Aktuelle Ergebnisse zufolge, welche mittels Anwendung dieses *miChip* gewonnen wurden, erfüllen miRNAs bedeutende Funktionen bei der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Zelltod von Blut-



Krebszelle



Krebsstammzelle

Abb. 3: Krebsstammzellen – das entscheidende Ziel der Tumorthherapie? Während die meisten Zellen eines Tumors nur in einer wohlbehüteten Umgebung wachsen können, ermöglicht eine spezialisierte molekulare Ausstattung Krebsstammzellen fernab vom Primärtumor Tochtergeschwülste zu bilden und Krebstherapien zu überleben.

Brust- und Darmkrebszellen. Für eine unmittelbare medizinische Anwendung ist die Bedeutung der microRNAs für die Krebsentstehung noch nicht gut untersucht, dennoch arbeiten Forschergruppen des Krebsnetzes bereits daran, das zukünftige therapeutische Potenzial dieser kleinen Regulatoren zu evaluieren.

„Böser Bruder“ eines Hoffnungsträgers

Um die für die Krankheitsentstehung verantwortlichen Mechanismen besser verstehen zu können, muss zunächst ein ganzheitliches Bild des molekularen Zusammenspiels der auf zellulärer Ebene ablaufenden Prozesse im menschlichen Körper gezeichnet werden. Bei ihren Bemühungen, diese wissenschaftlichen Einsichten zu vertiefen, sind die Forscher schon ein entscheidendes Stück vorangekommen. Die Entdeckung sogenannter Tumorstammzellen weckt bei Grundlagenforschern und Medizinern gleichermaßen neue Hoffnung, Krebs effektiver bekämpfen und den gefürchteten Metastasen Einhalt gebieten zu können. Krebstherapien zielen bislang vor allem darauf ab, so viele Tumorzellen wie möglich zu vernichten. Krebsstammzellen hingegen entgehen in vielen Fällen den gängigen Behandlungen, weil sie über besondere molekulare Eigen-

schaften verfügen. Im Gegensatz zu den normalen adulten Stammzellen, die dank ihres nahezu unerschöpflichen Potenzials zur Erneuerung und Differenzierung bei der Therapie degenerativer Krankheiten helfen könnten, sind diese Tumorstammzellen anscheinend hauptsächlich für die Resistenz gegenüber Krebstherapien und für die Metastasenbildung verantwortlich (Abb. 3). Obwohl Krebsgeschwüre Zellen ins Blut ausschwemmen können, die sich in anderen Geweben ansiedeln und dort neue Geschwüre bilden können, gelingt das Ansiedeln und Überleben nur wenigen spezialisierten Zellen. Wie Forscher an den Hochschulen und Universitätskliniken Erlangen, München und Freiburg herausfanden, sind diese Tumorstammzellen durch eine bestimmte molekulare Ausstattung charakterisiert, welche es ihnen ermöglicht, als „wandernde Tumorstammzellen“ Fernmetastasen weit ab vom Ort des Primärtumors zu etablieren. Die Krebsstammzellen würden hierbei nur einen vergleichsweise kleinen Teil der Geschwülste darstellen, wären aber für das Krebswachstum hauptverantwortlich. Angesichts dieser wichtigen Rolle hängt eine vollständige Heilung der Krebserkrankung vermutlich auch von der Eliminierung dieser Krebsstammzellen ab. Jedoch nicht nur bei soliden Tumoren wie Darm- und Brustkrebs, sondern auch bei Leukämien sind

Tumorstammzellen offensichtlich von entscheidender Bedeutung. In einem Mausmodell fanden Forscher an der Oberfläche der Leukämie-stammzellen bereits spezifische Eiweißstoffe, die bei gesunden, blutbildenden Stammzellen nicht vorkommen. Diese auch bei menschlichen Leukämiepatienten vorkommenden Strukturen könnten nun einen Ansatzpunkt für eine effektivere, zielgerichtete und schonende Therapie bieten, bei der zusätzlich zur Chemotherapie Antikörper eingesetzt werden, um sowohl die Tumorzellen als auch die Krebsstammzellen selektiv und dauerhaft zu vernichten.

Diese Art von indikationsübergreifenden Einsichten in die Tumorstammzellen ist ein exzellentes Beispiel für den patientenorientierten Erkenntnisgewinn, welcher in dieser Art von stark vernetzten interdisziplinären Forschungsnetzen wie dem NGFN Krebsnetz geleistet werden kann.

Es ist zu erwarten, dass im Rahmen zukünftiger Förderprogramme eine Umsetzung dieser und auch weiterer Forschungsergebnisse des

Krebsnetzes in den klinischen Alltag zum Wohle des Krebspatienten weiter vorangetrieben wird.

Literatur

- Brabletz, T. et al. (2005). *Opinion: migrating cancer stem cells – an integrated concept of malignant tumour progression*. *Nat Rev Cancer* 5, 744-749.
- Castoldi, M. et al. (2006). *A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA)*. *Rna* 12, 913-920.
- Deshpande, A.J. et al. (2006). *Acute myeloid leukemia is propagated by a leukemic stem cell with lymphoid characteristics in a mouse model of CALMLAF10-positive leukemia*. *Cancer Cell* 10, 363-374.
- Stauber, R.H. et al. (2007). *Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential*. *Cancer Res* 67, 5999-6002.
- Strebhardt, K., and Ullrich, A. (2006). *Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy*. *Nat Rev Cancer* 6, 321-330.
- von Bubnoff, N. et al. (2006). *Bcr-Abl resistance screening predicts a limited spectrum of point mutations to be associated with clinical resistance to the Abl kinase inhibitor nilotinib (AMN107)*. *Blood* 108, 1328-1333.

Kontakt

Prof. Dr. Roland H. Stauber
 Universitätsklinikum Mainz
 Molekulare und Zelluläre Onkologie
 Langenbeckstraße 1, 55131 Mainz
 E-Mail: rstauber@uni-mainz.de

Prof. Dr. Walter Birchmeier
 Max-Delbrück-Center für
 Molekulare Medizin (MDC)
 Robert-Roessle-Straße 10, 13125 Berlin
 E-Mail: wbirch@mdc-berlin.de

Prof. Dr. Christian Hagemeier
 Charité Berlin
 Pädiatrische Molekularbiologie
 Ziegelstraße 5-7, 10098 Berlin
 E-Mail: christian.hagemeier@charite.de

Bösartigem Kinder-Krebs Neuroblastom auf der Spur

Neue Biomarker für das klinische Management

Angelika Eggert und Manfred Schwab

Bösartige Krebserkrankungen treten in den ersten 15 Lebensjahren glücklicherweise selten auf und sind dank der großen Fortschritte in der Therapie meist gut behandelbar. Bei einzelnen Tumortypen gibt es jedoch keine erfolgversprechenden Therapieformen für fortgeschrittene Erkrankungsstadien. Hierzu zählt das Neuroblastom, das nach den Hirntumoren der häufigste Tumor im Kindesalter ist. Dieser Tumor kann überall dort auftreten, wo sich Vorläuferzellen normaler Nervenzellen befinden: am häufigsten in der Nebenniere und in der Neuralleiste entlang der Wirbelsäule. Obwohl lediglich 120-180 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland auftreten, handelt es sich um eines der interessantesten Forschungsgebiete im Bereich Onkologie, denn die Krankheit ist extrem variabel. Obwohl die Krebsart insgesamt eine schlechte Prognose hat, können Neuroblastome manchmal auch in gutartige Formen, sogenannte Ganglioneurome, ausreifen. Auch weist das Neu-

roblastom die höchste Spontanheilungsrate aller Tumoren auf, d. h. es kommt selbst bei metastasierten Formen ohne oder mit nur minimaler Therapie mitunter zur vollständigen Rückbildung des entarteten Gewebes.

Um das Phänomen Neuroblastom und seine biologischen Eigenschaften von allen Seiten mit modernsten Methoden zu untersuchen, haben sich deutschlandweit ausgewiesene Neuroblastom-Experten im Rahmen des NGFN zum GRANT-Netzwerk (German Research Association for Neuroblastoma-targeted Therapies) zusammengeschlossen. Es setzt sich aus Neuroblastom-Grundlagenforschern (Biologen, Biochemikern, Bioinformatikern) und klinischen Forschern, d. h. Ärzten mit großer Erfahrung in der Durchführung und Leitung klinischer Studien, zusammen. Diese ausgewogene Konstellation garantiert die direkte klinische Umsetzung von Forschungsergebnissen.

Verbesserung der Risikovorhersage

Das GRANT-Forschungsprogramm setzt innovative Hochdurchsatzmethoden der Genomik und Proteomik ein. Die Ergebnisse dieser komplexen Untersuchungen konnten für zwei wesentliche Ziele genutzt werden: Einerseits wurden die Funktionen wichtiger Gene und Proteine für die biologischen Eigenschaften des Neuroblastoms erforscht, um diese Erkenntnisse bei der Therapieentwicklung einsetzen zu können. Andererseits sollten die Ergebnisse ermöglichen, das individuelle Rückfallrisiko der Neuroblastompatienten präzise vorausszusagen, um jeweils die Therapie optimal an die Erkrankung anpassen zu können.

Mithilfe von Genexpressionsanalysen konnte das GRANT-Forscherteam zeigen, dass es zahlreiche Gene gibt, deren Aktivität charakteristisch für den Verlauf einer Krankheit ist. Diese Genaktivitätsmuster (Gensignaturen) korrelieren entwe-

der mit den aggressiven Eigenschaften fortgeschrittener Neuroblastome oder mit den biologisch günstigen Eigenschaften sich spontan zurückbildender Neuroblastome. Zusätzlich wurden Genexpressionsmuster identifiziert, die eine präzise Vorhersage des Rückfallrisikos beim Neuroblastom erlauben. Dadurch ist es möglich, mit einer fast 90-prozentigen Genauigkeit zu prognostizieren, wie sich der Tumor entwickeln wird. Das ist deutlich zuverlässiger als andere bisher angewendeten Methoden zur Klassifizierung von Neuroblastomen.

Neue Ziele für Therapien

Die Analyse von Genexpressionsdaten ergab, dass vor allem Gene aus den Genfamilien für zelluläre Stressantwort und Proteinabbau bei der Entstehung der Neuroblastome eine wichtige Rolle spielen. Die Proteine, die von diesen Genen kodiert werden, sind vielversprechende Ansatzpunkte für eine Therapie, denn es gibt bereits seit einigen Jahren Medikamente, welche die entsprechenden Proteine und ihre Wirkungsmechanismen in der Zelle blockieren. Erste Untersuchungen haben die Wirksamkeit dieser Medikamente nun auch in Neuroblastommodellen nachgewiesen.

Weitere Analysen zeigten, dass zellzyklusregulierende Gene des sogenannten RB-Signalwegs die Entstehung von aggressiven Neuroblastomen beeinflussen. Diese Gene werden über das Onkogen *MYCN* aktiviert und dereguliert und eignen sich ebenfalls als neue Therapieziele.

Zusätzlich wurden zehn Kandidatengene identifiziert, die für das schnelle Wachstum bestimmter Neuroblastome verantwortlich sind. Von diesen Kandidatengenen eignet sich insbesondere die Aurora-Kinase A als Ansatzpunkt für eine Therapie, da für dieses Molekül bereits Inhibitoren auf dem Markt sind.

Die Heidelberger Netzwerkpartner testeten siRNAs (small interfering RNAs [[> Glossar](#)]) gegen 100 Kandidatengene. siRNAs können durch Bindung an spezifische Boten-RNAs deren Abbau auslösen und auf diese Weise die Produktion der Proteine verringern, die von den Boten-RNAs kodiert werden. In Zellkulturversuchen bewirkte die Zugabe der getesteten siRNAs eine Differenzierung (d. h. Ausreifung) der Neuroblastomzellen zu gutartigen Zellen. Außerdem konnten neue Tumorstoffe aus der Gruppe der Histondeacetylase-Inhibitoren identifiziert und patentiert werden, deren Potenzial als neue Neuroblastommedikamente derzeit in Zellkultur- und Mausmodellen getestet wird. Erste Ergebnisse sprechen dafür, dass diese Histondeacetylase-Inhibitoren

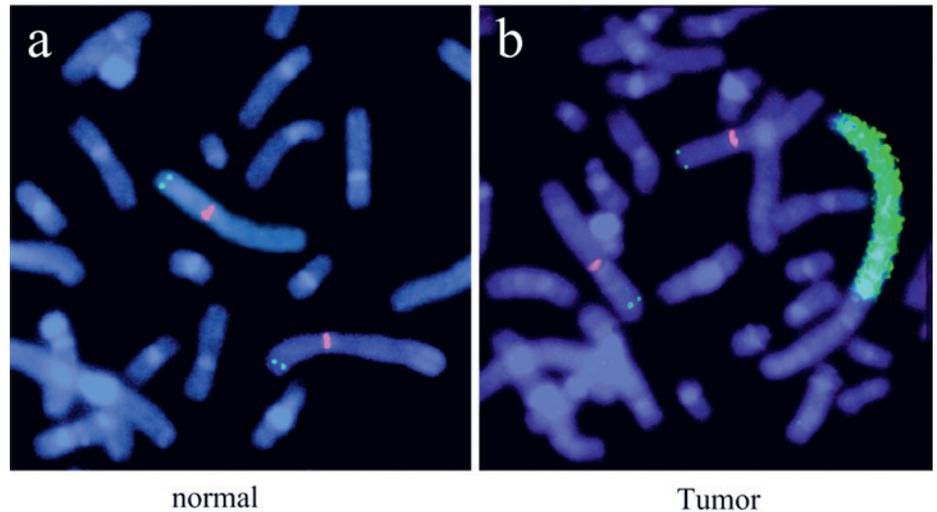


Abb. 1: Vervielfältigtes *MYCN*-Gen als klinisch eingesetzter Biomarker beim Neuroblastom. Mikroskopische Fluoreszenzanalyse nach chromosomaler Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH). Die Chromosomen sind blau angefärbt.

a. normale Zelle; grün, normale Lokalisation des *MYCN*-Gens; violett, Zentromer-Region des Chromosom 2
 b. Zelle des Neuroblastoms. Die Signale entsprechen denen in einer normalen Zelle. Zusätzlich erscheint ein grün fluoreszierender Block in einem anderen Chromosom, welcher die Vermehrung (Amplifikation) des *MYCN*-Gens anzeigt. Die Intensität des Signals, im Vergleich zum normalen Signal, ist ein Maß für die Anzahl vermehrter Genkopien. Die *MYCN*-Kopiezahl ist ein Biomarker, der zur Therapieoptimierung des Neuroblastoms eingesetzt werden kann.

den Tumor wirksam bekämpfen und keine Nebenwirkungen auf normale Zellen haben.

Über die Genomebene hinaus

Weitere Teile des GRANT-Forschungsprogramms gingen über Untersuchungen auf Genebene hinaus, um möglichst viele Puzzleteile der Neuroblastombiologie zu einem Gesamtbild zusammensetzen zu können. So wurde die Proteinzusammensetzung des Bluteserums bei gesunden und bei tumorkranken Kindern verglichen. In dieser Studie wurden einzelne krankheitsrelevante Proteine identifiziert, die derzeit auf Therapie-tauglichkeit untersucht werden.

Auch die epigenetische Programmierung im Genom von Neuroblastomen wurde untersucht. Epigenetische Mechanismen regulieren den Aktivitätszustand von Genen. Dabei spielt die Methylierung der Cytosin-Basen eine wesentliche Rolle. Spezifische Enzyme – die Methyltransferasen – übertragen Methylgruppen auf die Cytosin-Basen der DNA. Das Methylierungsmuster kann mithilfe von Methylierungschips untersucht werden. Durch solche Studien konnten typische epigenetische Signaturen an therapieresistenten Neuroblastomzellen nachgewiesen werden. Die übermäßige Methylierung bestimmter Gene wie *ZFP37* scheint die Tumorzellen vor einem Angriff durch Chemotherapie zu schützen. Solche bislang unbekannt, übermäßig methylierte Gene sind mög-

licherweise Tumorsuppressorgene. Die Häufung von methylierten Cytosin-Basen führt dazu, dass die betroffenen Gene stillgelegt werden und trägt in diesem Fall zur Entstehung der Therapieresistenz bei Neuroblastomen bei.

Brüche im menschlichen Genom

„Fragil“ übersetzt man aus dem Lateinischen mit „zerbrechlich“. Dieses Adjektiv trifft auch auf bestimmte Regionen der menschlichen Chromosomen zu, an denen auffällig häufig Brüche auftreten – sogenannte common Fragile Sites (cFS). Die Gesamtheit aller cFS auf den Chromosomen einer Zelle wird als FRAGILOM bezeichnet.

Das menschliche Genom besitzt etwa 120 solcher Stellen, bei denen das betreffende Chromosom ein vorherbestimmtes Risiko zum Bruch besitzt. Durch den Chromosomenbruch wird die Struktur der DNA lokal zerstört und Gene, die sich an den Bruchstellen befinden, werden geschädigt. Zwar können die meisten zelleigenen Systeme Brüche wieder reparieren, es kann jedoch auch zur Fehlreparatur und bleibenden Genschäden kommen, die bei der Zellteilung weitergegeben werden und zur Tumorentwicklung beitragen können. Das Muster solcher Schädigungen ist patientenspezifisch. Da durch die Genschädigung oft auch zentrale biologische Eigenschaften der Zelle verändert werden, ist es im Hinblick auf eine

maßgeschneiderte Therapie wichtig, die wesentlichen genetischen Veränderungen der Tumorzellen zu kennen.

Die Untersuchung des FRAGILOMs bildet daher einen neuen Schwerpunkt der Neuroblastomforschung im NGFN. Im Rahmen dieses Projektes konnte gezeigt werden, dass die Vervielfältigung des *MYCN*-Gens mit einer cFS auf dem Chromosom 2 (*FRA2C*) zusammenhängt. Das *MYCN*-Gen steuert sowohl die Zellvermehrung als auch den Zelltod und spielt eine entscheidende Rolle bei der Risikobeurteilung. Patienten, die übermäßig viele Kopien des *MYCN*-Onkogens in ihrem Erbgut tragen, haben eine deutlich schlechtere Prognose als Patienten ohne diese genetische Veränderung (Abb.1).

Da das *MYCN*-Gen lediglich für eine begrenzte Zahl von Neuroblastomen bestimmter Stadien informativ ist, ist es wichtig, zusätzliche Biomarker zu identifizieren. Die Tatsache, dass man oft sowohl eine cFS als auch eine ungewöhnlich hohe Anzahl von *MYCN*-Genkopien auf dem Chromosom 2 vorfindet, beweist, dass es möglich ist, solche Biomarker mithilfe der FRAGILOM-Analyse zu finden.

Zusätzlich zur Vervielfältigung des *MYCN*-Gens treten bei Neuroblastomzellen viele andere chromosomale Veränderungen auf, die bisher meistens mithilfe von mikroskopischen Untersuchungen der Chromosomen identifiziert wurden. Neuere Analysen haben ergeben, dass sich viele Chromosomenveränderungen in der Nähe von cFS befinden, so dass vermutlich ein Zusammenhang zwischen den zusätzlichen Chromosomenveränderungen und der jeweils in der Nähe liegenden cFS besteht. Die Charakterisierung der betreffenden cFS DNA-Sequenz könnte daher zur Identifizierung von Markern bzw. Genen der Chromosomenschädigung führen, die dann einerseits auf ihre Rolle bei der Entstehung des Neuroblastoms untersucht und andererseits auf ihren möglichen klinischen Nutzen als Biomarker evaluiert werden können.

Neuland in der Forschung

Mit der molekularen Charakterisierung von DNA-Sequenzen, die durch cFS-Aktivierung geschädigt werden, wurde Neuland betreten. Zu Beginn des Vorhabens war bei lediglich zwei der etwa 120 cFS des Menschen die Gensequenz bekannt. Das erste Ziel des Neuroblastom-FRAGILOM-Projektes bestand deshalb darin, die Gensequenzen einer möglichst hohen Anzahl von cFS zu identifizieren. Nachdem eine geeignete Technologie ausgearbeitet wurde, sind inzwischen die Gensequenzen von etwa 15 cFS bekannt.

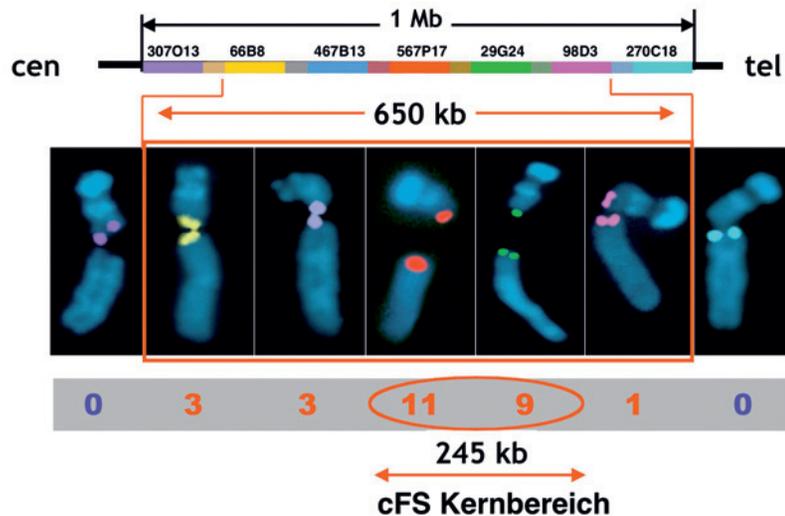


Abb. 2: Chromosomale Kartierung eines cFS-Gens durch Mehrfarben FISH am Beispiel von *FRA13A*. Zunächst wird in kultivierten humanen Zellen durch Hemmung der DNA-Synthese ein Chromosomenbruch an der cFS ausgelöst. Dann werden sechs farblich unterschiedlich markierte DNA-Proben mit verschiedenen Sequenzen aus der vermuteten cFS an das Chromosom hybridisiert. Die Auswertung im Fluoreszenzmikroskop zeigt die Orte, an denen die jeweilige Probe bindet. Die Probe im Bild ganz links (violett) bindet an die obere (zentromere) Seite der cFS, die Probe ganz rechts bindet an die untere (telomere) Seite. Beide ergeben jeweils nur ein einziges Signal. Alle Proben dazwischen erkennen die cFS, sie erscheinen als zwei durch den cFS Bruch getrennte Signale. Bei der Analyse von Chromosomen aus unterschiedlichen Zellen wird dabei die größte Häufigkeit mit der rot markierten Probe (Mitte), die zweitgrößte Häufigkeit mit der rechts daneben liegenden grün markierten Probe beobachtet. Hier liegt offenbar der Kernbereich der Brüche von *FRA13A* in unterschiedlichen Zellen. Offensichtlich ist auch, dass die cFS in unterschiedlichen Zellen nicht an exakt derselben Stelle bricht, sondern die Brüche vielmehr über einen Bereich von etwa 650 kbp stattfinden.

Als geeigneter technischer Ansatz zur molekularen Identifizierung von cFS DNA-Sequenzen hat sich eine Kombination von chromosomaler Fluoreszenz-*In-Situ*-Hybridisierung (FISH) mit DNA-Datenbankanalysen herauskristallisiert. Hierbei wird die chromosomale Region der cFS durch den Einsatz von molekularen DNA-Proben mit definierter DNA-Sequenz zunächst eingeeengt. Sechs farblich unterschiedlich markierte Proben binden (hybridisieren) gleichzeitig an bestimmten Stellen der cFS Region des Chromosoms. Über ein Fluoreszenzmikroskop wird ausgewertet, wo sich die Proben auf dem betreffenden Chromosom in Bezug zur cFS befinden (Abb. 2). Das Ziel dabei ist es, eine solche FISH Probe zu identifizieren, die direkt an die cFS DNA-Sequenz bindet. Diese Probe führt dann nicht nur zu einem einzelnen Fluoreszenzsignal, sondern – wegen des cFS-Bruchs – zu zwei getrennten Signalen. Da die DNA-Sequenz der eingesetzten Proben bekannt ist, kann dann die molekulare Identität der cFS DNA über die Suche in der humanen Genomdatenbank bestimmt werden. Vor allem kann geprüft werden, ob durch den Bruch einer bestimmten cFS ein Gen geschädigt wurde. Das experimentelle Vorgehen ist detailliert am Beispiel der molekularen Charakterisierung von *FRA13A* dar-

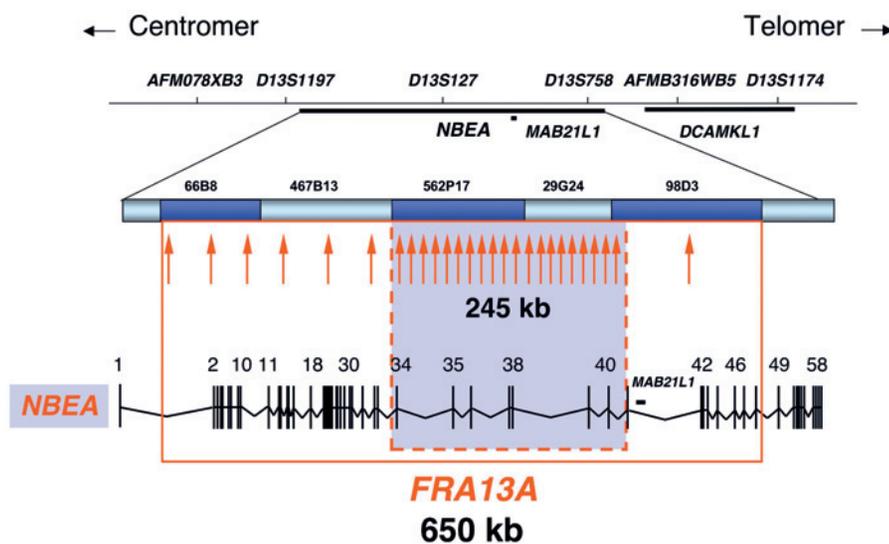
gestellt, durch deren Aktivierung das Gen neurobeachin (*NBEA*) geschädigt wird (Abb.3).

Erste Ergebnisse dieser Untersuchungen weisen darauf hin, dass die cFS nicht nur bei schweren Erkrankungen, sondern auch bei nicht-bösartigen Erkrankungssyndromen eine Rolle spielen könnten. Zum Beispiel wird das *NBEA*-Gen, ein Kandidatengen für den Autismus, durch die Aktivierung der cFS *FRAA13A* geschädigt. Auch im neurexin Gen (*NRXN3*), das eine essenzielle Rolle bei der Neurotransmission spielt, wurde eine cFS gefunden. Die Fehlfunktion dieses und weiterer in diesem Kontext gefundener Gene steht in Verbindung mit gravierenden neurologischen Erkrankungen.

Die weitere molekulare Charakterisierung von cFS Genen und eine möglichst vollständige Entzifferung des Repertoires humaner cFS stehen außerdem im Mittelpunkt des FRAGILOM-Projektes.

Modell aus genomischen Daten

Die Arbeitsgruppe von Roland Eils, DKFZ Heidelberg, entwickelte für das GRANT-Konsortium die zentrale Datenbank iCHIP, mit deren Hilfe komplexe bioinformatische übergeordnete Analysen (Metaanalysen) über die Grenzen einzelner



Literatur

- Oberthür, A. et al. 2006. Customized oligonucleotide microarray gene expression-based classification of neuroblastoma patients outperforms current clinical risk stratification. *J Clin Oncol.*; 24:5070-8.
- Schramm, A. et al. (2005) Prediction of clinical outcome and biological characterization of neuroblastoma by expression profiling. *Oncogene* 24:7902-7912.
- Westermann, F. et al. High Skp2 expression characterizes high-risk neuroblastomas independent of MYCN status. *Clin Cancer Res.* 2007, 13:4695-703.
- Sitek, B. et al. Identification of dynamic proteome changes upon ligand-activation of Trk-receptors using two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2005, 18.
- Schwab, M. (Ed). Fragilome-common fragile sites, genomic instability and cancer. *Cancer Letters* 2006, 232, 1-122.

Kontakt

Prof. Dr. Angelika Eggert
 Universitätsklinikum Essen
 Pädiatrisch-Onkologische Forschung
 Hufelandstraße 55, 45122 Essen
 E-Mail: angelika.eggert@uk-essen.de

Prof. Dr. Manfred Schwab
 Deutsches Krebsforschungszentrum
 Heidelberg
 Abteilung Tumorgenetik
 Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg
 E-Mail: m.schwab@dkfz-heidelberg.de

Abb. 3: Oben: Kartenausschnitt des Chromosoms 13. Mitte und unten: Die durch FRA13A verursachten DNA-Brüche kartieren innerhalb des neurobeachin (NBEA) Gens. Da die DNA-Sequenz der für die FISH (Abb.2) eingesetzten Proben bekannt ist, kann über Analysen der humanen Genom-Datenbank die molekulare Identität der FRA13A Bruchsequenzen ermittelt werden. Der Kernbereich der cFS Brüche ist über eine DNA-Sequenz von etwa 245 kbp innerhalb des NBEA-Gens lokalisiert. Der gesamte Bruchbereich erstreckt sich über 650 kbp, in allen Fällen ist das NBEA-Gen betroffen.

technologischer Plattformen hinaus möglich sind. Auf der Basis der erhobenen Daten und unter Einbeziehung des Modells klonaler Krebsentstehung sowie mathematisch überprüfbarer Vererbungsregeln wurde ein Modell der Neuroblastomentwicklung erstellt, das sowohl mit dem klinischen Verhalten der Tumoren als auch mit empirischen Modellen übereinstimmt.

Durch die Verbindung von molekularen Daten mit klinischen Datenbanken zeichnet sich am Horizont das Bild eines noch besseren Versorgungsmanagements, spezifischerer Diagnose- und Therapieformen und besserer Chancen für Kinder mit soliden Tumoren – speziell dem Neuroblastom – ab.

Hirntumoren als große Herausforderung

Forschung im Hirntumor-Netzwerk des NGFN

Otmar D. Wiestler

Geht eine Krebserkrankung von einem der verschiedenen Zelltypen des Gehirns aus, so spricht der Arzt von einem primären Hirntumor. Damit grenzt er die Erkrankung von den häufiger vorkommenden Hirnmetastasen – den Absiedelungen von Tumoren anderer Organe, die bis ins Gehirn vorgedrungen sind – ab.

Das menschliche Gehirn ist ein komplexes Organ, das aus vielen verschiedenen Zellarten aufgebaut ist. Primäre Hirntumoren können aus den meisten dieser Zelltypen entstehen. Etwa die Hälfte der primären Hirntumoren gehört zur Gruppe der Gliome, die ihren Ursprung in Zellen der Neuroglia haben. Zur Neuroglia zählen die Zellen,

die als Stützgerüst der Nervenzellen (Neuronen) dienen und sie elektrisch voneinander isolieren. Außerdem regeln sie den Stofftransport innerhalb des Gehirns.

Zu den Gliomen rechnet man hauptsächlich die Astrozytome, die Oligodendrogliome sowie die Ependymome, die aus Astrozyten, Oligodendrozyten bzw. Ependymzellen entstehen.

Hirntumoren als Herausforderung

Mit jährlich rund 8 000 Neuerkrankungen in Deutschland sind primäre Hirntumoren eher selten. Sie machen nur etwa zwei Prozent aller

Krebserkrankungen aus. Trotzdem stellen sie eine große Herausforderung für die onkologische Forschung dar: Viele Gliome sind in ihrem Wachstum nur sehr schlecht vom umgebenden gesunden Hirngewebe abzugrenzen. Einzelne Tumorzellen wandern in benachbartes Gewebe ein, so dass selbst in Fällen, in denen eine chirurgische Entfernung der Geschwulst möglich ist, der Tumor nicht vollständig beseitigt werden kann. Die wandernden Zellen bilden gleichsam den Keim für ein Wiederauftreten des Tumors, ein Rezidiv. Dies gilt besonders für den häufigsten und zudem aggressivsten unter den primären Hirntumoren, das Glioblastom.

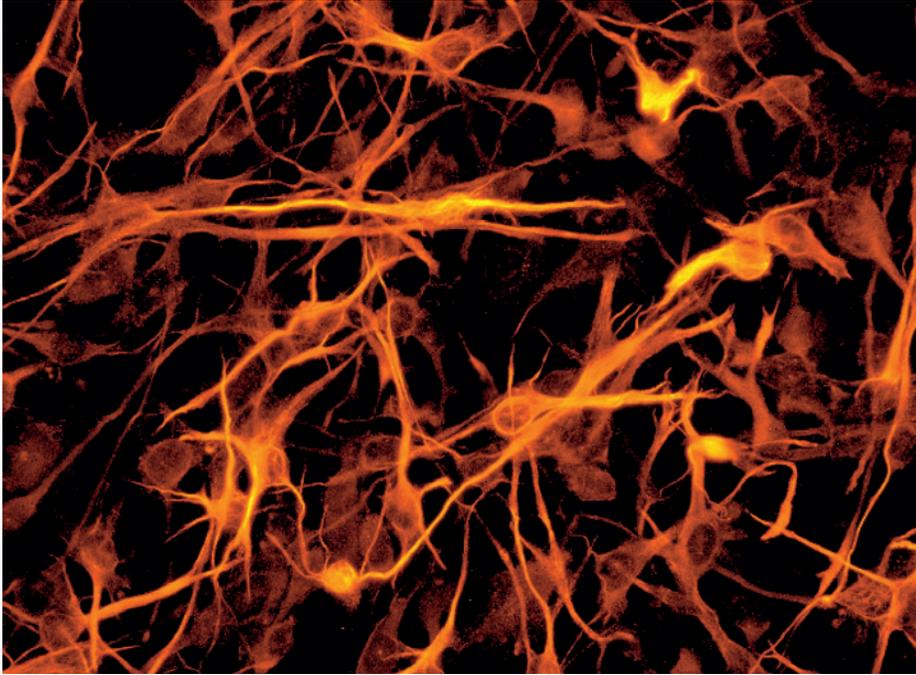


Abb. 1: Immunfluoreszenzfärbung des Wachstumsfaktors VEGF in der Glioblastom-Zelllinie U373.

Quelle: Dr. Nicola Holtkamp, Charité Berlin, Institut für Neuropathologie

Die Folgen dieser Erkrankung sind schwerwiegend, und besonders im Falle des Glioblastoms und anderer höhergradiger Gliome gibt es nur sehr unzureichende Behandlungsmöglichkeiten. Um die Krankheitsmechanismen zu identifizieren und die Diagnose, Verlaufsbeurteilung und Therapie primärer Hirntumoren weiter zu verbessern, analysierten die im Brain Tumor Network vernetzten Arbeitsgruppen systematisch das Tumorerbgut auf allen denkbaren molekularen Ebenen. So wird etwa bei verschiedenen Hirntumoren untersucht, ob bestimmte Bereiche der DNA vervielfältigt oder verlorengegangen sind (genomische Aberrationen), welche Abschnitte durch Methylierung stillgelegt sind (Epigenetik), welche Gene in RNA umgeschrieben (Transkription) und welche RNAs in Proteine übersetzt (Proteom) werden. Auch die Gene für regulatorische MikroRNAs werden systematisch unter die Lupe genommen. Da Sauerstoffmangel (Hypoxie) ein charakteristischer Zustand für viele Hirntumoren ist, untersuchen Projektgruppen des Netzwerks, ob hypoxische Bedingungen eine Veränderung in der Proteinzusammensetzung der Tumorzellen bewirken. Eine zentrale Rolle innerhalb des Brain Tumor Networks nimmt die Glioma Core Collection ein. Es handelt sich hierbei um eine Sammlung, die inzwischen rund 140 Tumorgewebeprobe umfasst, die mit den modernsten genomischen Hochdurchsatz-Analyseverfahren systematisch und umfassend untersucht werden.

Die enormen Datenmengen, die aus diesen

Untersuchungen resultieren, werden mit eigens entwickelten leistungsfähigen bioinformatischen und biostatistischen Verfahren ausgewertet. Der Ansatz, all diese Prozesse auf verschiedenen molekularen Ebenen zu einem geschlossenen Gesamtbild zu integrieren, entspricht der Methodik der Systembiologie.

Charakteristischer DNA-Verlust

Mehrere Arbeitsgruppen des Netzwerks konzentrierten sich auf die Gruppe der Tumoren der Oligodendroglia. Diese Gruppe umfasst die Oligodendrogliome sowie gemischte Oligoastrozytome und macht etwa 18 Prozent aller Gliome aus. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) klassifiziert diese Gruppe der Tumoren in Grad II- und Grad III-Oligodendrogliome. Bis zu 80 Prozent der WHO-Grad II- und III-Oligodendrogliome und rund 50 Prozent der Oligoastrozytome weisen eine molekulargenetische Besonderheit auf, die bereits 1994 beschrieben wurde: Es fehlen bestimmte DNA-Bereiche im langen Arm (q) von Chromosom 19 und im kurzen Arm (p) von Chromosom 1. Ursache für diesen kombinierten Verlust ist wahrscheinlich eine Translokation. Dabei verbindet sich einer der beiden kurzen Arme von Chromosom 19 (19p) mit einem der beiden langen Arme von Chromosom 1 (1q), während die beiden anderen Arme der Chromosomen 1 und 19 fehlen. Bemerkenswert ist, dass diese kombinierte Deletion mit einem längeren Überleben assoziiert

werden kann, da die Tumoren mit der 1p/19q-Deletion besser auf Chemo- und Strahlentherapie ansprechen. Daher ist es möglich, dass hier nicht ein klassischer Verlust von Tumorsuppressoren vorliegt, sondern eher ein Ausfall von Genen, deren Produkte an DNA-Reparatur oder Resistenzmechanismen beteiligt sind.

CITED4 als prognostischer Marker

Wissenschaftler des Deutschen Krebsforschungszentrums, der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf sowie der Charité in Berlin analysierten die Aktivität der Gene, die sich im minimal-überlappenden Kernbereich der Deletionen, und zwar den Chromosomenregionen 1p36.13-31 sowie 19q13.2-33, befinden. Dabei gelang es den NGFN-Forschern, acht Gene zu identifizieren, die in Tumoren mit 1p/19q-Deletion deutlich schwächer exprimiert werden als in Oligodendrogliomen, bei denen dieser Bereich nicht fehlt.

In enger Nachbarschaft zu diesem Kernbereich, auf 1p34.2, fiel das Gen *CITED4* durch signifikant schwächere Expression in Tumoren mit 1p/19q-Deletion auf. In Oligodendrogliomen, bei denen eine *CITED4*-Genkopie aufgrund der 1p/19q-Deletion fehlt, ist die verbleibende Genkopie durch Hypermethylierung stillgelegt. Derzeit laufen funktionelle Untersuchungen, um herauszufinden, inwieweit eine *CITED4*-Inaktivierung die Strahlungs- und Chemosensitivität von Tumoren beeinflusst. Die Expression von *CITED4* ist der beste derzeit verfügbare prognostische Marker bei WHO-Grad II- und III-Oligodendrogliomen. Dieser Zusammenhang soll in weiteren funktionellen Studien bestätigt werden, unter anderem an einem Mausmodell, bei dem das *CITED4*-Gen ausgeschaltet ist.

Auch das Gen *EMP* auf Chromosom 19 im Bereich 19q13.3 zeigt starke Expressionsunterschiede zwischen Oligodendrogliomen mit und ohne 1p/19q-Deletion. Ebenso wie bei *CITED4* ist die verringerte Expression einer Hypermethylierung der zweiten Kopie des Gens zuzuschreiben. Die *EMP*-Hypermethylierung wurde auch in 80 Prozent einer bestimmten Klasse von Gehirntumoren, den anaplastischen Astrozytomen, gefunden, hier jedoch unabhängig von einer 19q-Deletion.

Dass der Verlust genetischen Materials in 1p/19q nicht der einzige molekularbiologische Marker ist, der Einfluss auf die Prognose von Patienten mit Oligodendrogliomen hat, wiesen Kooperationspartner aus Bonn und Düsseldorf nach. Sie untersuchten Tumoren von 70 Patien-

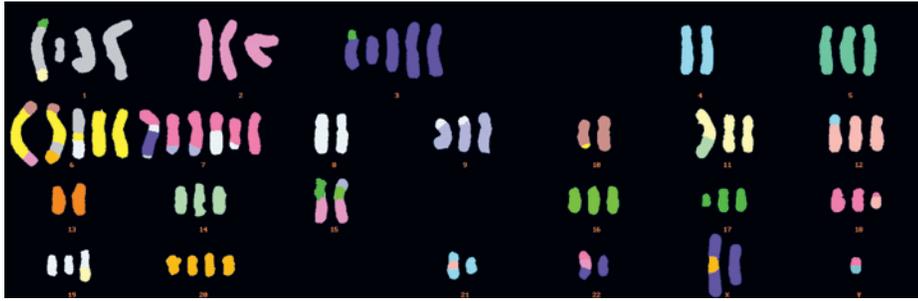


Abb. 2: 24-Farben-Karyogramm der Glioblastom Zelllinie LN-428. Fast alle Chromosomen weisen Umlagerungen und Abweichungen von der normalen Kopienzahl auf. Quelle: Prof. Dr. Ruthild Weber, Institut für Humangenetik, Universität Bonn.

ten und korrelierten die Daten mit dem Überleben der Patienten. Dabei zeigte sich, dass Zugewinne auf Chromosom 7, 8q, 19q und 20 sowie Verlust auf 9p, 10, 18q und auf Xp mit einer eher ungünstigen Prognose einhergehen. Bei Patienten, die diese chromosomalen Veränderungen aufweisen, ist die mittlere Überlebenszeit um 50 bis 100 Monate verringert, wobei der Zugewinn auf Chromosom 7 mit einer besonders ungünstigen Prognose verbunden ist. Die Ergebnisse zeigen, dass Ärzte und Wissenschaftler bei der molekulargenetischen Diagnostik der Oligodendrogliome nicht nur die genetischen Veränderungen der chromosomalen Regionen 1p/19q, sondern auch weitere Parameter einbeziehen sollten.

Zuverlässige Marker für Kinder

Bei Kindern machen solide Tumoren knapp über die Hälfte aller Krebserkrankungen aus. Mit 38 Prozent stellen Tumoren des zentralen Nervensystems den größten Anteil daran. Das bösartige Medulloblastom, das aus extrem unreifen Zellen des Kleinhirns hervorgeht, wird fast ausschließlich im Kindesalter und nur sehr selten bei jungen Erwachsenen diagnostiziert. Es ist der zweithäufigste unter den kindlichen Hirntumoren.

Wenn Kinder an Krebs erkranken, sind zuverlässige prognostische Marker entscheidend, um möglicherweise unnötige Chemo- oder Strahlentherapie zu vermeiden, die bei den kleinen Patienten gefährliche Spätfolgen nach sich ziehen können. Auf die molekulargenetische Analyse von Hirntumoren des Kindesalters haben sich Projektgruppen aus dem Deutschen Krebsforschungszentrum konzentriert. In einer Studie untersuchten sie bei Medulloblastomen, ob bestimmte chromosomale Bereiche fehlen oder vervielfältigt wurden. Die Wissenschaftler konnten zeigen, dass der Schweregrad der

Krankheit von der Aktivität bestimmter Gene abhängt, wobei die Überexpression der cyclin-abhängigen Kinase 1 (CDK1) am deutlichsten mit einer ungünstigen Prognose korrelierte. Da die CDK1-Expression immunhistochemisch gut nachweisbar ist, ist das Enzym ein vielversprechender Kandidat für einen Einsatz in der klinischen Routinediagnostik.

Bei rund 40 Prozent aller Medulloblastome liegt eine charakteristische Umlagerung des Chromosoms 17 vor (Isochromosom 17q). Die Bruchstelle für diese Umlagerung liegt im langen Arm des Chromosoms (17q11.2). NGFN-Forscher identifizierten zwei verschiedene Regionen, auf die sich die Strangbrüche konzentrieren. Beide enthalten aber keine kodierenden DNA-Bereiche. Daher scheinen die Effekte von Isochromosom 17q eher auf einer Veränderung der Aktivität eines Gens im Bereich der Bruchstellen zu beruhen als auf der Zerstörung eines entscheidenden Tumorsuppressorgens.

Einfache Analysen

Die Methylierung der DNA, also das Anhängen von Methylgruppen an bestimmte DNA-Bereiche, ist an der Steuerung der Aktivität der Gene entscheidend beteiligt. Durch eine fehlerhafte Methylierung wird das Ablesen der Erbinformation in Zellen behindert, was zur Entstehung von Krebs führen kann.

Eine Untersuchung an 20 Medulloblastomen ergab erste Hinweise, dass eine gesteigerte Promotermethylierung und die daraus resultierende Drosselung der Aktivität bestimmter Gene mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist. Die deutlichsten Unterschiede im Grad der Methylierung und folglich bei der Expression wurden für das Gen des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors ZIC2 gefunden, der bei der Maus unter anderem an der Steuerung der Entwicklung des Zentralnervensystems beteiligt

ist. Bei diesen Untersuchungen wurde erstmals ein neu entwickelter Test eingesetzt, mit dem der Methylierungsstatus der DNA deutlich einfacher analysiert werden kann als mit bisher üblichen Verfahren.

Ependymome entstehen aus der Zellschicht, die die Hirnkammern und den zentralen Kanal des Rückenmarks auskleidet. Die zu den Gliomen zählende Erkrankung kann auch bei Erwachsenen auftreten, betrifft aber bevorzugt das Kindesalter. Die Heidelberger Netzwerkpartner untersuchten 68 Tumoren auf genomische Abweichungen. Eines der auffälligsten Ergebnisse dieser Analyse war, dass ein bestimmter Bereich des Gens für den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) vervielfältigt vorlag. Die hohe Kopienzahl dieses Bereiches führt zu einer starken Überexpression des Proteins, die immunhistochemisch nachweisbar ist und auf einen ungünstigen Verlauf der Erkrankung hinweist.

Zusammenfassung

Die Ergebnisse, die die Mitglieder des Brain Tumor Networks erzielt haben, sind wichtige Schritte auf dem Weg von der Grundlagenforschung hin zur klinischen Anwendung. In mehreren der Studien wurden genetische Marker entdeckt, auf die nun die Entwicklung neuer diagnostischer oder therapeutischer Verfahren aufbauen kann. Ein solcher therapeutischer Ansatzpunkt könnte etwa der EGF-Rezeptor sein: Die hohe Kopienzahl bestimmter Bereiche im EGF-Rezeptor-Gen deutet darauf hin, dass der Signalweg über diesen Rezeptor bei der Entstehung der Ependymome, die im Kopfbereich (intracranell) auftreten, eine entscheidende Rolle spielt. Das gut untersuchte System der Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren hat sich bei Brust- oder Darmkrebs bereits als Ansatzpunkt für wirksame, zielgerichtete Therapien bewährt.

Eine Funktionsanalyse von *CITED4* könnte ganz neue Einblicke in die Therapieresistenz von Tumoren ermöglichen. Die Aufklärung dieser Resistenzmechanismen ist für die klinische Onkologie von zentraler Bedeutung und daher auch für das Verständnis anderer Tumorerkrankungen hilfreich.

Kontakt

Dr. Meinhard Hahn

Deutsches Krebsforschungszentrum

Abteilung Molekulare Genetik

Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg

E-Mail: m.hahn@dkfz.de

Auf der Suche nach Krankheitsgenen und neuen Therapien

Das NeuroNetz untersucht häufige Erkrankungen des Nervensystems mit modernsten molekulargenetischen Methoden

Peter Propping, Thomas Gasser, Holger Lerche, Matthias Riemenschneider, Olaf Riess, Thomas Sander, Rainer Spanagel, Andreas Zimmer

Im NeuroNetz werden Alkoholismus, Alzheimer-Krankheit, bipolar affektive Störungen, Epilepsie und die Parkinson-Krankheit untersucht. Sie alle gehören zu den schweren zentralnervösen Erkrankungen des Menschen und werden von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zu den häufigsten Ursachen menschlicher Morbidität gezählt.

Aufgrund von Familien- und Zwillingsuntersuchungen weiß man schon lange, dass genetische Faktoren an diesen Krankheiten beteiligt sind. Mit Sicherheit liegt allen genannten Krankheiten ein kompliziertes genetisches Bedingungsgefüge zugrunde. Es gibt einzelne seltene Krankheitsformen, die durch Mutationen in einem einzigen Gen verursacht werden. Da diese einem einfachen Mendelschen Erbgang unterliegen, ermöglichen sie es, die Rolle der kodierten Proteine zu untersuchen. Ein großer Teil der Erkrankungen beruht jedoch auf der Kombination vieler kleiner Geneffekte mit umweltbedingten Faktoren. Dieses Phänomen bezeichnen die Genetiker als multifaktorielle Vererbung. Diese Krankheiten treten in einer Familie zwar bei mehreren Angehörigen auf, folgen aber nicht dem einfachen Mendelschen Erbgang. Man muss sogar damit rechnen – und aktuelle Befunde sprechen dafür –, dass die funktionellen Auswirkungen mancher Genvarianten unspezifisch sind, d. h. dass sie zu verschiedenen Störungen des Gehirns führen können. Das menschliche Gehirn verfügt über erhebliche redundante Funktionen, die die Auswirkung einer Mutation kompensieren oder auch modifizieren können. Die Anfälligkeiten für verschiedene Krankheiten des menschlichen Gehirns werden sich also wahrscheinlich überlappen.

Wichtige neue Erkenntnisse

Bisher sind die für die genannten Krankheiten verantwortlichen Gene nur ansatzweise bekannt. NGFN-Forscher im NeuroNetz haben wichtige neue Erkenntnisse beigesteuert, die die Aufklärung des Krankheitsprozesses möglich machen. Dabei können die Wege zur Identifizierung der relevanten Gene und ihrer Varianten durchaus unterschiedlich sein:

· Die monogen erbliche Form einer Krankheit, die manchmal nur innerhalb einer Familie beobachtet wird, ermöglicht die Identifikation eines Gens, dessen Funktionsausfall mit einer schweren Störung verbunden ist.

· Im Tierversuch kann ein Gen identifiziert werden, das zu einer Krankheit führt, die analog zu der menschlichen ist.

· Kopplungs- und Assoziationsuntersuchungen können durch sogenannte Positionsklonierung zur Identifikation eines Gens führen, das die Entstehung einer bestimmten Krankheit beeinflusst.

Alle diese Ansätze werden im NeuroNetz eingesetzt und dienen als Voraussetzung für die Entwicklung neuer Therapien.

Parkinson – Absterben von Neuronen

Bei der Parkinson-Krankheit verlieren die Patienten durch ein fortschreitendes Absterben von dopaminproduzierenden Neuronen unaufhaltsam ihre Bewegungsfähigkeit und sind im fortgeschrittenen Krankheitsstadium oft weitgehend pflegebedürftig. Die Ursache der Neurodegeneration ist in den meisten Fällen unbekannt. Zwar konnten mehrere Gene gefunden werden, die einige relativ seltene monogen vererbte Formen der Parkinson-Krankheit verursachen, aber in den meisten Fällen (etwa 95 %) erkranken die Patienten sporadisch, d. h. ohne dass die Krankheit eindeutig auf bestimmte Gendefekte zurückzuführen ist. Es ist aber sehr wahrscheinlich, dass die genetisch verursachten Fehler in molekularen Netzwerken, die bei den monogen vererbten Parkinson-Formen identifiziert wurden, auch bei der häufig auftretenden sporadischen Form der Erkrankung pathogenetische Relevanz besitzen. Der Fortschritt bei der Parkinson-Forschung, zu der das Parkinson Subnetz des NGFN einen wichtigen Beitrag geleistet hat, könnte zu neuen Ansatzpunkten für eine kausal wirksame Therapie führen.

α -Synuklein. Sehr selten sind Punktmutationen im Gen für α -Synuclein (SNCA) die Ursache eines Parkinson-Syndroms. Das α -Synukleinprotein bildet bei allen Formen der Parkinson-Krankheit typische intrazelluläre Ablagerungen, die sogenannten Lewy-Körper. Auch Verdoppelungen und Verdreifachungen des Wildtyp-Gens können eine Parkinson-Krankheit verursachen. Im NeuroNetz konnte eine Familie identifiziert werden, in der sowohl SNCA-Verdoppelungen als auch -Verdreifachungen vorkamen. Hier zeigte sich klar, dass der Schweregrad der Krankheit von der Menge des in den Zellen produzierten α -Synukleinprotein abhängt: Patienten mit SNCA-Verdoppelung erkranken später als solche mit SNCA-Verdreifachung. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass auch bestimmte häufige genetische Varianten in diesem Gen zu einem erhöhten Risiko für die sporadische Parkinson-Krankheit beitra-

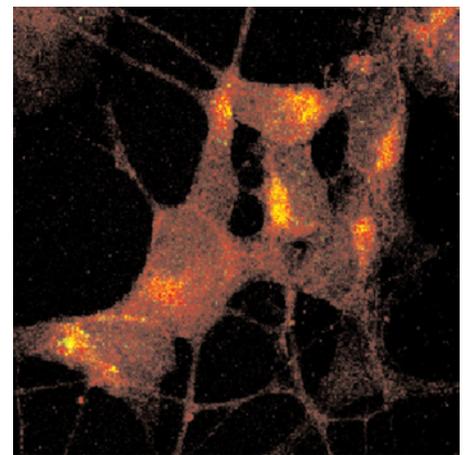


Abb. 1: Zellkulturmodell für Lewy-Körper. In menschliche Neuroblastom-Zellen wurde ein mutiertes α -Synuklein-Gen eingeschleust. Diese Neuroblastom-Zellen wurden dann zu Nervenzellen differenziert, in denen der proteasomale Proteinabbau gehemmt wurde. α -Synuklein wurde mit indirekter Immunfluoreszenz rot angefärbt, falsch gefaltetes α -Synuklein mit dem spezifischen grünen Farbstoff Thioflavin S sichtbar gemacht. Die gelbe Überlagerung des Signals zeigt sogenannte Aggresomen, in denen fadenförmige α -Synuklein-Proteingebilde (α -Synukleinfibrillen) vorliegen.

| Betroffene Proteine | Gen | Epilepsie | Chromosomale Region |
|------------------------------------|----------------|------------------------|---------------------|
| Natrium-Kanäle | SCN1A | GEFS+, SMEI | 2q24 |
| | <i>SCN1B</i> | GEFS+ | 19q13.1 |
| | SCN2A | BFNIC | 2q24 |
| Kalzium-Kanäle | <i>CACNB4</i> | IGE, JME | 2q22-q23 |
| | CACNA1H | CAE | 16p13.3 |
| Kalium-Kanäle | KCNQ2 | BFNC | 20q13 |
| | KCNQ3 | BFNC | 8q24 |
| | <i>KCNMA1</i> | GEPD | 10q22.3 |
| Chlorid-Kanal | CLCN2 | CAE, JAE, JME, EGMA | 3q26 |
| GABA_A-Rezeptoren | GABRA1 | JME, CAE | 5q34 |
| | GABRG2 | GEFS+ | 5q34 |
| | <i>GABRD</i> | GEFS+ | 1p36 |
| Acetylcholin-Rezeptoren | CHRNA4 | ADNFLE | 20q13 |
| | <i>CHRNA2</i> | ADNFLE | 8p21 |
| | <i>CHRN2</i> | ADNFLE | 1q21 |
| Nicht-Ionen-Kanäle | LG11 | ADLTE | 10q24 |
| | EFHC1 | JME | 6p12-p11 |

Tab. 1: Erkrankungsgene bei idiopathischen Epilepsien. Von den genannten Genen wurden vier durch NGFN-Forscher entdeckt, zu acht weiteren wurden wesentliche genetische oder funktionelle Beiträge geleistet, zu zweien wurden Tiermodelle erstellt, weitere sind in der Bearbeitung (fett markierte Gene).

GEFS+, Generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen plus; SMEI: CAE, kindliche Absence Epilepsie; JME, juvenile myoklonische Epilepsie, BFNC: benigne (gutartige) familiäre Neugeborenenkrämpfe, IGE: idiopathisch generalisierte Epilepsie, GEPD: generalisierte Epilepsie mit paroxysmaler Dyskinesie, JAE: Juvenile Absence-Epilepsie, EGMA, ADNFLE: autosomal dominante nächtliche Frontallappenepilepsie, ADLTE: autosomal-dominante laterale Temporalappenepilepsie.

gen, wahrscheinlich dadurch, dass eine Überproduktion dieses eigentlich wichtigen Proteins die Abbaumechanismen überlastet (Abb. 1).

Dies unterstützt die Hypothese, dass eine Überladung der Zelle mit α -Synuklein wesentlich an der Krankheitsentstehung beteiligt ist. Diesen Sachverhalt kann man auch in transgenen Mausmodellen darstellen: Wie im menschlichen Patienten führt auch in den Mausmodellen eine abnorm hohe Expression von α -Synuklein altersabhängig zur Bildung von pathologischen Proteinablagerungen, Neurodegeneration und Bewegungsstörungen sowie zur häufigsten neurologischen Komplikation, der Demenz. Die exakten neurotoxischen Mechanismen müssen nun in weiteren Studien in Tier- und Zellkulturmodellen aufgeklärt werden.

Mit *LRRK2* (Leucine Rich Repeat Kinase 2) wurde ein weiteres wichtiges Parkinson-Gen identifiziert. Das Gen kodiert für ein großes Protein, das funktionell als MAP Kinase (Mitogen Activated Protein Kinase) zu klassifizieren ist. Kinasen sind Proteine, die in bestimmten Signalwegen Phosphatgruppen auf andere Proteine übertragen und dadurch Informationen innerhalb des Signalweges weitergeben. Patienten mit *LRRK2*-Mutation sind aus klinischer Sicht nicht von solchen mit der typischen sporadischen Parkinson-Erkrankung zu unterscheiden. Mutationen im *LRRK2*-Gen stellten sich als eine überraschend häufige Ursache des Parkinson-Syndroms heraus. *LRRK2*-Mutationen wurden bei 5-15 % der genetisch vererbten Fälle gefunden, aber auch in 1-2 % der sporadischen. In genetisch isolierten Populationen kann die Häufigkeit von Mutationen aber sehr

viel höher sein. Bei jüdischen Patienten mitteleuropäisch-hebräischer Herkunft (Ashkenasen) oder nordafrikanisch-arabischen Patienten findet sich eine ganz bestimmte *LRRK2*-Gründermutation (G2019S) in bis zu 40 % aller Fälle. Zellkulturuntersuchungen haben gezeigt, dass mutiertes *LRRK2* im Vergleich zum Wildtyp eine gesteigerte Kinaseaktivität besitzt. Das Protein könnte deshalb ein möglicher Ansatzpunkt für eine kausale Therapie sein, da zahlreiche Kinaseinhibitoren als potenzielle Medikamente zur Verfügung stehen.

Mal gehobener, mal depressiver Stimmung

Das Erscheinungsbild der bipolar affektiven Störung ist durch abwechselnde Episoden extrem gehobener und depressiver Stimmung gekennzeichnet. Alle modernen Familien-, Zwillings- und Adoptionsuntersuchungen weisen darauf hin, dass genetische Faktoren am Entstehungsprozess der Erkrankung beteiligt sind. Der Vererbungsmechanismus ist sehr komplex, da verschiedene genetische Faktoren eine Rolle spielen.

Molekulargenetische Untersuchungstechniken und Ergebnisse. Für die genetische Analyse multifaktorieller Krankheiten werden sowohl Kopplungsuntersuchungen an Familien als auch Assoziationsverfahren an Einzelpersonen angewendet.

Mithilfe einer Kopplungsuntersuchung kann ermittelt werden, welche DNA-Abschnitte vom erkrankten Elternteil auf ein erkranktes Kind vererbt wurden. Dies geschieht mithilfe von sogenannten polymorphen Markern. Das

sind DNA-Abschnitte im menschlichen Genom, die sich von Mensch zu Mensch unterscheiden und deshalb als Orientierungspunkte in der menschlichen Genkarte dienen. Wenn bei einer großen Zahl von untersuchten Familien nun ein bestimmter Marker zufällig vom erkrankten Elternteil auf ein erkranktes Kind vererbt wird, deutet das darauf hin, dass sich dieser Marker in der Nähe eines potenziellen Krankheitsgens befindet.

Bei einer Assoziationsanalyse wird untersucht, ob eine bestimmte Genvariante häufiger bei Patienten als bei gesunden Kontrollpersonen vorkommt. Eine positive Assoziation liegt vor, wenn die untersuchte Variante zur Krankheitsursache beiträgt oder in sehr geringem chromosomalen Abstand zu einer krankheitsrelevanten Variante liegt.

Nachdem zuvor durch Kopplungsuntersuchungen vier chromosomale Regionen (1p36, 4q27-q32, 6q21-q23 und 13p12-p13) identifiziert worden waren, in denen Krankheitsgene für die bipolar affektive Störung lokalisiert sein könnten, wurden in einem weiteren Schritt Assoziationsstudien durchgeführt. Zunächst wurden 300 Patienten mit bipolar affektiver Störung einer gleich großen Kontrollgruppe gegenübergestellt. Genetische Varianten, die häufiger bei Patienten vorlagen, wurden anschließend in einem zweiten Fall-Kontroll-Kollektiv untersucht, um falsch positive Assoziationsbefunde auszuschließen. Durch diese Studie könnte bestätigt werden, dass es in allen vier chromosomalen Abschnitten Genvarianten gibt, die bei Patienten mit bipolar affektiver Störung häufiger vorkommen als bei Kontroll-



Abb. 2: Mäuse, deren innere Uhr durch einen Gendefekt gestört ist, trinken mehr Alkohol als ihre gesunden Artgenossen, wenn man ihnen die Wahl zwischen Wasser und Alkohol lässt.

personen.

In einer weiteren Untersuchung konnten die Wissenschaftler sowohl zwischen Genorten auf den langen Armen der Chromosomen 2 und 6 als auch zwischen Genorten auf den Chromosomen 2 und 15 eine deutliche Wechselwirkung nachweisen. Damit ist es erstmals bei einer multifaktoriellen Krankheit gelungen, zu zeigen, dass sich Risikoeffekte, die von verschiedenen Genen ausgehen, addieren können.

Die Sucht nach Alkohol

Die Sucht ist durch das starke Verlangen des Abhängigen nach der Droge (Craving) charakterisiert, das zum Lebensmittelpunkt und zur zentralen Motivation seines Verhaltens wird und häufig zum Rückfall führt. In den letzten Jahren ist es gelungen, Tiermodelle zu entwickeln, die Craving und Rückfallverhalten abbilden. Sie bieten wissenschaftlich und medizinisch sinnvolle, ethisch vertretbare Möglichkeiten einer intensiven und detaillierten Erforschung von Alkoholismus und anderen Suchterkrankungen.

Im Rahmen der Untersuchungen des NeuroNetzes wird ein dreistufiger Ansatz beschritten: Zuerst werden mithilfe neuer Tiermodelle und bildgebender Verfahren die neuroanatomischen Substrate von Suchtverhalten untersucht. In einem zweiten Schritt werden Kandidatengene identifiziert. In einem letzten Schritt

werden die Kandidatengene am Tiermodell und durch pharmakologische Nachweisverfahren funktionell bestätigt. Nach diesem Validierungsprozess wird eine Übertragung auf den Menschen durchgeführt – hierfür werden verschiedene Varianten der Kandidatengene bei Suchtpatienten untersucht. Dieser dreistufige neurobiologische/genetische Ansatz, der ein fächerübergreifendes Team von Genetikern, Molekularbiologen, Pharmakologen und klinischen Suchtforschern mit einschließt, hat in den letzten Jahren neue pharmakologische Interventionsmöglichkeiten hervorgebracht. Er wird im Folgenden am Beispiel der Clockgene (Gene, die die innere Uhr beeinflussen) beschrieben.

Per Gene und erhöhter Alkoholkonsum

Mausmutanten, die ein defektes Gen (*Per2*) der inneren Uhr in ihrem Erbgut tragen, zeigen stark erhöhte Glutamat Spiegel im Gehirn und erhöhte Alkoholaufnahme. Erhöhte Glutamat Spiegel führen zu einer stark veränderten neuronalen Kommunikation im Gehirn. Die Tiere trinken deutlich mehr Alkohol als ihre gesunden Artgenossen, wenn man ihnen die Wahl zwischen Wasser und Alkohol lässt. Ferner wurde bei diesen Mausmutanten gezeigt, dass sowohl erhöhte Glutamat Spiegel als auch vermehrter Alkoholkonsum durch das Medikament Acamprosat (Campral), welches seit einigen Jahren klinisch zur Behandlung von Alkoholrückfall eingesetzt wird, normalisiert werden. Interessanterweise konnte auch beim Menschen nachgewiesen werden, dass bestimmte genetische Varianten des humanen *Per2*-Gens mit erhöhtem Alkoholkonsum assoziiert sind.

Diese Studie hat große klinische Relevanz, da die *Per2*-Genmodifikation und der erhöhte Glutamat Spiegel als Diagnosemarker bei alkoholabhängigen Patienten eingesetzt werden könnten. Für eine maßgeschneiderte Pharmakotherapie ist das Ergebnis hilfreich, dass Tiere mit erhöhtem Glutamat Spiegel besonders gut auf Acamprosatbehandlung ansprechen. Dies lässt sich direkt auf den Menschen übertragen. So sollen in naher Zukunft mithilfe spektroskopischer Verfahren erhöhte Glutamat Spiegel bei Patienten erfasst werden, um diejenigen Patienten zu identifizieren, deren Glutamatstoffwechsel gestört ist, zum Beispiel wegen einer Mutation im *Per2*-Gen. Dadurch lässt sich möglicherweise vorhersagen, welchen Patienten Acamprosat besonders gut hilft. Diese indivi-

duell adaptierte Therapie für Alkoholismus stellt ein Paradebeispiel für die moderne Medizin dar und zeigt, dass in Zukunft die maßgeschneiderte Pharmakotherapie der Weg ist, der zum Behandlungserfolg führen kann.

Alzheimer-Krankheit durch Ablagerungen

Die Alzheimer-Krankheit führt zu einem fortschreitenden Gedächtnis- und Persönlichkeitsverlust. In Deutschland leben derzeit ca. 1,2 Millionen Erkrankte, wobei mehr als 40 % der über 85-Jährigen von der Krankheit betroffen sind.

Als Ursache für die Erkrankung wird die Ablagerung zweier modifizierter Proteine im Hirngewebe, das beta-Amyloid Protein (Plaques) und das Tau Protein (Neurofibrillen), angesehen. Die genetischen Faktoren und molekularen Mechanismen, die an der Prozessierung des Amyloid Vorläufer Proteins (APP) und der Entstehung des beta-Amyloids beteiligt sind, standen im Mittelpunkt der Forschungsansätze.

Im NeuroNetz konnten zwei proteinspaltende Enzyme, die Proteasen PLAU und IDE, identifiziert werden, die an der Spaltung des beta-Amyloid Proteins beteiligt sind. Weiterhin konnten wichtige Erkenntnisse zur Funktion und Regulation der an der beta-Amyloid-Entstehung beteiligten Proteasen alpha-Sekretase (ADAM10), beta-Sekretase (BACE1) sowie dem gamma-Sekretase Komplex gewonnen werden. Eine vermehrte Bildung der alpha-Sekretase im Gehirn von Mäusen durch Überexpression des *ADAM10*-Gens führte im Tierversuch zu einer deutlichen Reduktion der Plaque Ablagerungen und einer Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten.

Mit Neuregulin 1 wurde ein bisher unbekanntes Substrat für BACE1 identifiziert. Durch das Schneiden des Neuregulins entsteht ein Lockstoff, der die sogenannten Glia-Zellen anlockt. Diese wickeln sich um die Nervenfasern, um auf diese Weise eine Isolierschicht – die Myelinscheide – zu bilden. BACE1 übernimmt also wichtige Funktion bei der Myelinisierung der Nervencheiden während der Embryogenese.

Eine ebenfalls neue Funktion wurde für das beta-Amyloid Protein entdeckt. Untersuchungen zeigten hierbei, dass das beta-Amyloid Protein die Produktion der Fettsorten Cholesterin und Sphingomyelin steuert. Die Zusammensetzung dieser Fette in den Nervenzellen wiederum beeinflusst die gamma-Sekretase

Aktivität und somit die beta-Amyloid Menge. Außerdem konnten wichtige physiologische Funktionen des APP Moleküls bei der Anheftung von Neuronen an das Bindegewebe des Gehirns und bei der Entwicklung der Gehirnrinde identifiziert werden.

Auch wurden Pathomechanismen der zerebralen Amyloid Angiopathie (CAA) untersucht. Die zerebrale Amyloid Angiopathie ist eine krankhafte Veränderung der Blutgefäße, die durch die Ablagerung des beta-Amyloid Proteins in Blutgefäßen verursacht wird. Die molekularen Prozesse der CAA spielen eine wesentliche Rolle beim Auftreten von zerebralen Blutungen im Rahmen therapeutischer Ansätze.

Epilepsie durch gestörte Ionenkanäle

Bis zu 50 Prozent aller Epilepsien sind vorwiegend genetisch bedingt, insbesondere die sogenannten idiopathischen Epilepsien – also Epilepsien, bei denen es keine Hinweise auf eine umweltbedingte Ursache oder strukturelle Hirnveränderungen gibt. Genetisch beeinflusste Funktionsstörungen von Ionenkanälen spielen eine zentrale Rolle bei der Entstehung von idiopathischen Epilepsien. Dies ist verständlich, da Ionenkanäle, die den Ionenfluss durch die Zellmembran regulieren, die Basis für die Erregbarkeit aller Nervenzellen darstellen. Die aktuellen Kenntnisse zeigen zwar eine genetische Heterogenität, jedoch finden sich konkrete Hinweise auf eine funktionelle Konvergenz. So

scheinen die Einflüsse hemmender Nervenzellen, die den Botenstoff gamma-amino-Buttersäure (GABA) zur Signalübertragung verwenden (sogenannte GABAerge Interneurone), besonders häufig von genetischen Mutationen betroffen zu sein. Der indirekte oder direkte Defekt der GABAergen Hemmung könnte also ein zentraler Mechanismus für die Entstehung von Epilepsien sein.

Im Rahmen des NeuroNetzes konnten die weltweit größten Kollektive von Familien und Patienten mit idiopathischen generalisierten Epilepsien (IGE) rekrutiert werden. In einigen Familien wurden neue Genmutationen identifiziert und funktionell charakterisiert, um herauszufinden, welche Wirkung diese Genveränderungen auf die Entstehung der Epilepsie haben (Tab. 1). Derzeit erfolgt eine genomweite Assoziationsstudie bei 700 IGE-Patienten mit dem Ziel, die häufigsten Genveränderungen zu erfassen und deren Zusammenspiel bei der Entstehung von Epilepsien aufzudecken. Zudem wurden Tiermodelle etabliert und untersucht, durch die die Auswirkungen von epilepsieassoziierten Mutationen in Nervenzellen, neuronalen Netzwerken und im ganzen Tier analysiert werden können. Diese Modelle schaffen auch die Voraussetzungen, neue Therapieansätze zu erproben.

Aufbauend auf Arbeiten des NeuroNetzes spielen NGFN-Forscher zudem eine führende Rolle im europäischen Forschungsprogramm EPICURE (Functional Genomics and Neurobiology of Epilepsy, www.epicureproject.eu). Die-

ser konzertierte multidisziplinäre Forschungsansatz der bedeutendsten europäischen Forschergruppen verbessert die Erfolgsaussichten, häufige und klinisch bedeutsame Schlüsselstellen der Entstehung der Epilepsie zu identifizieren und frühzeitig genetische Risikokonstellationen zu erfassen, die präventive Behandlungsansätze ermöglichen.

Fazit und Ausblick

Das menschliche Genom ist entschlüsselt, und wir wissen sehr viel über seine Variabilität. Man könnte meinen, dass sich die genetische Forschung beim Menschen erschöpft habe. Diese Annahme ist jedoch falsch. Das Gehirn des lebenden Menschen ist der direkten Untersuchung nicht zugänglich, und post mortem sind nur bestimmte morphologische Analysen möglich. Wie kein anderer Ansatz bieten genetische Methoden gerade bei Krankheiten des Gehirns Möglichkeiten zur Aufklärung der Ursachen. Die Hoffnung ist groß, dass bei den verschiedenen Krankheiten weitere Krankheitsgene identifiziert werden können, die funktionelle, z. B. zellbiologische, Analysen möglich machen.

Kontakt

Dr. Ruth Raff

Institut für Humangenetik

Universitätsklinikum Bonn

Wilhelmstraße 31, 53111 Bonn

E-Mail: raff@uni-bonn.de

Übergewicht – liegt es doch an den Genen?

Genetisch bedingtes extremes Übergewicht als Risiko der modernen Gesellschaft und assoziierte Erkrankungen

Timo D. Müller, Günter Brönner, Susann Friedel, Anke Hinney, Johannes Hebebrand

Übergewicht und Adipositas (extremes Übergewicht) haben sich in den letzten Jahrzehnten weltweit sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern und Jugendlichen epidemisch ausgebreitet und sind zu einem zentralen Gesundheitsproblem geworden. Adipositas kommt zunehmend häufiger vor, weil sich das Ernährungs- und Bewegungsverhalten geändert hat. Grundlage der Adipositas ist aber eine bestehende genetische Veranlagung.

Die Einteilung der Adipositas in drei

Schweregrade erfolgt anhand des Body-Mass-Index [BMI = Körpergewicht (kg)/(Körpergröße in m²)]. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation gelten derzeit ca. 50 Prozent der Deutschen als übergewichtig (BMI ≥ 25 kg/m²) und 20 % als adipös (BMI ≥ 30 kg/m²).

Adipositas gilt mittlerweile als einer der fünf größten gesundheitlichen Risikofaktoren der modernen Gesellschaft, wobei Folgeerkrankungen wie Typ 2 Diabetes, Bluthochdruck, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Fettstoffwech-

selstörungen sowie ein erhöhtes Risiko für Alzheimerische Demenz und verschiedene Krebsarten mit Adipositas vergesellschaftet sind.

Verantwortliche Gene für Übergewicht

Das Netzwerk *Adipositas und assoziierte Erkrankungen* beschäftigt sich mit den molekularen Mechanismen der Gewichtsregulation. Das Netzwerk umfasst 19 Teilprojekte an zehn verschiedenen Standorten in Deutschland, wel-

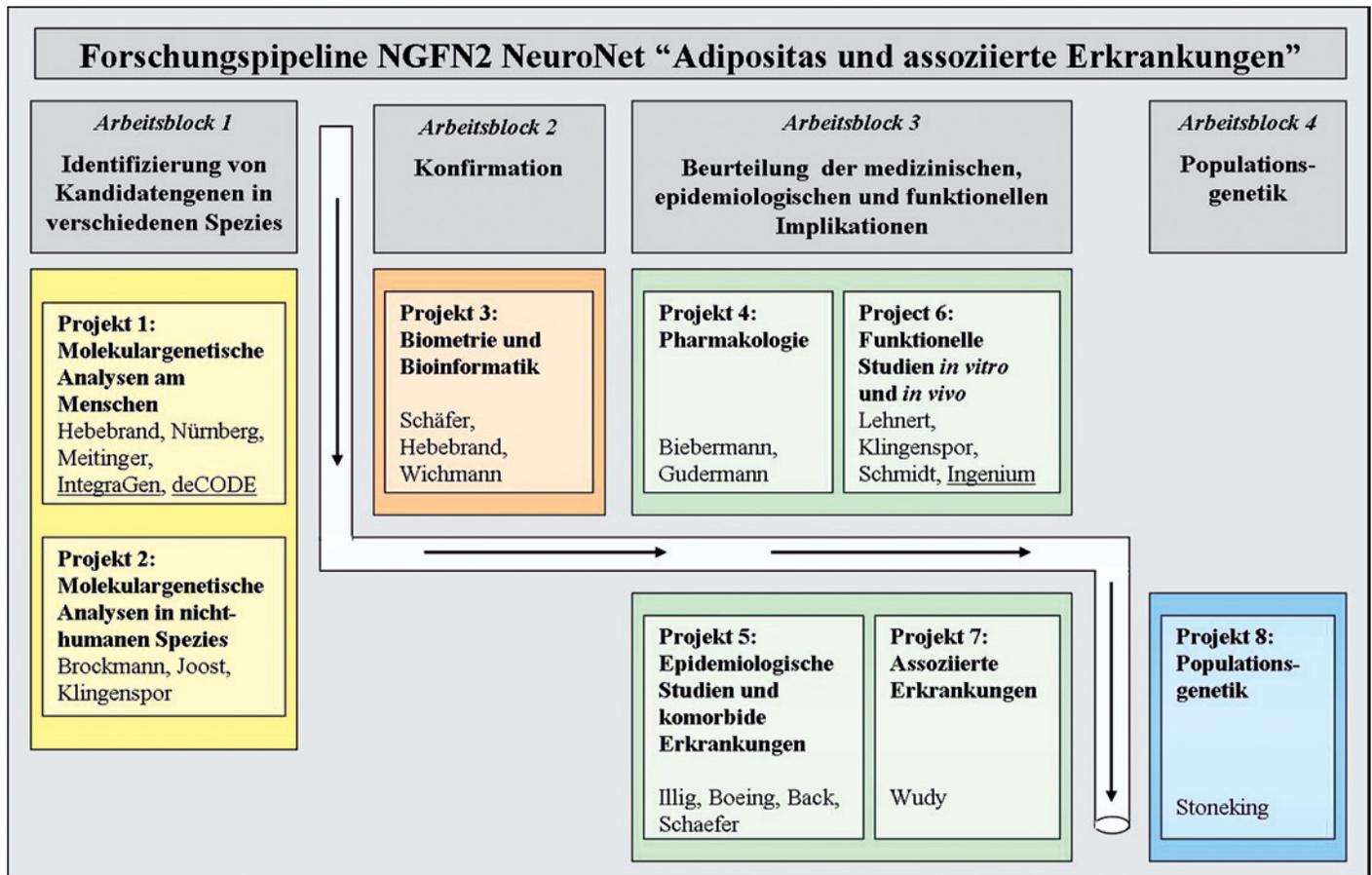


Abb. 1: Forschungspipeline des NeuroNetz „Adipositas und assoziierte Erkrankungen“.

che untereinander sowie mit internationalen Partnern kooperieren.

Das übergeordnete wissenschaftliche Ziel der Forschungen besteht darin, für (extremes) Übergewicht mitverantwortliche Gene bzw. genetische Varianten, sogenannte Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNPs [$>$ Glossar]), zu identifizieren und diese anschließend klinisch, epidemiologisch und funktionell zu charakterisieren. Die Aufklärung der molekularen Mechanismen, die der Adipositas zu Grunde liegen, ist dabei aufgrund der bekannten medizinischen und epidemiologischen Bedeutung des Phänotyps von

höchster Priorität. Ein weiterer Fokus liegt auf der Untersuchung identifizierter Varianten bezüglich ihrer Relevanz für adipositasassoziierte Begleiterkrankungen.

Im Rahmen des Netzwerkes wurde eine „Forschungspipeline“ eingerichtet, um schnell und effektiv Informationen über die identifizierten Genvarianten zwischen den beteiligten Gruppen weiterzuleiten (Abb. 1). Das wissenschaftliche Konzept verbindet dabei Forschergruppen aus dem Gebiet der Adipositas mit solchen Gruppen, die Expertise auf dem Gebiet der Hochdurchsatz-Typisierungsverfahren aufweisen oder in pharmazeutischen Firmen forschen.

Identifizierung von Kandidatengenen in verschiedenen Spezies

Den Anfang der Forschungspipeline (Arbeitsblock 1) bilden Gruppen mit Expertise auf dem Gebiet der molekulargenetischen Analyse der Gewichtsregulation bei Mensch und Tier. Dabei sollen Gene bzw. genetische Varianten (SNPs) identifiziert werden, die einen Einfluss auf das Körpergewicht haben. Diesem Ansatz liegt die Annahme zugrunde, dass im Tiermodell vorkommende genetische Variabilität, die einen quantitativen Effekt auf die Fettmasse hat, funktionell relevante genetische

Abb. 2: Ergebnisse des 500K Affymetrix SNP Arrays an 487 extrem adipösen Kindern- und Jugendlichen und 442 untergewichtigen Kontrollen nach verschiedenen genetischen Modellen (Kreis: allelisch, Dreieck: rezessiv, Quadrat: dominant, Stern: additiv). Die beiden besten SNPs im FTO-Gen (fat mass and obesity associated) sind durch ein Oval markiert.

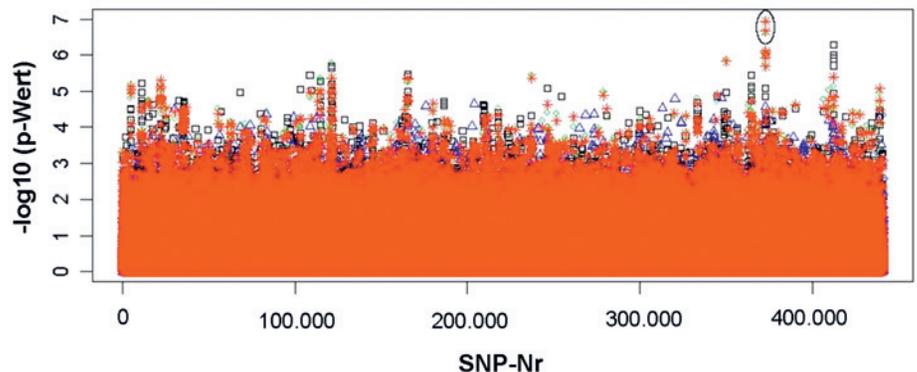




Abb. 3: Die New Zealand Obese Maus (NZO, rechts), ein Modellorganismus für polygene Adipositas und ein normalgewichtiges C57/BL6J Kontrolltier (links).

Gewichtsregulation, so erhält man eine Liste von 20 Genen, in denen repräsentative SNPs an 368 unabhängigen Adipositasrisiko (extrem adipöses Kind und beide Eltern) genotypisiert wurden. Dreizehn SNPs zeigten statistische Signifikanz. Zwei von diesen wurden in den zuerst untersuchten deutschen Familien bestätigt und werden derzeit in weiterführenden Studien validiert.

Analysen im Tiermodell

An der Identifizierung von Kandidatengen bei Nagern arbeiten gleich mehrere Forschergruppen. Ein Berliner Team untersucht die „Berliner Fettmaus“, welche ein polygenes Tiermodell für Adipositas darstellt, auf natürlich vorkommende genetische Variation, da viele humane Adipositasgene ursprünglich anhand spontan aufgetretener mutierter Mausgene entdeckt wurden. Von einer Potsdamer Arbeitsgruppe wird ein weiteres polygenes Mausmodell für Adipositas, die *New Zealand Obese (NZO) Maus* (Abb. 3), auf genetische Varianten hin untersucht, die an der Adipositas dieser Mauslinie beteiligt sind. Sie sollen dabei identifiziert und ihre Interaktion mit umweltbedingten Faktoren, wie z. B. dem Fettgehalt der Nahrung, analysiert werden. Genomweite Kopplungsanalysen an Auskreuzungen der NZO Maus führten bisher zur Identifikation von 15 Chromosom-Abschnitten, die eine genetische Veranlagung für das metabolische Syndrom enthalten, d. h. einem gemeinsamen Auftreten von Zuckerkrankheit (Diabetes mellitus Typ-2), extremem Übergewicht, Fettstoffwechselstörungen und Bluthochdruck.

Außerdem wurden bei diesen Analysen mehrere mit Adipositas assoziierte Kandidatengene, wie etwa der Cholesterintransporter (*Abcg1*) und der *Neuromedin U Rezeptor (Nmur2)* identifiziert. Des Weiteren wurde durch Sequenzierung der in den oben genannten Chromosom-Abschnitten lokalisierten Gene wurde eine Mutation in einem Gen gefunden, das möglicherweise für eine Komponente des Insulinsignalweges kodiert.

Um weitere Kandidatengene für Adipositas im Tiermodell zu ermitteln, untersucht eine Freisinger Gruppe (vorher Marburg) die Genexpression im Hypothalamus von Mäusen und Ratten bei unterschiedlichem Ernährungsstatus. Dabei konnte die differenzielle Expression von 18 Kandidatengen im Hypothalamus der

Variabilität in den homologen Genen des Menschen vorhersagt und umgekehrt.

Analysen beim Menschen

Eine Essener Forschergruppe untersucht die genetischen Mechanismen der Gewichtsregulation beim Menschen. Eine wichtige Rolle spielt dabei der *Melanokortin-4 Rezeptor (MC4R)*. Dieses Protein befindet sich im Hypothalamus, dem Steuerzentrum des autonomen Nervensystems. Sowohl appetitanregende als auch das Hungergefühl dämpfende Faktoren binden an den *MC4-Rezeptor*. Circa 2-4 % aller extrem adipöser Personen zeigen funktionsrelevante Mutationen in diesem Gen. Die NGFN-Forscher konnten zeigen, dass sich diese Mutationen beim weiblichen Geschlecht deutlich stärker auswirken als beim männlichen: Eine Untersuchung an betroffenen Familien zeigte, dass männliche mischerbige (heterozygote) Mutationsträger circa 15 bis 20 Kilogramm und weibliche circa 30 Kilogramm schwerer waren als Familienangehörige ohne entsprechende Mutation. Außerdem gelang der Essener Gruppe in enger Kooperation mit der GSF in München erstmals der Nachweis, dass eine bestimmte Genvariante, der Austausch der Aminosäure Valin gegen ein Isoleucin an der Stelle 103 des Proteins (Val103Ile Polymorphismus), negativ mit Adipositas assoziiert ist, und damit vor Übergewicht schützt. Circa 4 % der Deutschen haben diese Variante. Diese Personen sind im Durchschnitt 1,5 kg leichter als die Wildtypträger. Dieser schützende Effekt wurde anschließend in zwei groß angelegten zusammenfassenden Untersuchungen (Metaanalysen) bestätigt.

Mit einer bestimmten Art von DNA-Chips,

den hochdichten SNP-Chips, lassen sich bis zu 1 000 000 Varianten gleichzeitig bei einem Individuum genotypisieren. Eine statistische Auswertung zeigt dann, welche Allele gehäuft bei Patienten im Vergleich zu gesunden Personen vorkommen. Auf diese Weise wurde das *Insulin induzierte Gen 2 (INSIG2)* als Kandidatengen für Adipositas identifiziert. In weiteren Studien konnte der Erstbefund bestätigt werden: Das *INSIG2*-Protein reguliert die Aktivität von Genen, die beim Fett- beziehungsweise Cholesterinstoffwechsel eine Rolle spielen.

Außerdem konnten im Rahmen einer internationalen Kooperation spezifische genetische Varianten im *Transcription Factor 7 Like 2 Gen (TCF7L2)* identifiziert werden, die das Adipositas-Risiko erhöhen. Dieser Befund wurde in weiteren Untersuchungen an unabhängigen Adipositas-Familien bestätigt. *TCF7L2* ist derzeit das am besten validierte Risikogen für Typ 2 Diabetes mellitus. Weiterhin führte die Essener Forschergruppe kürzlich die weltweit erste genomweite Assoziationsstudie (GWA) zu früh manifester (extremer) Adipositas durch. In dieser Studie wurden 500 000 SNPs an 487 extrem adipösen Kindern und Jugendlichen sowie 442 untergewichtigen Kontrollen genotypisiert. Es konnte eine Assoziation des *FTO* Gens (*fat mass and obesity associated*) mit früh manifester extremer Adipositas nachgewiesen werden (Abb. 2).

Ein Forscherteam aus Köln entdeckte über eine genomweite Kopplungsanalyse an 295 deutschen Adipositasfamilien acht genomische Regionen mit einem Hinweis auf Kopplung mit früh manifester Adipositas. Ordnet man alle in diesen Regionen beschriebenen Gene im Hinblick auf ihre potenzielle Relevanz für die

db/db Maus (Maus mit defektem Leptinrezeptor) mit quantitativer Real-Time PCR validiert werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Inaktivierung (knock-out) des *ATGL* (adipocyte triglyceride lipase) Gens zu erhöhter Fettmasse und Insulinsensitivität führt. Die generelle Bedeutung dieser Gene für die Gewichtsregulation wird derzeit in weiterführenden Studien untersucht.

Wiederholungsuntersuchungen in unabhängigen Stichproben

Das Ziel des zweiten Arbeitsblockes (Abb. 1) ist es, Gene bzw. genetische Varianten, die im ersten Arbeitsblock identifiziert wurden, in unabhängigen Kollektiven zu bestätigen. Dabei werden sowohl Fall-Kontroll- wie auch familienbasierte Assoziationsstudien durchgeführt. Da zur effektiven Identifikation polygenetischer Varianten sowie zur Vermeidung falsch positiver Befunde eine sorgfältige und aussagekräftige Statistik notwendig ist, ist eine wiederholte Untersuchung anfänglich positiver Befunde in großen unabhängigen sowie großen epidemiologischen Kollektiven unerlässlich.

Gene bzw. genetische Varianten, deren Assoziation mit Adipositas in unabhängigen Kollektiven bestätigt werden konnte, werden im dritten Arbeitsblock in verschiedenen parallelen Ansätzen weiter erforscht.

Pharmakologische Studien

Eine Berliner Arbeitsgruppe untersucht validierte Kandidatengene bezüglich ihrer funktionellen und endokrinologischen Relevanz für die Gewichtsregulation. Sie beschrieb erstmals genetische Varianten im Proopiomelanocortin (*POMC*) Gen, die zu einem Funktionsverlust des Proteins führten und mit extremer Adipositas assoziiert waren. Proopiomelanocortin ist ein Prohormon, das in verschiedenen Geweben, u. a. im Hypothalamus und in der Adenohypophyse exprimiert wird. Das Prohormon wird gewebespezifisch in verschiedene Peptidhormone gespalten, die eine Rolle bei Schmerzen, Stimulation der Melanozyten, Körpergewicht, Regulation von Hunger und Sexualität etc. spielen. Man konnte zudem zeigen, dass dem aus dem *POMC* entstehenden beta-Melanocyten stimulierenden Hormon (β -MSH) eine essenzielle Bedeutung bei der Regulation der Nahrungsaufnahme zukommt.

Parallel zur funktionellen Untersuchung der verschiedenen *MC4R* Varianten werden weitere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren pharmakologisch charakterisiert mit dem Ziel,

die dem *MC4R* zu Grunde liegende Signaltransduktion zu entschlüsseln.

Funktionelle Studien

In einer Arbeitsgruppe aus Magdeburg werden die identifizierten Kandidatengene bezüglich ihrer Bedeutung für die Aktivität des sympathischen Nervensystems sowie für die Aktivierungsmuster verschiedener Hirnareale untersucht. Durch die metabolische Phänotypisierung adipöser Mauslinien versucht man zu klären, welche metabolischen Komponenten bei Mäusen zur Entwicklung bzw. Resistenz gegenüber diätinduzierter Adipositas (DIO) führen. Durch die Herstellung von „knock-in“ Mäusen, die spezifische veränderte Allele des *MC4R* tragen, wird außerdem die Auswirkung dieser Allele auf die Gewichtsregulation in diesen Tiermodellen untersucht. Ebenso werden funktionelle Studien zur Interaktion zwischen einer genetischen und einer durch Umweltfaktoren bedingten Adipositas durchgeführt.

Epidemiologische Studien und Begleiterkrankungen

Um die Bedeutung der mit Adipositas assoziierten Varianten für die Allgemeinbevölkerung abzuschätzen, untersuchen die NGFN-Wissenschaftler die Häufigkeit der identifizierten Varianten in einer für die Allgemeinbevölkerung repräsentativen Stichprobe (KORA-gen-Kohorte). Dabei wird u. a. analysiert, ob die mit Adipositas assoziierten Varianten die Anfälligkeit für Begleiterkrankungen (wie etwa Typ 2 Diabetes mellitus oder koronarer Herzerkrankung) erhöhen.

Andere Forscher des NGFN untersuchen die identifizierten Varianten hinsichtlich adipositas-abhängiger Phänotypen des metabolischen Syndroms. Ebenso wird der Zusammenhang zwischen den identifizierten Kandidatengenen und Schlaganfall erforscht. Im Universitätsklinikum Marburg verfügt man über ein großes Kollektiv von Patienten mit und ohne koronarer Herzerkrankung (KHK), in dem Mutationsanalysen relevanter Kandidatengene durchgeführt werden.

Assoziierte Erkrankungen

Der Phänotyp Kleinwuchs (engl.: idiopathic short stature, ISS), stellt in verschiedener Hinsicht (BMI, Knochenreife, präpubertäre Körpergröße) das gegenüberliegende Ende der jeweiligen quantitativen Verteilungen der Phänotypen dar, die bei adipösen Kindern und Jugendlichen zu beobachten sind. Mit einer konventionellen Untersuchungsmethode (Genomscan) gelang es, mit ISS gekoppelte chromoso-

male Regionen zu identifizieren: Auf Chromosom 12 zeigte sich ein Bereich, der signifikant mit ISS sowie der Körpergröße gekoppelt war. Die gleiche Region wurde bereits in anderen Genomscans als Kopplungsregion für die Statur bei Erwachsenen beschrieben und enthält das Gen für den *Vitamin D-Rezeptor (VDR)*. Ein familienbasierter Assoziationsstest für sieben SNPs im *VDR* Gen deutet darauf hin, dass genetische Variabilität an diesem Locus zumindest teilweise den Kopplungsbefund erklärt. Derzeit werden Kandidatengene für Untergewicht bei Kindern mit ISS analysiert.

Populationsgenetik

Populationsgenetische Untersuchungen bezüglich der identifizierten Kandidatengene erfolgen in einer Arbeitsgruppe in Leipzig. Dabei wird u. a. die Hypothese überprüft, ob sich mit Adipositas assoziierte Varianten aufgrund eines Selektionsvorteils in der Evolution leichter durchgesetzt haben als Varianten, die nicht zu einer Anfälligkeit für Übergewicht führen. Die durchgeführten Analysen beinhalten dabei u. a. die Genotypisierung von Kandidatengenen in verschiedenen Volksgruppen sowie die Re-Sequenzierung in nicht-humanen Spezies wie beispielsweise Primaten.

Literatur

- Bronner, G. et al. *The 1031 variant of the melanocortin 4 receptor is associated with low serum triglyceride levels. J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:535-8.
- Heid, IM. et al. *KORA Group. Association of the 1031 MC4R allele with decreased body mass in 7937 participants of two population based surveys. J Med Genet.* 2005 Apr;42(4):e21.
- Helgason, A. et al. *Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. Nat Genet.* 2006;38:320-3.
- Herbert, A. et al. *A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity. Science.* 2006;312:279-83.
- Haemmerle, G. et al. *Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. Science.* 2006 5;312:734-7.

Kontakt

Prof. Dr. Johannes Hebebrand
Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Kindes- und Jugendalters der Rheinischen Kliniken Essen
Klinikum der Universität Duisburg-Essen
 Virchowstraße 174, 45147 Essen
 E-Mail: johannes.hebebrand@uni-duisburg-essen.de

Schlaganfall: Dem Gehirn helfen, sich selbst zu reparieren

Neuverschaltung der Nervenzellen stimuliert – Ausfälle des Gehirns bleiben gering

Peter Seeburg

Das Gehirn ist ein außerordentlich komplexes Organ und vermag sich nach einer Schädigung kaum zu regenerieren. Neurologische und psychiatrische Erkrankungen, die mit Verlusten oder Funktionsstörungen von Nervenzellen einhergehen, führen deshalb zu schweren und dauerhaften Funktionsausfällen, wie man sie zum Beispiel vom Schlaganfall (fokale zerebrale Ischämie) kennt. Ein Schlaganfall wird durch Durchblutungsstörungen des Gehirns ausgelöst: 85 Prozent aller Schlaganfälle entstehen durch den Verschluss eines Blutgefäßes im Gehirn (ischämischer Schlaganfall). Die restlichen 15 Prozent werden dadurch ausgelöst, dass ein Gefäß im Gehirn platzt und sich Blut in das Hirngewebe ergießt (hämorrhagischer Schlaganfall). In der Folge wird das Gehirn nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff und Glukose versorgt, so dass die Nervenzellen absterben.

Das Gehirn bildet neue Zellen

Neuere Untersuchungsbefunde wecken Hoffnungen für Schlaganfallpatienten: Im Gehirn des Menschen werden bis ins hohe Alter täglich neue Zellen gebildet, die sich zu Nervenzellen und Gliazellen entwickeln.

Diese sogenannte adulte Neurogenese ist zwar auf bestimmte Gehirnareale beschränkt, im Falle einer Schädigung des Gehirns kann diese Beschränkung aber überwunden und die neugebildeten Nervenzellen können gezielt in die geschädigten Hirnareale umgelenkt werden. Sie werden so mit den überlebenden Nervenzellen verschaltet, dass die Funktion des abgestorbenen Hirngewebes zumindest teilweise wiederhergestellt werden kann.

Das Ziel der NGFN-Wissenschaftler des Genomnetzes Schlaganfall besteht darin, einen methodisch-therapeutischen Ansatz zu finden, um die Neuverschaltung der Nervenzellen zu stimulieren und so die schlaganfallbedingten Funktionsausfälle des Gehirns möglichst gering halten zu können. Unabdingbare Voraussetzung dafür ist zunächst das Verständnis des Zusammenspiels verschiedener Mechanismen und Faktoren auf neuronaler sowie genetischer Ebene: Wie schafft es unser Gehirn, sich selbst

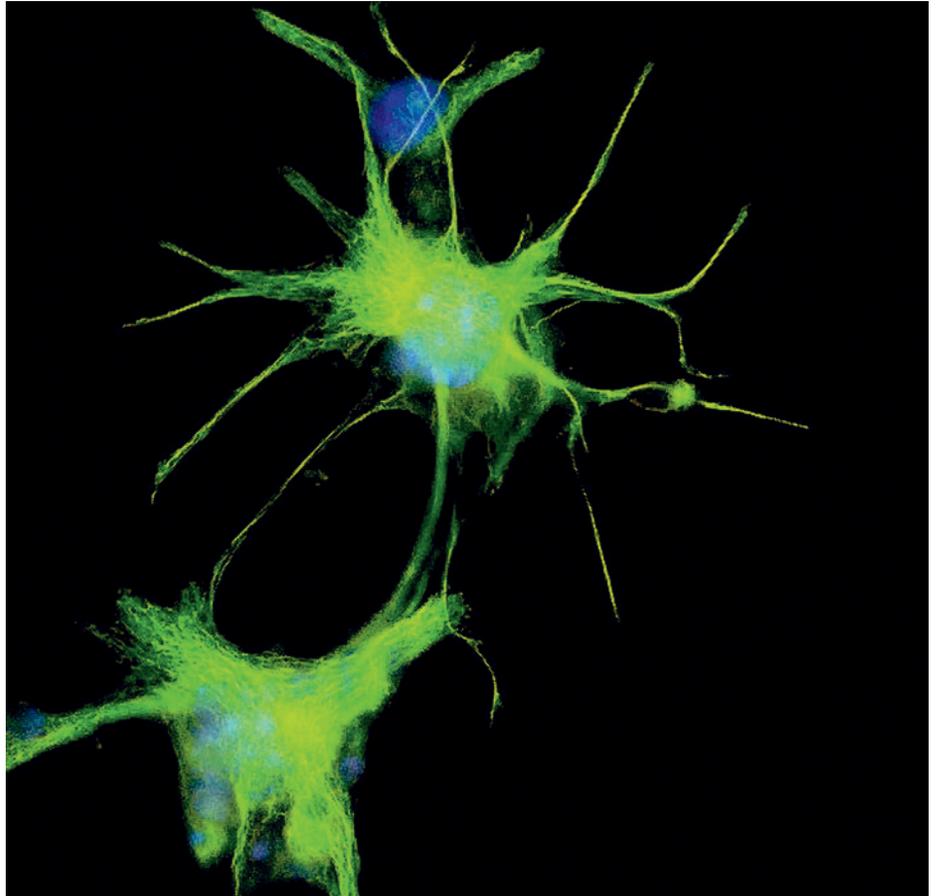


Abb. 1: Neuronale Stammzellen aus dem Gehirn Ratte exprimieren das Intermediärfilament-Protein Nestin (grün). Zellkerne wurden blau angefärbt. (Foto: D. Schelshorn)

zu reparieren? Welche Gene werden dazu aktiviert? Welche Proteine werden produziert? Welche Zellen springen für die toten Nachbarn in die Bresche?

Simulation eines Schlaganfalls

Neuronale Stammzellen können aus den entsprechenden Regionen des Gehirns isoliert und in einem Nährmedium vermehrt werden (Zellkultur). Die Situation eines Schlaganfalls kann bei einer solchen Zellkultur simuliert werden, indem die Zellen kaum noch Sauerstoff und Glukose erhalten.

Die Arbeitsgruppe um PD Dr. Martin Maurer und Professor Dr. Wolfgang Kuschinsky von der Universität Heidelberg hat solche neurona-

len Stammzellen in Kultur untersucht und ein standardisiertes Verfahren entwickelt, das die Ausreifung der Stammzellen in spezialisierte Nervenzellen ermöglicht. Die Stammzellen durchlaufen bei der Entwicklung zu spezialisierten Nervenzellen eine Reihe tiefgreifender morphologischer und funktioneller Veränderungen, die sich in einer geänderten Proteinzusammensetzung widerspiegeln. Die Heidelberger Wissenschaftler trennten die in den Zellen enthaltenen Proteine und Peptide auf, identifizierten die einzelnen Proteine über Massenspektrometrie und erstellten eine Proteinkarte.

Durch einen Vergleich der Proteinkarten von neuronalen Stammzellen und ausgereiften Nervenzellen entdeckten die Forscher einen

Signalweg, der für die Aufrechterhaltung von Stammzeleigenschaften im Hinblick auf ihre Überlebens- und Vermehrungsfähigkeit wichtig ist. Eine Schlüsselrolle spielt hierbei das Enzym Glycogen-Synthase-Kinase-3-beta (GSK3 β), ein Protein, das in zahlreiche Signalwege eingebunden ist, die das Wachstum, die Entwicklung sowie die Apoptose (das „Selbstmordprogramm“ einer Zelle) regulieren.

Martin Maurer und Wolfgang Kuschinsky identifizierten in ihrer Studie auch kleine Moleküle, die die Funktion von GSK3 β ausschalten. Diese Moleküle könnten möglicherweise zur Behandlung von Schlaganfall und neurodegenerativer Erkrankungen eingesetzt werden.

Nervenzellen aus Stammzellen des Knochenmarks

Josef Priller und seine Arbeitsgruppe von der Charité in Berlin untersuchen, ob sich Stammzellen aus dem Knochenmark im Gehirn zu Nervenzellen weiterentwickeln können. Wäre das der Fall, so ließe sich durch eine Transplantation dieser Zellen möglicherweise der Gewebeschaden nach einem Schlaganfall begrenzen.

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Zellen aus dem Knochenmark in das Schlaganfallgebiet einwandern und dort auch längerfristig Eigenschaften von lokalen Zellen annehmen. Für ihre Experimente markierten die Wissenschaftler Stammzellen aus dem Knochenmark mit grünem Fluoreszenzfarbstoff und injizierten die Zellen in die Venen der Versuchstiere. Zehn bis 15 Monate später waren im Gehirn der Tiere zwei Arten derartig markierter Nervenzellen nachweisbar. Trotz der Blut-Hirn-Schranke finden also Stammzellen aus dem Knochenmark den Weg ins Gehirn und differenzieren dort zu Nervenzellen. Die Rekrutierung von Knochenmarkszellen in das Gehirn ist eng mit der Bildung von neuen Gefäßen (Angiogenese) assoziiert. Körperliche Aktivität erhöht das Ausmaß der Angiogenese und die Präsenz von Knochenmarkszellen um die neugebildeten Gefäße im Schlaganfallgebiet. Das ist möglicherweise die Erklärung dafür, dass körperliche Aktivität die funktionelle Rehabilitation nach experimentellem Schlaganfall im Tierversuch verbessert.

Das Berliner Forscherteam untersucht gegenwärtig die Wechselwirkungen zwischen Entzündung, Angiogenese und Ausreifung von Nervenzellen bei einem Schlaganfall. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen könnten dazu beitragen, dass neue, innovative Thera-

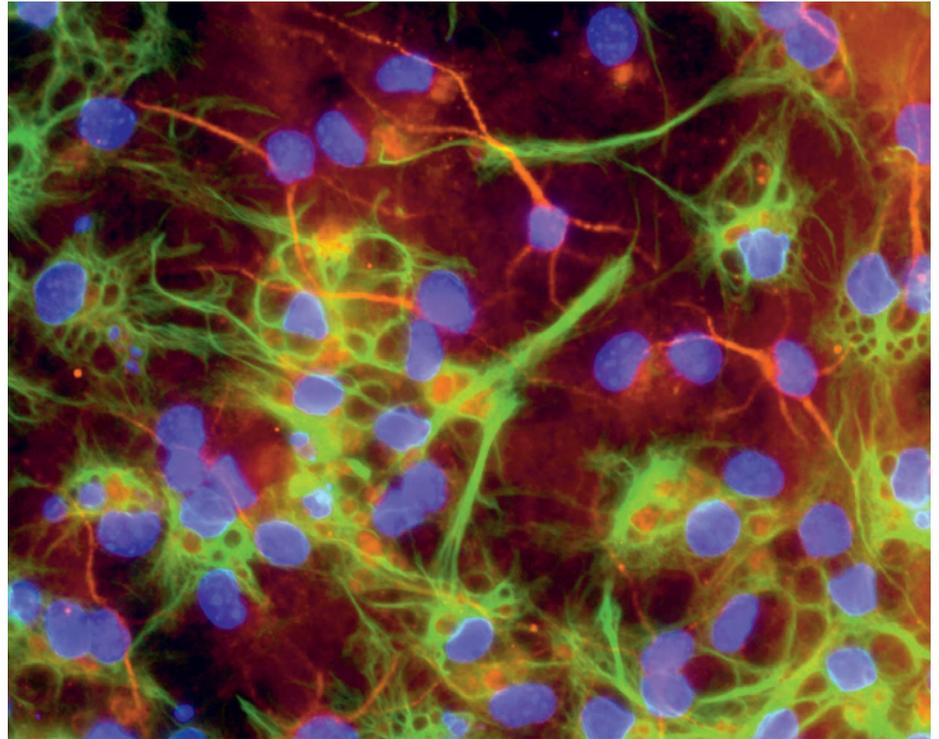


Abb. 2: Kultur von differenzierten Nervenzellen. Die Zellen wurden aus der subventrikulären Zone (Maus) isoliert und 7 Tage lang mit Serum *in vitro* kultiviert. Rot: Neuronenmarker MAP2, Grün: Astrocytenmarker GFAP, Blau: Kernfärbung mit DAPI.

pieverfahren entwickelt werden, die auch lange nach dem Eintritt des Schlaganfalls Wirkung entfalten, indem sie endogene Regenerationsmechanismen ermöglichen und unterstützen.

Gewebeschaden wurde enorm verringert

In der Pharmaindustrie beschäftigt sich ein Team um Dr. Armin Schneider in Heidelberg mit dem Granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF). G-CSF spielt eine wichtige Rolle bei der Blutbildung – aber offensichtlich nicht nur dort. Wie die Forscher bewiesen, bilden Nervenzellen im Gehirn sowohl den G-CSF-Rezeptor als auch den Faktor selbst. Eine ganze Reihe von Indizien spricht dafür, dass G-CSF maßgeblich an der Beseitigung der Schlaganfallfolgen beteiligt ist.

Die Wissenschaftler lösten bei Mäusen einen künstlichen Schlaganfall aus, indem sie den Blutfluss in einer wichtigen Hirnarterie unterbrachen. Bereits zwei Stunden später war im Hirngewebe die Konzentration von G-CSF um mehr als das 100-fache gestiegen, und auch die Zahl der Rezeptoren hatte sich erhöht. Am deutlichsten waren diese Veränderungen in Hirnregionen, die direkt neben dem vom Schlaganfall betroffenen Gebiet lagen.

Weitere Experimente zeigten, dass G-CSF die intakte Blut-Hirn-Schranke überwindet. Das

brachte die Forscher auf die Idee, den Faktor therapeutisch zu nutzen. Sie injizierten Mäusen die Substanz G-CSF im Anschluss an einen induzierten Schlaganfall intravenös. Die Größe des Infarktgebietes reduzierte sich dann im Vergleich zu nicht behandelten Mäusen um mehr als 40 Prozent. Mäuse, die G-CSF erhalten hatten, entwickelten außerdem weniger schwere neurologische Ausfälle als die übrigen Versuchstiere.

Inzwischen haben die Wissenschaftler auch geklärt, auf welche Weise G-CSF das Hirngewebe schützt: Zum einen verhindert die Substanz die Apoptose von Zellen im Infarktgebiet, zum anderen wirkt sie auf neuronale Stammzellen des Gehirns. Diese tragen nämlich ebenfalls den G-CSF-Rezeptor auf ihrer Oberfläche. Unter Einfluss von G-CSF entwickeln sich die Stammzellen zu Nervenzellen weiter. Diese können dann die Lücken schließen, die der Schlaganfall gerissen hat.

Schadensbegrenzung im Gehirn

An der Heidelberger Universität untersuchen Forscher um Professor Markus Schwanninger, welche Gene nach einem Schlaganfall im Hirngewebe verstärkt abgelesen werden. Sie führten eine sogenannte Genexpressionsanalyse im Hirngewebe durch und entdeckten, dass

das Gen TWEAK nach einem Schlaganfall besonders aktiv ist. Das Gen TWEAK kodiert für einen Botenstoff, der eine Signalkaskade auslöst, an dessen Ende der Transkriptionsfaktor NF-κB steht. NF-κB wiederum schaltet Gene an, die bestimmte Entzündungsprozesse und die Apoptose der Zellen steuern.

Die Wissenschaftler entdeckten, dass sich das Protein TWEAK und der mit TWEAK verbundene Signalweg in Nervenzellen durch Bindung eines neutralisierenden Antikörpers ausschalten lässt. Wurde TWEAK durch diesen Antikörper blockiert, dann verkleinerte sich das vom Schlaganfall betroffene Areal und es starben wesentlich weniger Nervenzellen ab. Die schädliche Wirkung von TWEAK bei einem

Schlaganfall wurde inzwischen auch durch andere Forschergruppen bestätigt.

Ein weiteres Ergebnis der Studie bestätigt, dass der Transkriptionsfaktor NF-κB eine wichtige Rolle beim Geschehen nach einem Schlaganfall spielt. NF-κB wird durch die Proteinkinase IKK aktiviert, indem IKK Phosphatgruppen auf NF-κB überträgt. Um die Rolle von IKK beim Schlaganfall aufzuklären, züchteten die Wissenschaftler Mäuse, bei denen sich das Protein IKK2 und damit dieser Signalweg in Nervenzellen beliebig ein- und ausschalten ließ. Lag kein IKK2 in den Nervenzellen vor oder wurde es blockiert, starben nach einem Schlaganfall wesentlich weniger Nervenzellen ab. War IKK2 hingegen übermäßig aktiv, waren die Schäden

im Gehirn wesentlich größer. Auch wenn die Forscher den Mäusen ein kleines, künstliches Molekül verabreichten, das IKK2 hemmt, verkleinerte sich das vom Schlaganfall betroffene Areal, und es starben wesentlich weniger Nervenzellen ab.

Sowohl IKK als auch TWEAK könnten also potenzielle Ansatzpunkte für eine Therapie nach einem Schlaganfall sein.

Kontakt

Prof. Dr. Peter Seeburg
 MPI Med. Forschung Heidelberg,
 Molekulare Neurobiologie
 Jahnstraße 29, 69120 Heidelberg
 E-Mail: seeburg@mpimf-heidelberg.mpg.de

Gefährliche Wechselwirkung zwischen Genen und Lebensstil

Häufigkeit von umweltbedingten Erkrankungen steigt seit einigen Jahrzehnten

Stefan Schreiber, Ulrich Wahn, Erich Wichmann

An verschiedenen Grenzflächen der Körperoberfläche – also der Haut und den Schleimhäuten von Darm, Atemwegen und Lunge – muss sich der Körper mit vielen feindlichen Umwelteinflüssen auseinandersetzen. Deshalb verfügen diese Gewebe über eine Reihe von speziellen Abwehrmechanismen, die eine Barriere gegenüber der Außenwelt bilden.

Intakte Barrieren schützen vor Krankheitserregern

Die Aufrechterhaltung einer Barrierefunktion ist eine der wesentlichen Voraussetzungen für die Existenz komplexer Organismen. Beim Menschen muss die Barrierefunktion an der Haut und insbesondere den Schleimhäuten über Jahrzehnte fehlerfrei aufrecht erhalten werden. Kommt es zu einem Zusammenbruch der Barrierefunktion entstehen chronisch entzündliche Erkrankungen wie atopische Dermatitis (Milchschorf), Asthma, Periodontitis (Wurzelhautentzündung der Zähne), Psoriasis (Schuppenflechte), Sarkoidose (Erkrankung des Bindegewebes) und chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Alle diese Erkrankungen stehen im Fokus des UmweltNetzes. Mittlerweile wird jedoch klar, dass auch viele der Erkran-

kungen, die die inneren Organe betreffen (z. B. koronare Herzerkrankung) ebenfalls mit einer gestörten Barrierefunktion assoziiert sind.

Aus der Epidemiologie und den bislang vorliegenden molekularen Befunden wird klar, dass es sich hier um polygene Erkrankungen handelt. Dies bedeutet, dass nicht nur ein wichtiges Krankheitsgen existiert, sondern viele genetische Faktoren vorliegen müssen, um die Entstehung einer Barriereerkrankung zu begünstigen. In den letzten Jahrzehnten hat die Häufigkeit von umweltbedingten Erkrankungen wie z. B. Asthma und Morbus Crohn stark zugenommen. Das ist ein Hinweis, dass neben genetischen Faktoren auch auslösende Umweltfaktoren, die bislang noch nicht identifiziert wurden, eine entscheidende Rolle spielen.

Interessanterweise treten die meisten der oben genannten Erkrankungen im Erwachsenenalter auf. Damit stellt sich die Frage, warum es mitunter mehrere Jahrzehnte benötigt, bevor es zum Ausbruch der Krankheit kommt.

Gleiche genetische Faktoren bei verschiedenen Krankheiten

Das UmweltNetz geht davon aus, dass die klassische indikationsgetriebene Einteilung der Erkrankungen der Barriereorgane nicht die

ursächlich relevanten molekularen Prinzipien reflektiert. Bereits mit den Mitteln der klassischen Epidemiologie kann man nachweisen, dass einzelne Erkrankungen – wie z. B. atopisches Ekzem und Asthma oder Schuppenflechte und Morbus Crohn – gemeinsam vorkommen. Auch einige der ersten bislang beschriebenen Krankheitsgene sind mit mehr als nur einer Barriereerkrankung assoziiert. So werden sowohl bei Morbus Crohn als auch bei Asthma krankheitsbeeinflussende Genvarianten von *NOD2* gefunden, und Genvarianten von *IL23R* erhöhen gleichzeitig das Risiko für Morbus Crohn und Schuppenflechte. Den scheinbar so unterschiedlichen umweltbedingten Erkrankungen liegen also zum Teil dieselben genetischen Faktoren zugrunde. In Übereinstimmung mit diesen molekularen und epidemiologischen Gemeinsamkeiten wirken bestimmte Therapeutika wie die anti-TNF Therapie gleich bei mehreren Barriereerkrankungen sehr effizient. Das übergreifende Thema des UmweltNetzes heißt daher „Chronisch entzündliche Erkrankungen der Barriereorgane“. Eine erfolgreiche Aufklärung der molekularen Krankheitsursachen wird auch zu einer Veränderung der Behandlungsstrukturen führen.

Krankheitsbezogene Vorgehensweise

Im UmweltNetz wurden die Erkrankungen von verschiedenen Forschungsgruppen bislang zwar mit ähnlichen Vorgehensweisen, aber unabhängig voneinander untersucht. In genetisch-epidemiologischen Experimenten wurde durch Vergleich der Erbinformationen zwischen Hunderten von betroffenen Geschwisterpaaren, der sogenannten Kopplungsanalyse, ermittelt, in welchen Regionen des Erbgutes die Risikogene für chronisch entzündliche Erkrankungen liegen. Dieses Verfahren wird Kopplungsanalyse genannt. Durch einen gezielten und detaillierten Vergleich von bestimmten chromosomalen Regionen zwischen Tausenden von Patienten und Kontrollpersonen konnten dann erfolgreich eine Reihe von Krankheitsgenen identifiziert werden. Die Forschungsgruppen des UmweltNetzes sind inzwischen weltweit führend im Bereich der Entdeckung von Krankheitsgenen.

So fanden NGFN-Wissenschaftler das erste Krankheitsgen, *BTNL2*, bei der entzündlichen Krankheit Sarkoidose. *BTNL2* kodiert für ein Protein, welches in den Zellen des Immunsystems vorkommt. Durch Mutation fehlt diesem Gen eine Region, mit der es normalerweise in der Zellhülle verankert ist. Ohne diese Verankerung kann das Protein seine Funktion nicht mehr erfüllen, und das Abwehrsystem des Körpers gerät aus dem Gleichgewicht. Die Entdeckung des *BTNL2*-Gens ist ein Durchbruch für die klinische Forschung, denn bisher wurde die Krankheit aufgrund der unspezifischen Symptome wie Husten, Gelenkschmerzen und Fieber häufig nicht erkannt. Jetzt hoffen die Wissenschaftler, die Sarkoidose mithilfe der neuen Forschungsergebnisse schon bald besser diagnostizieren zu können.

Drei Krankheitsanlagen nachgewiesen

Auch den genetischen Ursachen der Krankheit Morbus Crohn sind die Forscher viele Schritte nähergekommen. Die Wissenschaftler des UmweltNetzes haben gleich drei Krankheitsanlagen für die chronische Darmerkrankung Morbus Crohn nachgewiesen:

Das Gen *NOD2* kodiert für ein Protein, das bestimmte Bestandteile auf der Bakterienoberfläche erkennt und über eine Kette von biochemischen Reaktionen das Immunsystem mobilisiert. Durch den Austausch einer einzigen Base im *NOD2*-Gen entsteht eine verkürzte Variante des Proteins, die die Bakterien nicht mehr erkennen kann. Die Wahrscheinlichkeit einer

chronischen Darmentzündung steigt dann um einem Faktor bis 40.

Eine Genvariante im *DLG5*-Gen erhöht das Morbus Crohn Risiko um 50 Prozent. Die Mutation verändert *DLG5* an funktionell wichtigen Stellen, so dass sich das betreffende Eiweiß nicht mehr richtig an andere Bausteine des Zellgerüsts anlagern kann. Die Darmzellen halten dann nicht mehr stabil zusammen, und die Schutzfunktion der Darmschleimhaut gegenüber Bakterien und anderen körperfremden Substanzen ist stark beeinträchtigt.

Auch eine Mutation im Gen *ATG16L1* steigert das Risiko deutlich, an Morbus Crohn zu erkranken. Das Gen enthält den Bauplan für ein Protein, welches zu einem zellulären Zerstörungssystem gegen eingedrungene Bakterien gehört.

Weltweit größte DNA Sammlungen

Im UmweltNetz stehen für viele Erkrankungen zudem die weltweit größten DNA Sammlungen zur Verfügung. Das gemeinsame Interesse an Kontrollen (also an einer Gruppe von Personen, die keine Erkrankung haben, aber trotzdem in ihrer Zusammensetzung möglichst genau die Bevölkerung widerspiegeln) hat zunächst zum Auf- und Ausbau von Biobanken innerhalb des UmweltNetzes geführt. Diese sehr großen und ebenfalls auf internationaler Ebene bekannten Biobanken heißen KORA-gen und popgen. Die errichteten Biobanken „versorgen“ mittlerweile auch viele Projekte anderer Netze des NGFN mit Daten und Probenmaterial. Von besonderer Bedeutung ist jedoch der Aufbau populationsrepräsentativer Patientengruppen (Kohorten) im Rahmen der Biobanken. Hier handelt es sich um den Durchschnittspatienten, der mitunter erheblich von den sonst für solche Forschungsprojekte rekrutierten Patienten der Unikliniken abweichen kann. Die in diesen Biobanken vorhandenen Patienten sind daher sehr wichtig für die spätere klinische Umsetzung der genetischen Befunde.

Buchstabentausch mit fatalen Folgen

Mithilfe von sogenannten SNP-Chips können jetzt erstmalig bis zu einer Million Einzelbasenpolymorphismen (engl.: single nucleotide polymorphism, SNPs [[> Glossar](#)]) reproduzierbar pro Patient untersucht werden. Einzelbasenpolymorphismen sind winzige genetische Variationen im Erbgut. Die Unterschiede beru-

hen meistens auf dem Austausch nur eines Buchstabens im DNA Alphabet, was aber fatale Folgen haben kann. Denn wenn der Basenaustausch in einem Gen liegt, beeinflusst er das Genprodukt und kann die Wahrscheinlichkeit eines Krankheitsrisikos erhöhen. Das Chip-Experiment wird bei Tausenden von Patienten und Kontrollpersonen durchgeführt. So kann man auf einen erheblichen Teil der krankheitsrelevanten genetischen Information zugreifen und die für die Erkrankung relevanten Krankheitsgene direkt und ohne Umwege entdecken. Hier findet derzeit ein Wettlauf zwischen den verschiedenen internationalen Programmen statt, bei dem es um die erstmalige Entschlüsselung von Erkrankungen geht. Obwohl der Aufwand gewaltig ist (vergleichende Untersuchung von Tausenden Patienten und Kontrollen) werden in verschiedenen Nationen (insbesondere USA, England, Frankreich) sehr hohe Beträge in diese Projekte investiert. Das UmweltNetz ist an vorderster Front dabei und hat diese Technologien bereits einer Nutzung zugeführt. Zugleich ermöglichen es die neuen Technologien, Forschungsergebnisse auch zwischen den einzelnen Erkrankungen direkt zu vergleichen. Das bedeutet nicht nur die Analyse jeder Barriereerkrankung für sich selbst sondern auch die gemeinsame Analyse aller Patienten aus den verschiedenen Erkrankungsbereichen des UmweltNetzes, um z. B. generelle Entzündungsgene zu finden.

Bei der Aufklärung der funktionellen Konsequenzen von mit Krankheit assoziierten Genvarianten ist es ebenfalls zu einem Technologiewechsel gekommen: siRNAs [small interfering RNAs [> Glossar](#)] sind kurze doppelsträngige RNA-Fragmente, die die Expression ein oder mehrerer Gene spezifisch blockieren können. Seit kurzem können in Zellkulturexperimenten alle Gene des Menschen mithilfe künstlich erzeugter siRNAs schrittweise ausgeschaltet werden. Dazu müssen Experimente unter erheblichem Zeit- und Kostenaufwand automatisiert und siRNA Bibliotheken zu einem hohen Preis angeschafft werden.

Übergreifende Entzündungsgene gesucht

Mit einer Fördermaßnahme durch das BMBF wurden 2006 vielen Projekten des NGFN die ersten SNP-Chips zur Verfügung gestellt. Die entsprechenden Experimente – an einer zunächst kleinen Anzahl von 500 Patienten – werden jetzt in den einzelnen Erkrankungsbereichen des UmweltNetzes parallel und aufein-



Abb. 1: Roboter zur genetischen Untersuchung von Tausenden von Patientenproben.



Abb. 2: Automatische Zellkulturplattform für siRNA-Studien.

ander abgestimmt durchgeführt. Ziel ist es, nicht nur für jede der Erkrankungen möglichst alle Krankheitsgene zu identifizieren, sondern auch die Datensätze so zusammenzuführen, dass generell wichtige, übergreifende Entzündungsgene gefunden werden können.

In der Zukunft will das UmweltNetz diese Vorgehensweise ausbauen und, aus statistischen Gründen, die SNP-Chip gestützte Erkundung der vollständigen Krankheitsgen-Sätze in deutlich größeren Kohorten fortführen. Wichtig ist hier vor allem die Bestätigung der bereits an der ersten Tranche der SNP-Chips gemachten Befunde. Typischerweise führen Experimente, bei denen bis zu einer Million verschiedene Polymorphismen getestet werden, auch zu falsch positiven Resultaten. Nur durch die Bestätigung der Ergebnisse eines solchen Experimentes mit sehr großen, weiteren Patientens Stichproben können daher falsch positive Befunde von den echten Krankheitsgenen getrennt werden. Hier wird das UmweltNetz mehr als 22 000 SNPs in mehr als 20 000 Entzündungspatienten in einer großen, parallelen Nachverfolgung in sieben entzündlichen Krankheitsbildern untersuchen.

Auch in den auf diese Weise identifizierten Krankheitsgenen ist oft nicht klar, wo die ursächlichen Veränderungen in der genetischen Sequenz liegen. Eine vergleichende Sequenzierung bei Tausenden von Patienten ist daher notwendig. Auch hier sind neue Technologien verfügbar, die diesen Durchsatz erst ermöglichen. Mit ultraschnellen Sequenzierern, die mit Fördermitteln des BMBF und der DFG finanziert wurden, können mehrere Gigabasen (d. h. mehrere Milliarden Buchstaben des ge-

netischen Alphabets) in einem einzigen Lauf der Instrumente sequenziert werden.

Auch für die funktionellen Nachfolgeuntersuchungen, mit denen herausgefunden werden soll, wie Krankheitsgene zu den molekularen und morphologischen Veränderungen führen, die der Arzt dann als Krankheit definiert, wird breit vorgegangen. Zur Untersuchung der bislang aufgedeckten Krankheitsgene wurden mehr als 30 genetisch modifizierte Mauslinien hergestellt, die derzeit als Modellsysteme evaluiert und untersucht werden. Genomweite siRNA Experimente sind geplant, in denen in Zellkulturen schrittweise jedes Gen ausgeschaltet wird, um die von den Krankheitsgenen ausgehenden Stoffwechselwege zu identifizieren. Dazu stehen große siRNA-Bibliotheken zur Verfügung, die in gemeinsamen Projekten mit dem DKFZ in Heidelberg eingesetzt werden.

Ausblick

Die Komplettierung der genetischen Risikokarte der entzündlichen Barriereerkrankungen zu einem klinisch nutzbaren Instrument bedarf der Aufdeckung sämtlicher relevanter Krankheitsgene. Diese kann nur durch die oben dargestellten systematischen Studien erfolgen. In großen Konsortien sollte sowohl an hinreichend großen Patientenkollektiven innerhalb der Indikation (z. B. Morbus Crohn) als auch indikationsübergreifend (alle entzündlichen Barriereerkrankungen zusammen) gearbeitet werden. Dabei ist die Bewertung sämtlicher Risikovarianten in den entdeckten Krankheitsgenen wichtig. Neue Techniken der Ultra-Hochdurchsatzsequenzierung werden dieses auch in

großen Populationen ermöglichen. Die Schaffung von Tiermodellen, die die polygene Veranlagung der Patienten widerspiegeln, ist sicherlich die nächste Priorität, um die resultierende Pathophysiologie zu verstehen.

Im Bereich der entzündlichen Barriereerkrankungen ist die Maus möglicherweise nicht der am besten geeignete Modellorganismus. Entwicklungsgeschichtlich einfachere Organismen (z. B. Hydra) unterliegen einer erheblich intensiveren Auseinandersetzung an Barriereoberflächen. Sie werden es zudem erlauben, die evolutionäre Entstehung von krankheitsrelevanten Varianten gezielt zu verstehen. In jedem Fall wird es instrumentell wichtig sein, die technologischen Fortschritte und den hohen Automatisierungsgrad im Bereich der Aufdeckung genetisch-ursächlicher Prinzipien auch im Bereich der funktionellen Nachverfolgung zu erreichen.

Eine klinische Nutzung der genetischen Information kann wahrscheinlich erst bei weiterer Vervollständigung der genetischen Risikokarte etabliert werden. Sie bedarf der Entwicklung und des Nachweises eines durch Kenntnis der genetischen Informationen verbesserten diagnostischen oder therapeutischen Vorgehens. Dazu sind prospektive klinische Studien und insbesondere Biobanken wie popgen oder KORA-gen notwendig.

Kontakt

Gunda Boehm
Institut für klinische Molekularbiologie
 Schittenhelmstraße 12, 24105 Kiel
 E-Mail: ngfn@mucosa.de

Systematisch Methodische Plattformen (SMP)

Regulatorische Netzwerke verstehen, Krankheitsprozesse untersuchen

Plattform „Systematische Sequenzierung und Analyse von Sequenzvarianten“

Ralf Sudbrak, Ulrich Barenbrock, Hans Lehrach

Das Grundkonzept, das einer Reihe der Plattformen im Nationalen Genomforschungsnetz zugrunde liegt, ist der Informationsfluss aus dem Genom (Plattform DNA) über epigenetische Modifikationen (Plattform Epigenetik) zu RNA (Plattform RNA, RNAi), den Proteinen (Plattformen Protein, Antikörper) und zum Phänotyp (Plattform Zellen, Modellorganismen, klinische Projekte). Dieser Informationsfluss entspricht einem Rechenprozess, in dem der Phänotyp (einschließlich Krankheiten und Krankheitsneigungen) aus der Information im Genom und der Umgebung bestimmt wird. Die Systematische Methodische Plattform DNA „Systematische Sequenzierung und Analyse von Sequenzvarianten“ hat dabei spezifisch die Aufgabe, die Sequenz des Genoms, die molekularen Mechanismen der Verarbeitung dieser Sequenz in selektive Transkription sowie die Bedeutung der Variation dieser Sequenz auf den Phänotyp des Organismus zu untersuchen. Verglichen mit NGFN-1 entspricht sie der Zusammenlegung zweier Themenkreise, der genomischen Sequenzierung und der Genotypisierung. Dies erklärt die große Anzahl an Teilprojekten, die vom Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik koordiniert werden. Die 20 Subprojekte sind in fünf thematischen Blöcken organisiert.

- 1: Genomevolution und Sequenzierung
- 2: Analyse von regulatorischen Netzwerken
- 3: Genetische Variation im Menschen und in Modellorganismen
- 4: Molekulare Krankheitsmechanismen
- 5: Nationale Genotypisierungsplattform

Die Hauptziele der SMP DNA sind zum einen die Genomanalyse sowie die Analyse der Gene

und ihrer Promotorelemente, um die regulatorischen Netzwerke zu verstehen, deren Störungen sich in vielen Erkrankungen manifestieren, zum anderen die Etablierung von Genotyp-Phänotyp-Beziehungen unter besonderer Berücksichtigung der Identifizierung von krankheitsverursachenden Genen und damit die Analyse von Krankheitsprozessen.

Vergleich Mensch und Schimpanse

Der Sequenzierung des menschlichen Genoms verdanken wir genaue und weitreichende Informationen über die Komplexität biologischer Prozesse. Die Evolution der genomischen Sequenz gibt uns wichtige Anhaltspunkte über genetische Mechanismen, die für die Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies verantwortlich sind. Besonders interessant ist der Vergleich zwischen dem Genom des Menschen und dem seines nächsten Verwandten, des Schimpansen (*Pan troglodytes*). Während sich die vergleichende Genomforschung zwischen relativ weit voneinander entfernten Organismen (evolutionäre Distanz zwischen Mensch und Maus: 60 Millionen Jahre) darauf konzentriert, Übereinstimmungen zwischen den Arten zu finden, führt der Vergleich mit dem Schimpansengenom (evolutionäre Distanz: etwa fünf bis sechs Millionen Jahre) zu wissenschaftlich greifbareren Unterschieden.

Ziel ist, die molekulare Basis jener evolutionären Veränderungen zu entschlüsseln, die zu zwei Organismen mit klaren Unterschieden in Phänotyp und Verhalten geführt haben. Dadurch hoffen wir, nicht nur Informationen über die Funktion von Genen und regulatorischen Sequenzbereichen zu erhalten, sondern auch etwas über die biologischen Mechanis-



Abb. 1: Der Schimpanse *Pan troglodytes*, unser nächster Verwandter.

men zu lernen, die für Eigenschaften verantwortlich sind, die den Menschen von allen anderen Lebewesen unterscheiden, wie z. B. Intelligenz und Sprache. Darüber hinaus möchte man herausfinden, welche genetischen Unterschiede zur veränderten Empfänglichkeit für Krankheiten geführt haben. Die drei deutschen Sequenzierungszentren (FLI Jena, HZI Braunschweig, MPIMG Berlin) haben in der ersten Phase des NGFN in einer asiatisch-deutschen Zusammenarbeit das zum menschlichen Chromosom 21 äquivalente Schimpansenchromosom 22 mit bisher unerreichter Genauigkeit sequenziert, analysiert und verglichen. Diese Zusammenarbeit der drei deutschen Zentren wurde in der zweiten Förderphase auf die Entschlüsselung der genetischen Information von großen Teilen des Chromosoms X des Schim-

pansen ausgedehnt. Das X-Chromosom ist wegen seiner großen Anzahl an Genen, die mit Erbkrankheiten in Verbindung gebracht werden, von besonderem medizinischen Interesse.

Diese Arbeiten stellen eine sinnvolle Ergänzung zum amerikanischen Schimpansen-genomprojekt dar, in dem das Geschlechtschromosom X zu 50 % unterrepräsentiert ist, da von dem amerikanischen Konsortium die DNA eines männlichen Schimpansen entschlüsselt wird. Ein weiteres Argument für die Auswahl des X-Chromosoms als lohnendes Forschungsprojekt ist die lange Tradition und damit erworbene Expertise, die die deutsche Wissenschaftsgemeinschaft auf diesem Gebiet vorzuweisen hat. In diesem Projekt ist die Generierung der Rohdaten weitestgehend abgeschlossen, und die vergleichende Analyse mit der humanen Version wird in Kürze vorliegen. Ein weiterer Fokus des FLIs und des MPIMGs lag in der Beteiligung an der Analyse des menschlichen X-Chromosoms, dessen endgültige Sequenz in der zweiten Phase des NGFN veröffentlicht wurde. In diesem Zeitraum wurden unter deutscher Beteiligung zudem die Analysen der menschlichen Chromosomen 3 (MPIMG) und 8 (FLI) fertiggestellt. Alle diese Arbeiten wurden in der Fachzeitschrift *Nature* veröffentlicht.

Eine Pipeline zur Analyse von Promotoren

Alle biologischen Prozesse werden von genetischen Netzwerken reguliert, und die Regulation der Transkription ist davon ein wesentlicher Bestandteil. Dabei interagieren DNA-bindende Proteine (Transkriptionsfaktoren) mit DNA-Elementen der Promotorregionen. Spezifische Wechselwirkungen der Transkriptionsfaktoren mit den im Wesentlichen vor dem RNA-kodierenden Bereich liegenden Promotorsequenzen vermitteln den Start der Transkription durch die RNA-Polymerase und regulieren die Expression der entsprechenden Gene. Um die Funktion von regulatorischen Netzwerken systematisch untersuchen zu können, wurde eine Promotor-Analyse-Pipeline etabliert. Mensch- und Maus-Promotorregionen mit einer Länge von ca. 2 500 Basenpaaren aufwärts von der Transkriptionsstartstelle wurden in Reporter-genvektoren [[> Glossar](#)] kloniert und für funktionelle Analysen eingesetzt.

Im SMP DNA-Projekt „Promotor Informatik“ wurden eine zentrale Datenbank sowie eine Analyse-Pipeline mit einer benutzer-

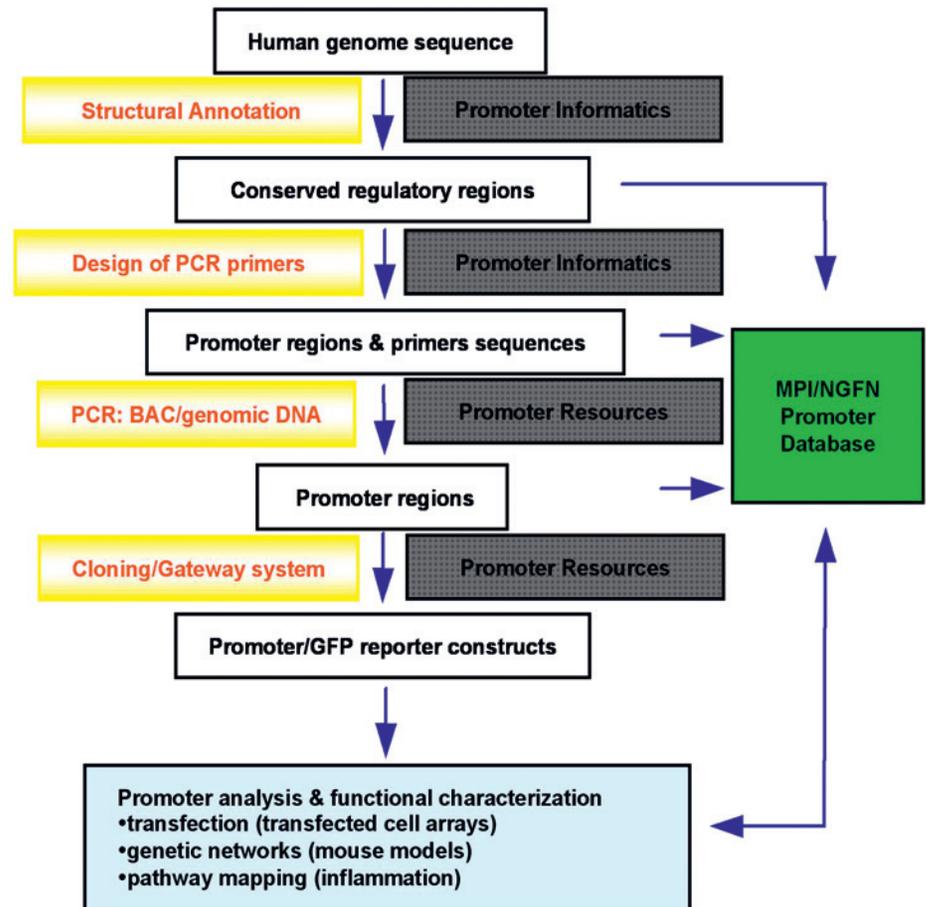


Abb. 2: Überblick über die Promotor-Analyse-Pipeline und deren Interaktionen.

freundlichen Schnittstelle für Promotorinformationen und Annotationen (aufgrund von Sequenzähnlichkeiten und typischen DNA-Elementen mithilfe von Computern vorhersagbaren Gensequenzen) entwickelt (<http://promotion.molgen.mpg.de>). Dies gewährleistet einen kontinuierlichen Informationsfluss von experimentellen Untersuchungen und Computervorhersagen. Im SMP DNA-Projekt „Promotor Ressource“ wurden außerdem Protokolle für die Hochdurchsatz-Vervielfältigung von Promotorregionen und deren Klonierung in Reporter-genvektoren optimiert. Die Erfolgsrate liegt bei über 80 % und zwischenzeitlich wurden mehr als 1 200 Promotorregionen amplifiziert, die nun als Promotor-Reporter-genkonstrukte kloniert werden. Im Rahmen des Projektes „Funktionelle Promotor Analyse“ werden die auf dem Chromosom 21 lokalisierten Promotoren funktionell in unterschiedlichen Zellen untersucht. Von 180 dieser Promotoren waren über 60 in Hek293 Zellen, einer vergleichsweise einfach zu handhabenden Zelllinie aus menschlichen embryonalen

Nierenzellen, unterschiedlich aktiv.

In einem weiteren Projekt „Funktionelle Promotor Analyse in der Maus“ werden Promotoraktivitäten in der Maus analysiert. Dazu werden Reporter-genkonstrukte in embryonale Stammzellen (ES) der Maus integriert, um aus den ES-Zellen genetisch veränderte Tiere zu erzeugen. Zurzeit werden 21 verschiedene Promotorkonstrukte untersucht.

Diese Arbeiten werden durch mehrere andere Ansätze vervollständigt, die die Struktur und Funktion derselben Promotoren innerhalb anderer NGFN-Plattformen untersuchen. So wird innerhalb der Plattform Epigenetik eine systematische Analyse der Methylierungsmuster der Chromosom 21-Promotoren, unter anderem auch in der Hek293-Zelllinie, durchgeführt. Als Teil der RNAi Plattform wird erforscht, welche Auswirkungen sich für das Expressionsmuster der Hek293 Zellen ergeben, wenn bestimmte Transkriptionsfaktoren mithilfe der RNAi-Technologie ausgeschaltet werden. Innerhalb der Proteinplattform wird die Bindung *in vitro* synthetisierter Transkriptions-

faktoren an verschiedene Promotorsequenzen untersucht.

Variation in Menschen und Modellorganismen

Um in der Lage sein zu können, einen bestimmten Phänotyp mit einem Genotyp zu korrelieren, müssen wir die Variationen der Genome verstehen, und zwar sowohl bei gesunden Kontrollen als auch in Patienten. Dieser Block der SMP DNA etabliert genaue Haplotypinformation [[> Glossar](#)] vornehmlich in gesunden Kontrollen und nur in einem begrenzten Maße in Patienten. Hierzu wurde eine Referenzressource bestehend aus Bibliotheken der gesamten haploiden Genome von mehr als 200 Individuen aus einer repräsentativen Stichprobe (popgen-Kohorte) generiert und genotypisiert. Sie dient nun als Fundament für die Bestimmung der molekularen Haplotypen von chromosomalen Regionen und Kandidatengen. Ergänzend wurde eine hochdichte Haplotypkarte des Rattengenoms erstellt. Bisher wurden 50 000 hochqualitative genetische Varianten (SNPs) erfasst und davon über 2 000 in den entsprechenden Abschnitten auf Chromosom 21 des Menschen lokalisiert, von denen etwa die Hälfte in 50 Rattenstämmen genotypisiert wurden. Die Ratte ist das wichtigste Modell für Forschungsarbeiten auf den Gebieten der Physiologie, Pharmakologie und Toxikologie.

Molekulare Krankheitsmechanismen

In diesem Block der SMP DNA werden humangenetische und onkologische Fragestellungen durch verschiedene methodische Ansätze angegangen. Die hier untersuchten Genotyp-Phänotyp-Korrelationen basieren unter anderem auf größeren Veränderungen innerhalb des Genoms von Patienten. Aufbauend auf eigenen Technologieentwicklungen wurde ein Verfahren entwickelt, mit dem man ermitteln kann, ob bestimmte Bereiche der genomischen DNA vervielfältigt wurden oder verlorengegangen sind, der sogenannter Matrix-CGH Microarray. Dieses Verfahren wurde für onkologische sowie humangenetische Fragestellungen eingesetzt. Dabei wurden mehrere molekulare Marker zur Prognose von Krebskrankheiten (u. a. für Medulloblastome, Ependyome) identifiziert und mithilfe weiterer Nachweismethoden in großen Patientengruppen überprüft.

Auf den menschlichen Chromosomen gibt es bestimmte Regionen, an denen auffällig

häufig Brüche auftreten. Gelegentlich werden solche Brüche falsch gekittet, so dass sich ein Chromosomenarm oder ein Chromosomenabschnitt mit einem anderen Chromosom verbindet (Translokation). Solche Stellen, bei denen das betreffende Chromosom ein vorherbestimmtes Risiko zum Bruch besitzt, werden mithilfe der sogenannten Bruchpunktanalyse untersucht. So konnten bei Patienten mit geistiger Behinderung mehrere neue Krankheitsgene identifiziert werden, die an Bruchpunkten liegen. Als methodische Neuerung wurde diese Bruchpunktanalyse durch Sequenzierung sortierter Translokationschromosomen mithilfe der neuen Sequenzieretechnologien etabliert.

Innerhalb der SMP DNA wurde eine Hochdurchsatz-Resequenzierungsplattform etabliert, die hauptsächlich Resequenzierungsprojekte medizinisch und pharmakologisch relevanter Gene in Zusammenarbeit mit den klinischen Netzwerken durchführt. Mit der Methode des Resequenzierens ist ein direkter Vergleich der genomischen Sequenzen von Patienten und Kontrollen möglich. Auf diese Weise wurden mehrere Genvariationen als Krankheitsursachen identifiziert. Die SMP DNA verfügt außerdem über eine populationsbasierte Sammlung von Lymphoblasten-Zellkulturen sowie enzymatische Nachweisverfahren zur Charakterisierung von Patienten mit unbekanntem Defekten des Energiestoffwechsels. Hierbei konnten u. a. Mutationen im *ETFDH*-Gen bei Patienten identifiziert werden, die an einem Mangel an dem vitaminartigen Nährstoff Q10 leiden. Diese Ergebnisse werden in die MitoP2-Datenbank (mitochondriale Proteomdatenbank) eingegeben, die Informationen zu kernkodierten mitochondrialen Genen, Proteinen und Erkrankungen enthält.

Nationale Genotypisierungsplattform

Im Mittelpunkt der Arbeiten des NGFN steht die Erforschung der genetischen Ursachen von häufigen Krankheiten, den sogenannten Volkskrankheiten. Hierzu werden phänotypische und genetische Daten der Patienten in Bezug zueinander gesetzt. Der erste Schritt bei der Identifizierung von Krankheitsursachen besteht darin herauszufinden, auf welcher spezifischen chromosomalen Region sich ein Genort befindet, der innerhalb von Familien mit einer Erkrankung mitvererbt wird. Dieser Ansatz benötigt substanzielle Ressourcen für die Hochdurchsatz-Genotypisierung. Deshalb

wurde ein Konsortium aus den führenden Genotypisierungszentren Deutschlands gegründet, die die Nationale Genotypisierungsplattform bilden. In dieser Plattform ist die gesamte Palette an existierenden Genotypisierungstechnologien abgedeckt, so dass für jedes individuelle Projekt das optimale Set-up ausgewählt werden kann. Aktuell wird das Portfolio erweitert, indem eine neue Hochdurchsatz-Sequenzieretechnologie der nächsten Generation etabliert wird. Die Nutzung der zur Verfügung gestellten Kartierungs-Pipeline resultierte in der Identifizierung einer großen Anzahl an Genen, die für monogene Erkrankungen verantwortlich gemacht werden konnten. Darüber hinaus wird dieser Ansatz auch vermehrt für genomweite Assoziationstudien genutzt, um Suszeptibilitätsgene (Gene, die die Empfänglichkeit für eine genetische Schädigung erhöhen) für häufige Erkrankungen durch Kopplungsungleichgewichtsanalysen zu lokalisieren. Es konnten genetische Varianten für mehrere komplexe Erkrankungen identifiziert werden, u. a. solche, die für ein höheres Risiko bei der Cholelithiasis (Gallensteinleiden) und dem Restless-Legs-Syndrom (neurologische Erkrankung, „unruhige Beine“) verantwortlich sind.

Die Teilprojekte der SMP DNA beleuchten – von verschiedenen Richtungen und mit einer Vielzahl verschiedener technischer Ansätze – die Prozesse, die selektiv die Information des Genoms auslesen, und die Übersetzung der Variation dieser Information in den Phänotyp des Organismus. Sie haben alle das gemeinsame Ziel, Gene und deren Funktionen verstehen zu lernen, um mit diesem Wissen Krankheiten besser diagnostizieren, therapieren und schlussendlich heilen zu können. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden fundamentale Grundlagen, wertvolle Ressourcen und eine äußerst effiziente Infrastruktur geschaffen, auf die die wissenschaftliche Gemeinschaft auch in Zukunft zurückgreifen kann.

Kontakt

Ralf Sudbrak

[Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik](#)

Ihnestraße 63-73, 14195 Berlin

E-Mail: sudbrak@molgen.mpg.de

Ein Programm für jeden Zelltyp

Analyse der epigenetischen Interpretation der genetischen Information des Menschen

Michaela Schanné, Yasser Riazalhosseini, Verena Beier, Herman-Josef Gröne, Andreas Waha, Matthias Schuster, Peer Stähler, Frank Lyko, Jörg D. Hoheisel

Auf etwa vier Prozent der Cytidine im menschlichen Genom folgt in der DNA-Sequenz direkt ein Guanosin. Gemeinsam bilden sie ein sogenanntes CpG-Dimer – das „p“ repräsentiert in dieser Schreibweise die Phosphatbrücke zwischen den beiden Nucleosiden. Die Cytosine in einem solchen Dimer können durch zelluläre Enzyme an ihrer Kohlenstoff-5-Position methyliert und demethyliert werden. In Synergie resultiert daraus ein Methylierungsmuster der gesamten DNA. Dieses Muster repräsentiert das epigenetische Programm des Genoms, das die Interpretation der genetischen Information in der Zelle bestimmt. Verschiedenartige Zelltypen unterscheiden sich durch ihr spezifisches epigenetisches Programm. Aber auch jede Person besitzt, neben vielen Gemeinsamkeiten mit Anderen, individuelle Merkmale. Die Differenzen im epigenetischen Programm beeinflussen unter anderem die Aktivität der Gene und erzeugen somit Unterschiede im Expressionsmuster.

Den Methylierungscode knacken

Häufig wird beim Auftreten von Krankheiten ein verändertes Methylierungsmuster beobachtet. So weichen etwa Tumorzellen in

ihrem epigenetischen Programm von normalen Zellen ab. Allerdings ist in vielen Fällen noch nicht eindeutig geklärt, inwieweit die Veränderungen ursächlich für die Erkrankung sind oder als Reaktion darauf entstehen. Unabhängig davon ist eine Analyse der krankheitsbedingten Veränderungen für die Diagnostik in jedem Fall von großem Wert. Im Vergleich zu anderen molekularen Diagnosemethoden birgt eine Analyse epigenetischer Unterschiede wesentliche Vorteile in sich. DNA ist stabiler als RNA oder Proteine und stellt deshalb ein robustes Medium für Nachweisverfahren dar. Außerdem kann eine Untersuchung an sehr geringen Ausgangsmengen erfolgen, da DNA amplifiziert werden kann. Gleichzeitig ist die Änderung der epigenetischen Muster zwar ein dynamischer Prozess, wodurch die diagnostisch wichtigen Unterschiede überhaupt entstehen, die Veränderungen sind jedoch nicht so rasch, als dass ihr Nachweis dadurch erschwert wird. Auch ist Methylierung als eine chemische Modifizierung der Cytosine stabil und wird während der Probenvorbereitung nicht verändert.

Es existieren verschiedene Methoden, Variationen in der DNA-Methylierung zu untersuchen. Eine davon – die Behandlung der DNA

mit Natriumbisulfit – macht grundsätzlich eine Analyse mit einer basengenauen Auflösung möglich. Durch die chemische Reaktion mit dem Natriumbisulfit wird jedes unmethylierte Cytosin zu Uracil umgewandelt. In der üblicherweise darauf folgenden Amplifikationsreaktion wird aus dem Uracil ein Thymin. Ein methyliertes Cytosin reagiert dagegen nicht mit Natriumbisulfit und wird nicht umgewandelt. So werden durch eine chemische Reaktion gezielt methylierungsabhängige Einzelbasen-Unterschiede (Polymorphismen) eingeführt, die mittels Sequenziermethoden gelesen werden können. Durch den Vergleich mit der Originalsequenz werden auch die demethylierten Cytosine eindeutig identifiziert.

Die Plattform

Die in der SMP Epigenetik vereinten Gruppen bilden einen Bogen von der Grundlagenforschung bis zur Anwendung und dokumentieren die Möglichkeiten translationaler Forschung, einer Vernetzung der komplementären Interessen von Partnern verschiedener Ausrichtung mit gleichzeitig ausreichend überlappenden Expertise und Kompetenz. Ein Teil der akademischen Gruppen – Bremen, Berlin, Jena und

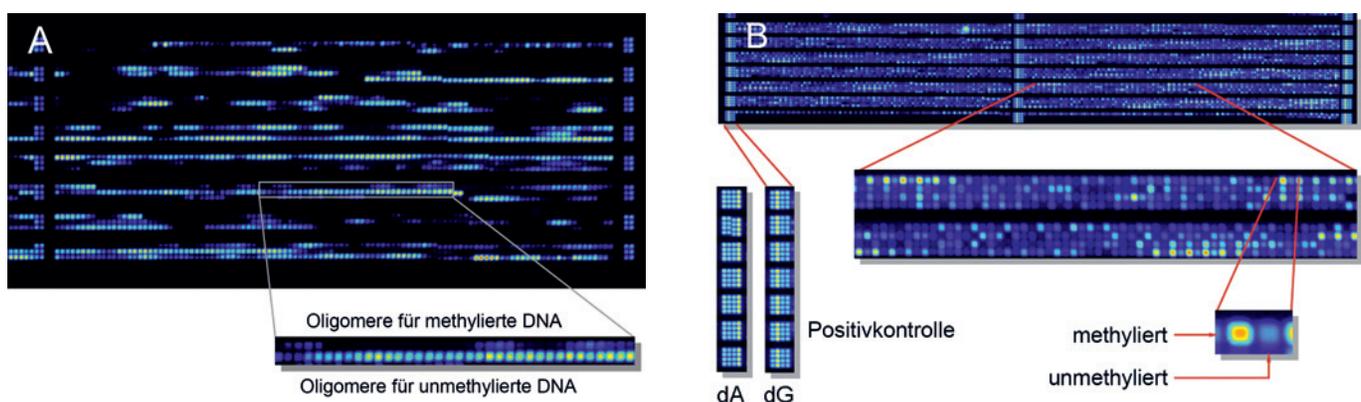
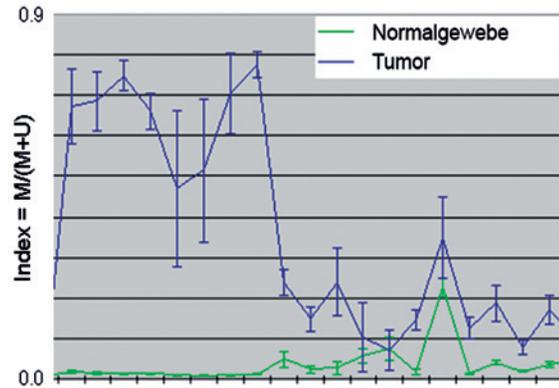


Abb. 1. Typische Ergebnisse von Analysen des Methylierungsmusters. Das linke Bild (A) zeigt das Signalmuster einer unmethylierten DNA als Negativkontrolle. Nach Aufbringen der fluoreszenzmarkierten DNA erfolgt die Bindung an Oligonukleotide auf dem Chip, die die unmethylierte Form der DNA repräsentieren. Dagegen entstand an den Oligomeren, an die methylierte DNA binden würde, nur Hintergrundsignal. Im rechten Bild (B) ist anhand einer unmethylierten DNA das Ergebnis eines alternativen Verfahrens Microarray-Technologie gezeigt. Durch eine Kombination der Hybridisierung mit einer nachfolgenden Primerverlängerungsreaktion werden die Genauigkeit und der Durchsatz der Analyse wesentlich verbessert.

Abb. 2. Methylierungsgrad individueller CpG-Dimere in einer Promoter-Region. Während die Methylierung in den Zellen aus normalem Gewebe unter 10% liegt, zeigt etwa die Hälfte der CpG-Dimere eine Methylierung in durchschnittlich etwa 80% der Zellen, die aus entsprechendem Tumorgewebe isoliert und gemeinsam analysiert wurden, während gleichzeitig bei der anderen (rechten) Hälfte keine signifikanten Unterschiede zu sehen sind.



10% beträgt, liegt sie im Tumor für die Hälfte der Methylierungsstellen bei etwa 80%. Die gewonnenen Daten werden in Kombination mit klinischer Information und den Ergebnissen anderer molekularer Analyseformen – wie etwa transkriptionellen Studien – durchgeführt, um durch das Zusammenführen verschiedener molekularer Ebenen eine erhöhte Genauigkeit der Diagnose zu erzielen. Für einige Tumorformen wurden so innerhalb der SMP Epigenetik bereits die Grundlagen für eine epigenetische Einteilung und Charakterisierung gelegt.

Neben dem medizinisch relevanten Nutzen wird durch die Ergebnisse gleichzeitig das Verständnis über die funktionellen Zusammenhänge zellulärer Aktivität verbessert. So ist beispielsweise bekannt, dass gerade eine Methylierung des CpG-Dimers bereits bei den normalen physiologischen Bedingungen in einer Zelle zu einer wesentlichen Veränderung der dreidimensionalen DNA-Struktur führt. Zur gleichen Zeit wird die DNA aber auch anfällig für Deletionen. Da CpG-Dimere gehäuft in den regulativ wichtigen Promoter-Regionen von Genen auftreten, während sie in anderen Genombereichen stark unterrepräsentiert sind, ist ihr Beitrag offenkundig wichtig für die Kontrolle der Genaktivität. Eine Änderung der dreidimensionalen Struktur der DNA verursacht häufig eine Änderung des Bindungsverhaltens von Proteinen wie etwa Transkriptionsfaktoren. Eine Analyse der Interaktionen CpG-reicher DNA-Bereiche mit relevanten Proteinen wird die fundamentale Funktion der DNA-Methylierung bei zellulären Veränderungen weiter offenlegen.

Weiterführung und Perspektiven

Neben einer Weiterführung innerhalb der Folgeprojekte des NGFN-Programmes und der Aktivitäten im kommerziellen Bereich durch die am Projekt beteiligten Firmenpartner wurden durch die Plattform auch internationale Projekte im Bereich Epigenetik angestoßen. So ist beispielsweise eine epigenetische Analyse des Probenmaterials von vielen hundert Tumorpatienten ein wichtiger Teil einer breit angelegten, von der Europäischen Union finanzierten Studie zur molekularen Charakterisierung des Pankreaskarzinoms. Für Pankreaskrebs besteht zurzeit keine echte Therapiemöglichkeit und die Mortalität ist quasi identisch mit der Zahl der Erkrankungen. Hauptziel ist deshalb eine Frühdiagnose der Tumorentstehung, die die Heilungschancen wesentlich erhöhen wird. In Kombination mit Entwicklungen zur Beeinflussung

Saarbrücken – sequenzierten systematisch die Methylierungsstellen des Chromosoms 21, um einen grundlegenden Standard zu definieren (siehe GenomXPress 03/07, S.14-16).

Die Gruppen in Bonn und Heidelberg verwenden microarraybasierte Analysen zur Identifikation krankheitsrelevanter Methylierungsstellen. Eines dieser Verfahren basiert auf Oligonukleotid-Microarrays. Bei der hochauflösenden Analyse werden die Oligonukleotide auf den Microarrays mit der Geniome One Technologie synthetisiert. Für jedes CpG-Dinukleotid gibt es zwei Sequenz-Variationen der Sonden: für den methylierten Status enthalten die Sonden die Sequenz CG, für den unmethylierten Status dagegen die Sequenz TG. Für die Hybridisierung wird genomische DNA aus dem zu untersuchenden Gewebe isoliert und mit Natriumbisulfid behandelt. Anschließend werden die Gene bzw. Regionen von Interesse mittels PCR amplifiziert und mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z. B. Cy3) markiert. Die Produkte binden auf den Microarrays entweder an die Oligonukleotide für methylierte DNA oder an Oligonukleotide, die die nicht-methylierte DNA repräsentieren. Nach der Hybridisierung der markierten Probe werden die resultierenden Fluoreszenzsignalintensitäten ermittelt (Abb. 1A). Für die Ermittlung des Methylierungsstatus jedes CpG-Dinukleotids werden die Signalintensitäten der zugehörigen Sonden analysiert.

Alternativ zur Hybridisierung mit methylierungsspezifischen Oligonukleotiden kann auch eine Primer-Verlängerungsreaktion (Primer Extension Reaction) durchgeführt werden, um den Methylierungsstatus von CpG zu analysieren. Bei dieser Methode hybridisieren die Primer direkt neben der zu untersuchenden Base. Nach Inkubation mit markierten Dideoxynukleotiden wird das passende Nukleotid durch die Polymerase eingesetzt und kann über die spezifische Markierung detektiert werden

(Abb. 1B). Dieses Verfahren ist sehr robust und die Zahl der Analysen auf einem Array kann deutlich vergrößert werden.

Untersuchung krankheitsbedingter Veränderungen

In Kooperationen innerhalb und außerhalb des NGFN-Programmes wurde eine Reihe von Geweben auf krankheitsbedingte Veränderungen des epigenetischen Musters untersucht. Ein Schwerpunkt lag dabei auf der Analyse von Tumoren, unter anderem Lungen-, Pankreas- und Brustkrebs. Neben ihrer klinischen Relevanz erleichtern Tumorgewebe eine epigenetische Analyse dadurch, dass die Mehrzahl der Cytosine in CpG-Dimeren im Gewebe entweder stark methyliert oder nur schwach methyliert vorliegen. Ein individuelles Cytosin kann natürlich nur in methylierter oder unmethylierter Form vorliegen, sprich das Ergebnis einer Analyse entspricht einer Ja- oder Nein-Antwort. In den vielen einzelnen Zellen eines Gewebes kann es jedoch Unterschiede in der Methylierung der gleichen Basenposition geben, so dass das Gesamtergebnis grundsätzlich jeden Wert zwischen 0 und 100 Prozent annehmen kann. Die starken Unterschiede für eine Vielzahl von CpG-Dimeren in Tumorgeweben erleichtern natürlich eine Diagnosestellung.

In Abbildung 2 ist das Ergebnis einer solchen Analyse für einen Promoterbereich gezeigt. Diese Daten veranschaulichen auch die Notwendigkeit, die ersten Analysen mit möglichst hoher Auflösung durchzuführen. Wäre für den gezeigten Bereich nur ein CpG ausgewählt worden, das in der rechten Hälfte liegt, wäre kein Unterschied zwischen Tumor und Normalgewebe zu erkennen. Nach einer Identifizierung der informativen CpGs kann für eine Diagnose die Anzahl der Dimere reduziert werden. Gleichzeitig ist in dem Beispiel die Größe des Unterschieds eindeutig. Während die Methylierung im Normalgewebe durchgehend etwa

sung des zellulären epigenetischen Programmes, die u. a. durch den SMP Epigenetik Projektpartner Frank Lyko vorangetrieben werden, bildet eine Evaluation des Methylierungsstatus in Tumoren auch eine Grundlage für mögliche, neuartige Therapieansätze.

Literatur

· Hoheisel, J.D. (2006). *Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis*. *Nature Rev. Genet.* 7, 200-210.

· Tierling, S. et al. (2006). *High-resolution map and imprinting analysis of the Gtl2-Dnchc1 domain on mouse chromosome 12*. *Genomics* 87, 225-235.

· Beier, V. et al. (2007). *Monitoring methylation changes in cancer*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 104, Volume: *Analytics of Protein-DNA Interactions* (Seitz, H., Hrsg.), Springer Verlag, 1-11.

· Brueckner, B. et al. (2007). *The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function*. *Cancer Res.* 67, 1419-1423.

· Liebert, K. et al. (2007). *Two alternative conformations of the AdoHcy bound to Escherichia Coli DNA adenine methyltransferase and the implication of conformational changes in regulating the catalytic cycle*. *J. Biol. Chem.* 282, 22848-22855.

Kontakt

Michaela Schanné
Funktionelle Genomanalyse
Deutsches Krebsforschungszentrum
Im Neuenheimer Feld 580, 69120 Heidelberg
E-Mail: m.schanne@dkfz.de

Tausende von Messungen in jedem einzelnen Experiment

Gensignaturen für das klinische Management und Verständnis menschlicher Erkrankungen

Annemarie Poustka, Peter Lichter, Jörg Hoheisel, Bernhard Herrmann, Silke Argo, Ruprecht Kuner, Meinhard Hahn, Holger Sültmann

Der molekularen Tumorforschung wurde im letzten Jahrzehnt zusätzlich zur hypothesenbasierten Forschung ein zweiter Weg, das Hochdurchsatzscreening, eröffnet. Solche Experimente haben das Ziel, viele Tausend biologische Messgrößen parallel zu untersuchen: So lässt sich mit der Microarray-Technologie, einer Analyse von Genexpressionsmustern mithilfe von sogenannten DNA-Chips [*>* Glossar], die Gesamtheit aller menschlichen Gene in einer biologischen Probe in einem einzigen Experiment messen. Diese Technologie wird in der SMP RNA am Standort Heidelberg (Deutsches Krebsforschungszentrum) genutzt und weiterentwickelt. In vielen klinischen Kooperationen wurden neue Gensignaturen für die Diagnose und Prognose von Krebs und anderen komplexen Krankheiten ermittelt. Am Standort Berlin (Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik) werden mithilfe von Mausmodellen Karten der räumlichen Verteilung solcher Gene in ganzen Organismen erstellt. Die Zusammenführung dieser verschiedenen Datensätze ermöglicht eine umfassende Charakterisierung von Krankheitsgenen und eine Einschätzung über deren Eignung als Zielgene für zukünftige neue Diagnose- und Therapieansätze.

Gensignaturen verraten Krankheiten

Unter einer Gensignatur versteht man die Aktivität der Gene in einem Gewebe zu einem gegebenen Zeitpunkt, z.B. bei der Entstehung oder Progression einer Erkrankung. Solche Gensignaturen sind einzelnen molekularen Markern meist überlegen, da die Anwendung multipler Biomarker für die Diagnose nicht nur robuster ist, sondern auch den vielschichtigen Ursachen komplexer Erkrankungen Rechnung trägt.

Das Prostatakarzinom ist der häufigste Tumor bei Männern. Diagnose und Therapieentscheidung beim Prostatakarzinom sind jedoch wegen der geringen Spezifität der verfügbaren Marker, insbesondere des meist getesteten Markers PSA (Prostate Specific Antigen), schwierig.

Mittels Microarray-Technologie wurden zahlreiche Gene gefunden, deren Aktivitäten sich zwischen normaler Prostata und Prostata-tumoren signifikant unterschieden. Hierzu zählten auch viele Gene, deren Relevanz für Prostatakrebs noch nicht bekannt war. Des Weiteren wurde eine funktionelle Analyse mithilfe der RNA-Interferenz-Technologie in der Prostatakrebs-Zelllinie PC3 durchgeführt. RNA-Interferenz (RNAi *>* siehe Kasten S. 41) ist ein natür-

licher Vorgang in eukaryotischen Zellen, bei dem die Genexpression einzelner Gene durch Interaktion mit kurzsträngigen RNAMolekülen gehemmt wird. In Laborversuchen wurde RNAi als ein gentechnisches Verfahren zum Ausschalten von Genen etabliert. Die Ergebnisse beider Untersuchungen lassen darauf schließen, dass mehrere der gefundenen Gene an tumorrelevanten zellulären Prozessen beteiligt sind.

In einer zweiten Microarray-Studie wurden Hinweise darauf gefunden, dass sich die Existenz eines Tumors schon im normalen Prostata-gewebe von Patienten anhand der molekularen Signatur nachweisen lässt. Zur Validierung dieses Befundes wurde eine prospektive klinische Studie geplant. Eine Verifizierung dieser Daten könnte in Zukunft die Diagnose des Prostatakarzinoms erheblich vereinfachen und dem Patienten viele belastende Untersuchungen ersparen.

Molekulare Marker für Brustkrebs und Herzerkrankungen

Auch beim häufigsten Tumor der Frau, dem Brustkrebs (Mammakarzinom), werden bessere diagnostische und prognostische Marker benötigt: So wurden mehr als 180 Brustkrebs-Pro-

ben mit Mikroarrays analysiert. Hierbei wurden Gensignaturen gefunden, die mit Tumortyp, Progressionsgrad, Östrogenrezeptorstatus (ESR1) und morphologischen Parametern assoziiert und somit von beachtlicher diagnostischer Aussagekraft waren.

Die vermehrte Bildung von Östrogenrezeptoren ist schon seit einer Weile als häufigster Auslöser für Brustkrebs bekannt. Daher hat die Identifizierung einer 10-Gen-Signatur zur Diagnose des ESR1-Status eine besondere Bedeutung: Mit Ausnahme von fünf Proben stimmte diese Signatur mit der histopathologischen Diagnose des ESR1 überein. Die Überprüfung der immunohistochemischen Daten zeigte jedoch, dass diese fünf Proben mit früheren Methoden als ESR1-negativ eingestuft worden waren. Die neue Signatur könnte also die Risikoabschätzung für Patientinnen bei einer Entscheidung für oder gegen eine ESR1-inhibierende Therapie in Zukunft deutlich verbessern.

Für viele Tumoren – so auch für das Mammakarzinom – ist eine Prädiktion des Erfolges einer Chemotherapie kaum möglich. Microarraystudien haben das Potenzial, molekulare Signaturen für derartige Vorhersagen zu liefern. Dazu wurde eine genomweite Analyse primärer Mammatumore durchgeführt. Die Experimente begleiteten eine Kombinations-Chemotherapie-Studie mit der molekularen Analyse von 100 Biopsieproben der betroffenen Patientinnen. Aus den erhaltenen Genexpressionsmustern wurde eine Signatur von 512 Genen bestimmt, die geeignet war, die pathologisch vollständige Rückbildung von Krankheitssymptomen (Remission) mit bisher nicht erreichter Sensitivität und Spezifität vorherzusagen.

Zur prospektiven klinischen Validierung dieser Signatur wird seit Oktober 2005 eine multizentrische, randomisierte Phase II-Studie anhand von geplanten 256 Biopsieproben durchgeführt. Ziel ist es, prädiktive Gensignaturen für die vollständige Remission bzw. Therapieresistenz der Tumoren zu finden, die in späteren Phasen zur Prognose des Krankheitsverlaufes genutzt werden können.

Nicht nur Tumoren werden in den Projekten der SMP RNA untersucht. In einem Projekt gelang es, eine aussagekräftige Genexpressions-signatur für die Herzmuskelschwäche (Dilatative Kardiomyopathie) zu identifizieren. Diese Signatur umfasst 27 Gene und erlaubte die Unterscheidung von kranken und gesunden Herzen mit einer Sensitivität von über 90%. Dies wurde an insgesamt 108 Herzmuskelpro-

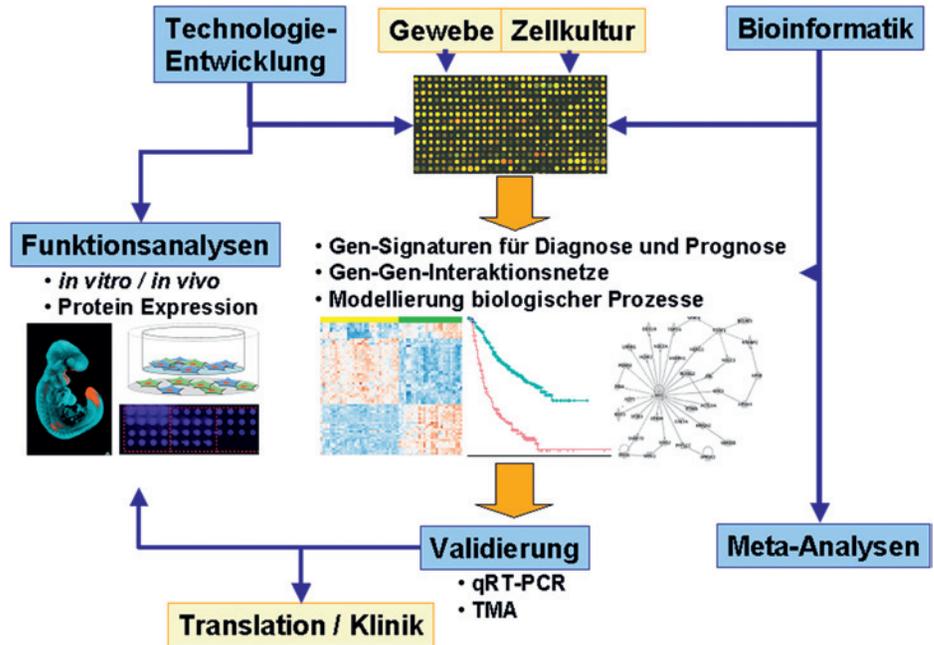


Abb. 1: Arbeitsabläufe und Interaktionen in der SMP RNA.

ben aus eigenen genomweiten Microarray-Studien sowie zwei öffentlichen Datensets gezeigt. Die Signatur ließ sich damit auf nahezu alle anderen unabhängig publizierten Microarray-Studien auf diesem Gebiet übertragen. Anhand der Signatur kann die dilatative Kardiomyopathie erstmalig im späten Stadium auf molekularer Ebene zuverlässig bestimmt werden.

Komplexen Krankheiten auf der Spur

Komplexe Krankheiten wie Krebs sind meist nicht auf einzelne Ursachen zurückzuführen, sondern die Summe diverser Störungen in vernetzten biologischen Systemen. Mit stetig wachsendem Wissen über Krankheitsentstehung und -verlauf zeigt sich, dass neben der genauen Untersuchung einzelner Gene die Aufklärung der komplexen Geninteraktionen für das Verständnis von Gesundheitsprozessen essenziell ist. Ein interdisziplinäres Team aus Biologen, Mathematikern und Informatikern innerhalb der SMP RNA sowie in der SMP Bioinformatik entwickelt Algorithmen zur Konstruktion solcher Gen-Gen-Interaktionsnetze. Zu diesem Zweck wird zunächst die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) in humanen Zelllinien angewendet, um einzelne oder mehrere krankheitsrelevante Gene zu hemmen. Anschließend wird mithilfe der Microarrays die Aktivität aller Gene in diesen Zellen bestimmt. Die Daten aus

mehreren dieser Experimente werden kombiniert, um Überschneidungen zu finden, sie mit bekannten Daten zu vergleichen und anschließend Gen-Gen-Interaktionsnetze zu modellieren.

So wurde die Aktivität von 20 Genen, die aus den klinisch orientierten Studien des Mammakarzinoms hervorgegangen waren, in Brustkrebs-Zelllinien mittels RNAi unterdrückt. Die aus den Zellen isolierte Gesamt-RNA wurde wiederum über Microarrays analysiert. Über den Vergleich der einzelnen Experimente und unter Einsatz bioinformatischer Methoden wurden sowohl neue Verbindungen zwischen den unterdrückten Genen und den nachgeschalteten tumorrelevanten Signalwegen als auch Verknüpfungen zu bekannten Gen-Interaktionen gefunden. Die Untersuchung der Regulationsdynamik erlaubt es, Verbindungen der vorgeschalteten Gene aus der Kombination von Daten aus Einzelexperimenten zu rekonstruieren. Hierzu wurden Algorithmen entwickelt, die die Erstellung solcher Netzwerke erlauben. Quasi als Nebenprodukt dieser Experimente lässt sich auch durch Heranziehung öffentlich zugänglicher Datenbanken die Ähnlichkeit der erhaltenen Gensignaturen mit den Effekten bekannter Medikamente vergleichen. Auf diese Weise lassen sich auf molekularer Ebene Parallelen zwischen den *in vitro* Daten und therapeutischen Effekten herstellen.

Panorama der Genaktivität

Neben der quantitativen Bestimmung der Aktivität von Genen ist ihre räumliche Verteilung im Organismus von besonderer Bedeutung: Im Rahmen einer SMP RNA Arbeitsgruppe werden *in-situ*-Hybridisierungen an vollständigen Mausembryonen durchgeführt, um die Gewebe zu lokalisieren, in denen das jeweilige Gen aktiv ist. Die Hybridisierung von Mausembryonen wurde hier zur Hochdurchsatzmethode weiterentwickelt. Embryonen zwischen Tag 9,5 und 11,5 eignen sich für diese Untersuchungen besonders gut. Bislang wurden in diesem Teilprojekt mehr als 1 600 Gene auf ihre Expression in Embryonen untersucht. Hiermit sind in der parallel aufgebauten internationalen Datenbank des Molecular Anatomy of the Mouse Embryo Project (MAMEP) die Daten zu insgesamt ~8 500 Genen enthalten. Ferner wurde eine Methode (Optical Projection Tomography) zur Generierung von 3-D-Bildern aus tomographischen Bilddateninformationen eingesetzt und zur räumlichen Darstellung der Expression von Genen genutzt.

Die Daten in Tiermodellen sind von unmittelbarer Bedeutung für Vorgänge in menschlichen Krankheiten: So wurden in einem Zellkulturmodell 24 Kandidatengene identifiziert, die eine Umbildung von epithelialen zu mesenchymalen Zelltypen hervorrufen. Da derartige Umbildungen auch bei der Metastasierung von Tumoren eine wesentliche Rolle spielen, sind diese Gene möglicherweise als Ziele für die Therapie von Tumoren im Sinne einer Verhinderung oder Verzögerung der Metastasierung geeignet.

Entwicklung neuer Technologien und Analysen

Parallel zu den laufenden Studien wird die in der SMP RNA etablierte Microarray-Technologie kontinuierlich weiterentwickelt. So wurden etwa für die erfolgreiche Durchführung der klinischen Projekte zum Brustkrebs speziell adaptierte Protokolle entwickelt und separat publiziert.

Einige Wissenschaftler befassen sich mit der „High End“ Optimierung von technischen Prozessen in der SMP RNA. Die neue Methodik der Signalamplifikation auf Arrays erlaubt den Nachweis weniger Moleküle. Dies ist insbesondere für solche Studien von Bedeutung, bei denen nur niedrigste Mengen RNA verfügbar sind (z. B. aus kleinsten Gewebeproben mit nur wenigen Zellen). Die Methode wird derzeit

erweitert, um mithilfe von LNA (locked nucleic acid) eine absolute Quantifizierung von RNA vornehmen zu können. Ferner wurde eine Methode zur Identifizierung neuer Exons (proteinkodierender DNA-Abschnitte) mithilfe von Primer-Verlängerung „on Chip“ entwickelt.

In Kollaboration mit einem Explorativen Projekt wurde die Technologie der Reverse Phase Protein Microarrays zur quantitativen Bestimmung der Proteinexpression und -modifikation weiterentwickelt. Es wurden mehrere gemeinsame Projekte begonnen, die eine integrierte Analyse von Gen- und Proteinexpression in zellulären Systemen sowie humanen Tumoren zum Ziel haben.

Zur raschen Planung und statistischen Analyse der Hochdurchsatzdaten hat sich die in der SMP RNA integrierte Bioinformatik als sehr zweckmäßig erwiesen und erheblich zum Erfolg der Projekte beigetragen. Neben den Routineanalysen wurden von den Bioinformatikern neue Methoden zur Normalisierung (vsn), Qualitäts- und Prozesskontrolle (arrayMagic) und zum Datenmanagement (QuickLIMS, MAMEP) entwickelt und eingesetzt. Diese Arbeiten wurden stets in enger Abstimmung mit Wissenschaftlern der SMP Bioinformatik durchgeführt.

Qualitätsmanagement

Da Microarray-Analysen eine hohe technische Variation aufweisen, war die Sicherung einer exzellenten Datenqualität in der SMP RNA von Anfang an oberstes Gebot. Die Arbeitsgruppe „Microarray Qualitätsmanagement“ formulierte hierzu 25 standardisierte Protokolle für die Isolierung und Qualitätskontrolle biologischer Proben, die Qualitätssicherung in der Microarray-Prozessierung sowie die Analyse der Hochdurchsatzdaten. Eine Standardisierung der Microarraydaten wurde durch Beteiligung an der Entwicklung der iChip-Datenbank der SMP Bioinformatik erzielt. Für die post-experimentelle Qualitätskontrolle wurde das Analysetool arrayMagic entwickelt.

Die Validierung der Microarraydaten mit weiteren molekularen Methoden wurde ausgebaut und wird in allen Projekten extensiv genutzt. Insbesondere werden selektierte Gene mittels real-time-PCR validiert. Hierbei kommt auch die arraybasierte Taqman RT-PCR-Technik zur Anwendung, die einen hohen Durchsatz von Genen und Proben erlaubt. Die Nutzung von Gewebemicroarrays zur Bestimmung der räumlichen Expression von Proteinen wurde systematisch in die Projekte implementiert.

Schließlich wurde der SMP RNA, durch intensive Kooperation mit Wissenschaftlern der SMP Cell, die Möglichkeit eröffnet, die biologischen Funktionen neu identifizierter Krankheitsgene in zellulären Assays zu analysieren.

Das primäre Ziel der SMP RNA, Signaturen für die Diagnose von Krankheiten zu identifizieren, wurde in vielen erfolgreichen Studien mit klinischen Kooperationspartnern erreicht. Prospektive klinische Studien wurden bereits begonnen oder sind geplant. Parallel hierzu hat sich die SMP RNA zu einer integrierten Genom-Analyseplattform entwickelt, in der krankheitsrelevante Gene systematisch identifiziert, validiert und charakterisiert werden, um die komplexen molekularen und zellulären Vorgänge in Krankheiten zu verstehen sowie in einem systembiologischen Ansatz zu modellieren.

Literatur

- Schlomm, T. et al. *Extraction and processing of high quality RNA from impalpable and macroscopically invisible prostate cancer for microarray gene expression analysis. Int. J. Oncol.* 27(3), 713-720, 2005
- Thuerigen, O. et al. *Gene expression signature predicting pathologic complete response with gemcitabine, epirubicin, and docetaxel in primary breast cancer. J Clin Oncol.* 24(12):1839-45, 2006
- Barth, A.S. et al. *Dilated Cardiomyopathy: Identification of shared functional gene classes and a robust predictive gene expression set across independent microarray platforms in human myocardium. J. Am. Coll. Cardiol.* 48(8), 1610-1617, 2006
- Marme, N. et al. *Identification of single-point mutations in mycobacterial 16S rRNA sequences by confocal single-molecule fluorescence spectroscopy. Nucleic Acids Res.* 34:e90, 2006
- Aulehla, A. et al. *Segmentation in vertebrates: clock and gradient finally joined. Genes Dev.* 18, 2060-2067, 2004

Kontakt

Prof. Dr. Annemarie Poustka
 Abt. Molekulare Genomanalyse
 Deutsches Krebsforschungszentrum
 Im Neuenheimer Feld 580, 69120 Heidelberg
 E-Mail: a.poustka@dkfz.de
www.dkfz.de/smp-rna/rna.org/

RNA-Interferenz: ein Gen (k)ein Protein

NGFN-Wissenschaftler der RNAi-Plattform optimieren die RNAi-Technologie

Kristine Bentz, Wolfgang Wurst, Ralf Kühn

In allen Organismen, von der Pflanze bis zum Menschen, wurde vor einigen Jahren ein natürlicher Kontrollmechanismus entdeckt, mit dessen Hilfe Zellen den Vorrat bestimmter Boten-RNAs und damit die Herstellung der entsprechenden Proteine nach Bedarf regulieren können. Diesem Mechanismus, der als RNA Interferenz (RNAi) bezeichnet wird, liegen sehr kurze RNA Moleküle, sogenannte mikroRNAs [miRNA > Glossar] zugrunde, die ebenfalls vom Genom kodiert werden. Die Wirkung einer miRNA besteht darin, dass sie sich entsprechend ihrer Basensequenz komplementär an einen Abschnitt der Boten-RNA eines bestimmten Gens anlagern kann. Diese Anlagerung blockiert die Proteinsynthesemaschinerie und der Weg vom Gen zum Protein wird unterbrochen. Das Gen, von welchem die Boten-RNA abstammt, ist somit weitgehend stillgelegt und deshalb wird der Mechanismus im Englischen mit dem Ausdruck „Gene silencing“ bezeichnet. Kleine doppelsträngige RNA-Moleküle [siRNA > Glossar] können ebenfalls die Genaktivität regulieren. Sie sind meist viraler Herkunft und man vermutet, dass es sich um eine Reaktion zum Schutz der Zelle vor parasitären, fremden Genen handelt. Für die Entdeckung und Aufklärung dieses RNAi-Mechanismus wurden Craig Mello und Andrew Fire 2006 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

Regulierung ausgewählter Gene

Wissenschaftler haben nun damit begonnen, diesen Prozess für die biologische und medizinische Forschung nutzbar zu machen. Der RNAi-Mechanismus, der in der Natur nur eine begrenzte Zahl von Genen reguliert, kann dazu genutzt werden, die Expression eines jeden ausgewählten Gens, also dessen Umsetzung in ein Protein, zu blockieren (knock-down). Dies gelingt durch die Einführung synthetisch hergestellter siRNA-Moleküle in Körperzellen. Die Basenabfolge der synthetischen RNAs wird ebenfalls vom RNAi-Mechanismus erkannt und führt dann zum Abbau der Boten-RNA des Zielgens. RNAi eignet sich somit hervorragend als Methode zur Genomfunktionsanalyse, mit der die Bildung und Funktion ausgewählter Proteine in Zellen für eine beliebige Zeit unterbrochen werden kann. Die Auswirkungen des Ausfalls des Zielproteins können an-

schließend, z. B. durch mikroskopische Beobachtungen, untersucht werden und es kann ein Rückschluss auf dessen Funktion gezogen werden. Die systematische Herstellung von siRNA-Bibliotheken, die mehrere zehntausend Moleküle verschiedener Sequenzen umfassen, macht es möglich jedes menschliche Gen funktionell zu untersuchen.

Das Ziel der Systematisch-Methodischen Plattform (SMP) RNAi des Nationalen Genomforschungsnetzes besteht darin, diese vielversprechende RNAi-Technologie zu einem Routineverfahren für die Genom- und Krankheitsforschung zu entwickeln. Führende deutsche Gruppen auf den Gebieten der Zellbiologie, Molekularbiologie, Genetik und Bioinformatik arbeiten zusammen, um die RNAi Technologie für Nachweisverfahren zur Genfunktion *in vitro* und im Gesamtorganismus zu optimieren und sie für die medizinische Forschung nutzbar zu machen.

Mittlerweile haben die beteiligten Wissenschaftler in den zehn Partnerlaboren in Berlin, Dresden, Heidelberg und München gemeinsam eine Pipeline zur Genfunktionsanalyse mittels RNAi aufgebaut: Die Analyse von Genen in dieser Pipeline beginnt mit ausgeklügelten Zellkulturtests, worauf Untersuchungen in Mausembryonen folgen, und sie endet mit Analysen erwachsener knock-down-Mäuse.

Das Ausgangsmaterial als Herausforderung

Entscheidend für den Einsatz der RNAi Technologie zur Genfunktionsanalyse ist die Bereitstellung geeigneter Ausgangsmaterialien. siRNA-Moleküle können im Labor künstlich hergestellt werden. Von besonderer Bedeutung ist dabei die Auswahl einer geeigneten RNA-Zielsequenz, da sich die einzelnen Zielregionen in ihrer Anfälligkeit für RNAi-Moleküle unterscheiden. Verschiedene siRNAs, die gegen das gleiche Zielgen gerichtet sind, können in ihrer Blockierungseffizienz stark schwanken. Neben der Effizienz ist die Spezifität ausschlaggebend für die Qualität einer siRNA. So kann eine siRNA grundsätzlich auch Gene ausschalten, die nicht ihre eigentlichen Zielgene sind. Die Vermeidung dieser als Off-target-Effekt bezeichneten Unspezifität ist eine zentrale Herausforderung, besonders für die Anwendung der RNAi-Technologie in hohem Durchsatz. In einem

Partnerlabor der SMP RNAi am Max-Planck-Institut (MPI) für molekulare Zellbiologie und Genetik in Dresden wurde deshalb ein alternatives Konzept zur Herstellung von siRNAs entwickelt, das auf dem enzymatischen Verdau langer doppelsträngiger RNAs, die leicht herstellbar sind, basiert und Off-target-Effekte vermeidet. Lange doppelsträngige RNAs, die homolog zum Zielgen sind, werden mit einem Enzym (RNase III) aus dem Darmbakterium *Escherichia coli* in kürzere, überlappende Fragmente geschnitten. So entsteht ein komplexes Gemisch siRNA-ähnlicher Moleküle, die den kurzen, natürlich vorkommenden doppelsträngigen RNAs ähneln. Die so hergestellten RNAs werden als Endoribonuklease-präparierte siRNA (esiRNA) bezeichnet.

Die Herstellung dieser esiRNAs gelingt auch im Hochdurchsatzverfahren. Die dafür am MPI Dresden entwickelte Produktionspipeline erlaubt die Herstellung genomweiter Bibliotheken in kurzer Zeit zu kostengünstigen Bedingungen. Eine genomweite Bibliothek für menschliche esiRNAs wurde bereits aufgebaut. Die Zielregion all dieser esiRNAs sowie sämtliche Primer(Start-)sequenzen, die für ihre Herstellung notwendig sind, sind online über die Datenbank RiDDLE (<http://cluster-12.mpi-cbg.de/cgi-bin/riddle/search>) zugänglich. In naher Zukunft sollen die Bibliotheken auf weitere Modellorganismen wie das Maus- oder das Rattengenom ausgeweitet werden. Dies ermöglicht die systematische Analyse dieser Genome, um eine Fülle biologischer Fragestellungen zu beantworten. Eine Schlüsselstellung nimmt dabei die Analyse genregulatorischer Netzwerke ein, die das Ablesen genetischer Informationen im Zellkern steuern und für das An- und Abschalten der Genexpression verantwortlich sind. Am MPI für Molekulare Genetik in Berlin widmet sich eine Arbeitsgruppe dieser Aufgabe und analysiert mittels RNAi-knock-down speziell diejenigen Transkriptionsfaktoren, die von Chromosom 21 kodiert werden.

Neue Technologie als Routineverfahren

Um die verfügbaren siRNA Bibliotheken für die Funktionsanalyse von Genen möglichst effizient zu nutzen und genomweit einsetzen zu können, kombiniert eine am EMBL in Heidelberg

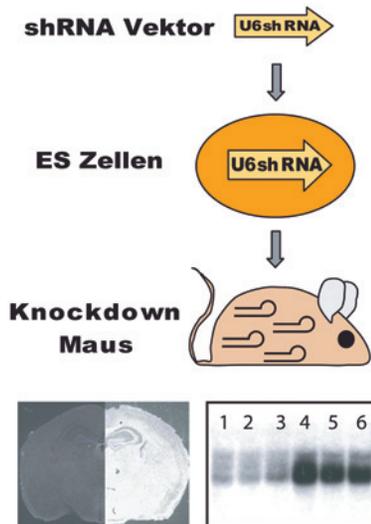


Abb. 2: Herstellung von knock-down-Mausstämmen. Ein shRNA-Vektor wird über ES-Zellen in die Keimbahn einer Maus eingeführt. Die Expression des Vektors führt zur körperweiten Produktion haarnadelförmiger shRNA-Moleküle, die die Blockierung des Zielgens durch RNAi auslösen. Foto unten links: Nachweis der shRNA-Produktion im Gehirnschnitt einer knock-down-Maus; Foto rechts unten: die shRNA Expression führt zur Verminderung der Boten-RNA des CRHR1-Gens im Gehirn der knock-down-Mäuse 1-3 im Vergleich zu Kontrolltieren 4-6 (Hitz et al., 2007).

ningtechnik können somit erstmals alle Proteine und deren kodierende Gene identifiziert werden, die an grundlegenden zellulären Prozessen beteiligt sind. Hierdurch wird auch ein erweitertes Verständnis der Krankheitsentstehung möglich, indem neue Kandidatengene identifiziert werden, die möglicherweise krankheitsauslösend wirken. Viele menschliche Erkrankungen beruhen jedoch nicht ausschließlich auf Vorgängen, die nur innerhalb von Zellen ablaufen, sondern entwickeln sich im komplexen Zusammenspiel verschiedener Zellarten, die im Körper zusammenarbeiten. Diese Zusammenhänge können in Zellkulturen bisher nicht nachgeahmt werden und erfordern die Untersuchung von Genfunktionen im Gesamtorganismus. Die Überprüfung der Genfunktion derartiger Kandidatengene im Modellorganismus Maus ist das Ziel mehrerer *in vivo* (am lebenden Organismus) arbeitenden Gruppen innerhalb der SMP RNAi, die im Folgenden beschrieben werden.

Mäuse als Krankheitsmodelle

Zur Untersuchung von Genfunktionen kann auch in der Maus, die als genetischer Modellorganismus für den Mensch gilt, mittels RNAi die Aktivität von Genen blockiert werden. Hierzu wurde am GSF Forschungszentrum in München

ein Verfahren entwickelt, bei dem die Zellen der Maus in die Lage versetzt werden, selbstständig siRNA-ähnliche Moleküle herzustellen. Die Technologie bewirkt, dass in den Mauszellen siRNA-Moleküle synthetisiert werden, deren vorderer und hinterer Abschnitt zueinander komplementär sind, so dass sie sich haarnadelförmig falten. Sie werden deshalb auch als „short hairpin“ (Haarnadel) oder shRNA bezeichnet. Ähnlich wie doppelsträngige RNA-Moleküle können auch Haarnadel-RNAs das Zielgen dauerhaft blockieren (knock-down). Abbildung 2 zeigt beispielhaft die Herstellung einer knock-down-Maus anhand des CRHR1-Gens. Das CRHR1-Gen kodiert für einen Rezeptor des Corticotropin-freisetzenden Hormons (CRH, engl.: corticotropin releasing hormone). Dieser Rezeptor reguliert die körpereigene Stressreaktion. Ein shRNA-Vektor mit Spezifität für CRHR1 wurde in embryonale Stammzellen eingesetzt und in die Mauskeimbahn überführt, wodurch in den Zellen aller Organe shRNA-Moleküle produziert werden (knock-down-Maus). Die Produktion von shRNA im Gehirn dieser Mäuse wurde in einem Gewebeschnitt nachgewiesen und ist in Abbildung 2, links unten, als helles Farbsignal sichtbar.

Stark reduzierte Signale

Die Produktion von shRNA im Gehirn führt durch den RNA-Interferenzmechanismus zu einer starken Verminderung der Boten-RNA des Zielgens CRHR1. Wie in Abbildung 2, rechts unten, sichtbar, weisen die drei untersuchten knock-down-Mäuse (1-3) im Vergleich zu drei Kontrolltieren (4-6) im Gehirn ein stark reduziertes Signal der CRHR1-Boten-RNA auf. Die verminderte Expression des CRHR1-Rezeptors führt bei den knock-down-Mäusen zu einer verringerten Produktion von Stresshormonen und zu reduziertem Angstverhalten. Neben diesem CRHR1-knock-down wurden weitere Krankheitsmodelle in der Maus entwickelt, bei denen Kandidatengene für die Parkinsonsche Erkrankung sowie für Angst- und Depressionskrankheiten ausgeschaltet wurden. Diese Mausstämmen werden zurzeit in der Deutschen Mausklunik, die sich ebenfalls am GSF Forschungszentrum befindet, untersucht. Außerhalb des Institutes für Entwicklungsgenetik an der GSF in München arbeiten noch zwei weitere Gruppen der SMP RNAi an der Analyse von Genfunktionen im Mausmodell. Das MPI für Molekulare Genetik in Berlin, beschäftigt sich mit Signaltransduktionswegen, die bei der Embryonalentwicklung als auch in der Tumorbildung eine Rolle spielen. Untersuchungen die am MPI für Molekulare Zellbiologie und Genetik in Dresden durch-

geführten werden, konzentrieren sich hauptsächlich auf die Analyse neuronaler Entwicklungsvorgänge im Gehirn. Beide Teams setzen dazu die RNAi-Technologie an Mausembryonen ein.

Außerdem ist auch eine Bioinformatikgruppe am DKFZ in Heidelberg Teil der SMP RNAi, die das Design von Experimenten unterstützt, die Datenauswertung vornimmt, sowie die Plattformdaten der wissenschaftlichen Gemeinschaft zur Verfügung stellt (<https://www.ngfn-rnai.de/iChipWeb2RMT/>). Ein weiterer Industriepartner der SMP RNAi, vermittelt das geballte Wissen der SMP RNAi in Workshops und Laborkursen, aber auch auf den Webseiten der SMP RNAi (<http://www.rnai.ngfn.de>) an Wissenschaftler und Interessierte.

Durch die Verwendung aller derzeit verfügbaren Schlüsseltechnologien für das Design, die Konstruktion und die Anwendung interferierender RNA-Moleküle *in vitro* und *in vivo* konnte die SMP RNAi die RNAi-Technologie als leistungsfähiges Werkzeug zur *in vitro* und *in vivo* Genfunktionsanalyse erfolgreich etablieren. Dies ermöglicht nun das Hochdurchsatzscreening menschlicher Zellen im großen Maßstab und *in vivo* Funktionsstudien in Mäusen, was langfristig die Entwicklung neuartiger Therapiemöglichkeiten genetisch bedingter Erkrankungen vorantreiben soll.

Literatur

- Hitz, C. et al. Conditional brain-specific knockdown of MAPK using Cre/loxP regulated RNA interference. *Nucleic Acids Res.* 2007;35(12):e90. Epub 2007 Jun 22.
- Kittler, R. et al. (2007): Genome-wide resources of endoribonuclease-prepared short interfering RNAs for specific loss-of-function studies. *NatMethods* 4: 337–344.
- Neumann, B. et al. High-throughput RNAi screening by time-lapse imaging of live human cells. *Nat Methods.* 2006 May;3(5):385-90.
- Simpson, JC. et al. An RNAi screening platform to identify secretion machinery in mammalian cells. *J Biotechnol.* 2007 Apr 30;129(2):352-65. Epub 2007 Jan 14.
- Yang, D. et al. (2002): Short RNA duplexes produced by hydrolysis with *Escherichia coli* RNase III mediate effective RNA interference in mammalian cells. *PNAS* 99: 9942–9947.

Kontakt

Dr. Kristine Bentz
 Institut für Entwicklungsgenetik
 GSF Forschungszentrum für Umwelt
 & Gesundheit
 Ingolstädter Landstraße 1
 85764 München-Neuherberg
 E-Mail: kristine.bentz@gsf.de

Das menschliche Genom – viel komplexer als vermutet

Ressourcen und Anwendungen für die Hochdurchsatz-Funktionsanalyse von Krankheitsgenen

Stefan Wiemann, Ingo Schupp, Stephanie Bechtel, Dorit Arlt, Özgür Sahin, Meher Majety, Ruth Wellenreuther, Heiko Rosenfelder, Jitao Zhang, Christian Schmidt, Alexander Mehrle, Florian Hahne, Annemarie Poustka, Rainer Pepperkok, Philippe Bastiaens, Helmut Blöcker, Michael Böcher, Karl Köhrer, Günther Michel, André Bahr, Jürgen Lauber, Birgit Ottenwälder, Dagmar Heubner, Werner Mewes, Andreas Hörlein

Bis vor wenigen Jahren ist man davon ausgegangen, dass Gene wie auf einer Perlenschnur aufgereiht auf unseren Chromosomen vorliegen und dass jedes Gen für ein spezifisches Produkt – also entweder ein Protein oder ein RNA-Molekül – kodiert. Von diesen und vielen weiteren Vorstellungen musste man sich aufgrund neuer Erkenntnisse verabschieden. Unser Genom ist wesentlich komplexer als lange vermutet wurde, und diese Komplexität setzt sich auch in der Regulierung der Gene und ihren Aktivitäten fort. Im Hinblick auf die relativ geringe Zahl von Genen (ca. 30 000) in jeder unserer Zellen – mit der wir uns übrigens kaum von dem winzigen Fadenwurm *C. elegans* unterscheiden – wurde inzwischen klar, dass der Regulierung von Genen und deren Funktionen eine zentrale Bedeutung für die Erhaltung von Gesundheit oder die Entwicklung von Krankheiten zukommt. Die Wissenschaftler im Verbundprojekt SMP Cell haben es sich daher zur Aufgabe gemacht, sowohl auf molekularer als auch auf zellulärer Ebene die Funktionen von Genen und Genprodukten zu erforschen

sowie deren Fehlfunktionen im Krankheitsgeschehen zu entschlüsseln. Die Experimente werden überwiegend im Hochdurchsatz durchgeführt. Über die Ziele und die Struktur der SMP Cell wird ausführlich auf der Webseite www.smp-cell.de informiert. Anhand von drei Schwerpunkten soll hier der Beitrag der SMP Cell zur krankheitsorientierten Genomforschung im NGFN exemplarisch verdeutlicht werden.

Auf Umwegen zu den Genen

Die meisten Gene des Menschen liegen auf den Chromosomen nicht in zusammenhängenden Blöcken oder „Sätzen“ vor, sondern sind von scheinbar unwichtigen Abschnitten unterbrochen. Dies macht es zum einen schwierig, die Gene überhaupt zu entdecken, und zum anderen ist es unmöglich, diese Gene im Labor direkt für die Herstellung von Proteinen oder anderen Genprodukten zu verwenden. Stattdessen muss ein Umweg über sogenannte cDNAs gegangen werden. Solche cDNAs werden aus einem Zwischenprodukt der Zellen, der mRNA, hergestellt. Sie können in Bakterien vermehrt und anschließend in vielen verschiedenen Experimenten weiter verwendet werden. Aus der Sequenz, also der Abfolge der Basenbausteine, kann abgeleitet werden, welches Protein von der jeweiligen cDNA kodiert wird, und dieses Protein kann schließlich auch gentechnisch produziert werden. Einige dieser sogenannten rekombinanten Proteine werden inzwischen routinemäßig bei der Arzneimittelherstellung eingesetzt (z. B. menschliches Insulin), da die Funktion dieser Proteine sowie deren veränderte Aktivität oder Fehlfunktion in Krankheiten (in dem Beispiel der Insulin-abhängigen Diabetes Typ 1) bekannt sind.

Für die meisten Proteine des Menschen ist die Funktion hingegen nicht geklärt. Viele der Gene sind noch nicht als cDNAs vorhanden und können daher auch nicht effizient auf ihre

Funktion untersucht werden. Wissenschaftler der SMP Cell bilden das einzige europäische Konsortium, das in großem Maßstab menschliche Gene in Form von cDNAs kloniert, also eine Genbibliothek erstellt, aus der Proteine künstlich hergestellt und auf ihre Funktion untersucht werden können (siehe auch den Abschnitt: Zelluläre Funktionsassays). Mehrere tausend cDNAs wurden inzwischen von diesem Konsortium produziert und werden anderen Projekten des NGFN zur Verfügung gestellt. Mit dieser Ressource bringt sich die SMP Cell auch in ein internationales Projekt ein, in dem alle weltweit führenden Genom-Projekte gemeinsam an einer vollständigen „Bibliothek“ der menschlichen Gene arbeiten, um diese für die Wissenschaft und Industrie als Basis für die systematische Funktionsanalyse verfügbar zu machen. Die Bibliothek dieser ORFeome Collaboration (www.orfeomecollaboration.org) ist bereits jetzt die größte frei zugängliche Ressource menschlicher Gene weltweit und bildet damit eine entscheidende Voraussetzung zur systematischen zellulären Genfunktionsanalyse. Bis zum Frühjahr 2008 sollen die meisten menschlichen Gene in diese Bibliothek aufgenommen werden, wozu die SMP Cell einen wichtigen Beitrag liefert.

Kompliziertes Zusammenspiel

Die erstaunlich geringe Zahl an Genen lässt vermuten, dass das Zusammenspiel von Genen und Genprodukten komplizierter sein muss als ursprünglich angenommen wurde. Deshalb müssen alle Aktivitäten innerhalb unserer Zellen streng kontrolliert werden, um den Ausbruch von Krankheiten zu vermeiden. Das richtige Verhältnis zwischen Wachstum und Zelltod ist z. B. entscheidend für die Vermeidung von Krebs, der meist durch Störungen gerade dieser zentralen Prozesse in einer oder wenigen unserer vielen Milliarden (genauer: ca. 10^{14}) Zellen eingeleitet wird.

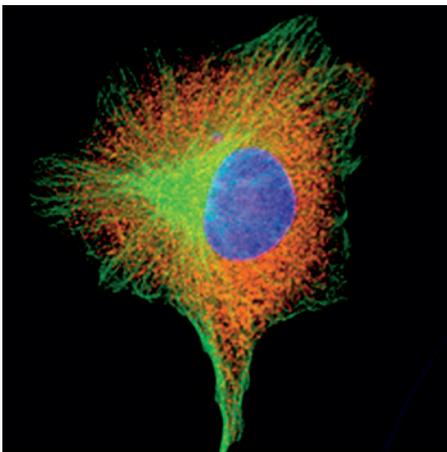


Abb. 1: Eine Zelle im Fluoreszenzmikroskop, bei der einzelne Bestandteile unterschiedlich gefärbt wurden, um in einem Funktionsassay die hervorgerufenen Veränderungen besser erkennen zu können.



Abb.2: Detail eines Roboters für Hochdurchsatz-Funktionsassays.

Bis vor kurzem wurde davon ausgegangen, dass Proteine in linearen Prozessen arbeiten, vergleichbar einer Produktionsstraße mit einem Anfangs- und einem Endpunkt. Dieser Blick auf unsere Proteine und deren Wirkungen hat sich jedoch gewandelt. Proteine arbeiten und funktionieren in Netzwerken, bei denen Einflüsse an verschiedenen Stellen unterschiedliche Wirkungen hervorrufen können. Insbesondere für das Verständnis der molekularen Ursachen von Krankheiten ist es daher wichtig, die zugrundeliegenden Proteinnetzwerke zu analysieren.

In der SMP Cell arbeiten Wissenschaftler verschiedener Fachrichtungen zusammen, um in Funktionsassays zu untersuchen, wie Zellen auf Störungen normaler Abläufe reagieren. Daraus können die Forscher schlussfolgern, welche Funktion die untersuchten Proteine haben. In diesen Funktionsassays werden einzelne Proteine in Zellkulturen entweder über das normale Maß hinaus produziert (Überexpression der Proteine mithilfe der Reagenzien aus der oben beschriebenen Genbibliothek), oder die in diesen Kulturen natürlich vorkommende Menge an Protein wird vermindert. Für letzteren Ansatz wird eine Technologie eingesetzt, für deren Entdeckung Craig Mello und Andrew Fire den Nobelpreis erhielten: Die sogenannte RNA Interferenz. Bei dieser Technologie werden einzelne Gene gezielt ausgeschaltet, wodurch die Herstellung der kodierten Proteine vermindert wird. Diese beiden experimentellen Ansätze sind komplementär, in Funktionsassays kann folglich sowohl ein Zuviel als auch ein Zuwenig an Proteinen erreicht und im Anschluss die Konsequenz für die Zellen untersucht werden.

In der SMP Cell wurden solche Funktions-

assays für den Hochdurchsatz etabliert. Insbesondere krebsrelevante Prozesse, wie z. B. das Wachstum der Zellen und die Verbreitung von Krebszellen während der Metastasen-Bildung, werden mithilfe dieser Hochdurchsatztechnologien untersucht. Ziel ist es, neue Ansätze für die Diagnose und Therapie von Krebserkrankungen – vor allem von Brustkrebs – zu entdecken. Weitere Funktionsassays wurden entwickelt, um die Reifung von neuronalen Zellen zu untersuchen, und um Proteine zu identifizieren, die den Cholesterinstoffwechsel beeinflussen. In diesen Ansätzen werden die Ergebnisse mit bekannten Informationen verknüpft und dadurch neue Erkenntnisse gewonnen und veröffentlicht. Die identifizierten Gene befinden sich derzeit in einem als Validierung bezeichneten Prozess: Mithilfe von Patientenproben soll untermauert werden, dass diese Gene ursächlich mit den jeweiligen Krankheiten verknüpft sind. Außerdem wird überprüft, ob diese Gene als diagnostische Marker und eventuell als Ansatzpunkte für neue Therapien verwendet werden können.

**Hochdurchsatz:
Daten, Daten, Daten ...**

Schon der Begriff „Hochdurchsatz“ zeigt an, dass in diesem Forschungszweig eine große Menge an Daten gesammelt wird. Dies ist zum einen auf die große Zahl unserer Gene und Proteine zurückzuführen, zum anderen auf die Vielzahl von experimentellen Ansätzen, mit denen die Funktion und Krankheitsrelevanz dieser Moleküle entdeckt werden soll. Die Experimente sind sehr aufwändig und werden

zum großen Teil von Robotern durchgeführt. Wissenschaftler der SMP Cell entwickeln Software zur Steuerung dieser Roboter sowie zur Verfolgung einzelner Proben über die verschiedenen Prozesse hinweg: ein sogenanntes Labor-Informations-Management-System (LIMS).

Zudem kann ein „whole-genome Screen“, also die Analyse aller menschlichen Gene, abhängig vom jeweiligen Experiment mehrere Terabyte an Daten liefern. Diese müssen zunächst gefiltert werden, um Signale vom Rauschen zu trennen. Im Anschluss müssen diese Daten mit statistischen Methoden analysiert werden, um positive von negativen Signalen zu unterscheiden. In der SMP Cell arbeiten Informatiker, Bioinformatiker und Biologen gemeinsam daran, LIMS Systeme und statistische Algorithmen zu erstellen und anzuwenden. Spezifische Benutzeroberflächen machen die Daten schließlich derart sichtbar, dass sie mit der Vielzahl bereits im Internet vorhandener Daten zu denselben Molekülen verknüpft und so die relevanten Informationen schnell erkannt werden können.

Was ist ein Gen?

Mit der Entschlüsselung des genetischen Codes, des sogenannten Buch des Lebens, erhoffte man sich umfassende Erkenntnisse über die Ursachen von Gesundheit und Krankheit. Tatsächlich ist das menschliche Genom inzwischen fast vollständig sequenziert, die Abfolge der einzelnen Bausteine also bekannt. Anstatt aber die erwarteten Antworten zu erhalten, haben sich neue Fragen und Erkenntnisse ergeben, die eine unerwartete Komplexität und

LIFEdb <http://www.lifedb.de>

| Clone ID | Gene Name | Chromosome Map | Localization | Links |
|-------------------------------|---|----------------|--------------------------|--|
| DKFZp564K1216 | guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 1 | 7q21 | Golgi Plasma membrane | Pictures Orf Protein H SO GE |
| DKFZp564F0522 | family with sequence similarity 98, member A | 2p22.3 | | H SO GE |
| DKFZp564B122 | zinc finger, UBR1 type 1 | 1p36.13 | | H SO GE |
| DKFZp564F052 | sorting nexin 7 | 1p21.3 | | H SO GE |
| DKFZp564O243 | abhydrolase domain containing 14A | 3p21.1 | Endoplasmic reticulum | Pictures Orf Protein H SO GE |

Abb.3: Die LIFEdb Datenbank dient der Verknüpfung experimenteller Daten aus der SMP Cell mit allgemein zugänglichen Informationen und zur Veröffentlichung neuer Erkenntnisse im Internet.

Dynamik unseres Genoms erkennen lassen. Im Internet-Lexikon Wikipedia wird der Begriff Gen noch definiert als „ein Abschnitt auf der Desoxyribonukleinsäure (DNA), der die Grundinformationen zur Herstellung einer biologisch aktiven Ribonukleinsäure (RNA) enthält“ (August 2007). Die Erkenntnisse aus dem Verbundprojekt SMP Cell haben aber gezeigt, dass diese wie auch alle anderen bisher gemachten Definitionen für den Begriff Gen so nicht stimmen.

Aus einem Gen können nämlich auch verschiedene RNAs hergestellt werden, die völlig unterschiedliche Produkte und Funktionen haben. Außerdem werden ständig neue Gene

und sogar ganze Genklassen entdeckt. Sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der krankheitsrelevanten Forschung ist daher noch viel Arbeit nötig, um die Zusammenhänge und das Funktionieren unserer Erbinformation sowie deren Zusammenspiel mit Umweltfaktoren verstehen zu können. Die Projekte der SMP Cell sind unmittelbar und auf mehreren Ebenen in diese Forschung involviert. Sie tragen damit wesentlich zur Erforschung der Lebensgrundlagen und Krankheitsursachen bei, wodurch Voraussetzungen geschaffen werden, um neue Strategien zur Vorbeugung und Behandlung dieser Krankheiten zu entwickeln. Mit seinen

Ressourcen, Technologien und krankheitsrelevanten Applikationen ist das Verbundprojekt SMP Cell auch für die zukünftige Forschung aufgestellt und wird weiterhin auf internationalem Niveau wichtige Beiträge zum Verständnis von Krankheiten liefern.

Kontakt

Dr. Stefan Wiemann

Abteilung Molekulare Genomanalyse
Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Im Neuenheimer Feld 580, 69120 Heidelberg
E-Mail: s.wiemann@dkfz.de

Proteinnetzwerke als Grundlage für neue Therapieansätze

Patrick Umbach, Bodo Lange, Ronald Frank, Sigrid Schnögl, Erich E. Wanker

Die Zahl sequenzierter Genome steigt immer schneller, dennoch wissen wir nach wie vor wenig über die eigentlichen funktionellen Zusammenhänge der Genprodukte. Neue Forschungsansätze, die das komplexe Zusammenspiel der Proteine in Signalwegen als System untersuchen wollen, wurden und werden entwickelt und ermöglichen neue Einsichten in das menschliche Proteom. Erste umfassende Proteinnetzwerke wurden generiert und in Interaktionskarten festgehalten. Diese Karten stellen tausende menschliche Proteine in einen globalen Zusammenhang, um das Funktionieren des menschlichen Organismus auf zellulärer Ebene besser zu verstehen. Mit der

Kenntnis dieser Wechselwirkungen (Interaktom) wird versucht, auch die molekularen Ursachen und Mechanismen komplexer Krankheiten zu ergründen.

In der Systematisch-Methodischen Plattform (SMP) Protein haben sich Forschergruppen des Max-Delbrück-Centrums für Molekulare Medizin (MDC), des Max-Planck Instituts für Molekulare Genetik (MPIMG), des Helmholtz-Zentrums für Infektionsbiologie (HZI) und der Universität Rostock zusammengeschlossen, um in einem gemeinsamen, koordinierten Ansatz regulatorische Signalwege zu untersuchen, die eine Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen spielen oder

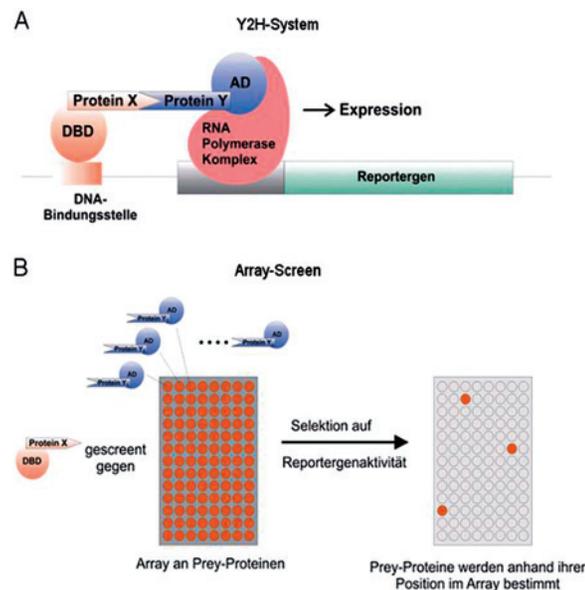
die während der mitotischen Zellteilung aktiviert sind. Die SMP Protein führt dabei Methoden der systematischen Proteomforschung wie Yeast-Two-Hybrid (Y2H), Massenspektrometrie und DNA-Arrays für die Analyse von genregulatorischen Netzwerken zusammen. Die dreidimensionalen Strukturen von Proteinkomplexen werden durch Röntgenkristallographie und Cryo-Elektronenmikroskopie aufgeklärt.

Ein übergeordnetes Ziel dieser Arbeiten ist es, neue Perspektiven zur Entwicklung von Therapien zu eröffnen. Für krankheitsrelevante Proteine werden in Substanzbibliotheken kleine Moleküle gesucht, die für weitere zellbiologische Analysen oder als Ausgangssubstanzen für therapeutische Wirkstoffe (Leadstrukturen) verwendet werden können.

Interaktionsscreening

Das Y2H-Verfahren wurde zunächst zur Erzeugung von Proteinnetzwerkarten von Hefe, Fadenwurm und Fruchtfliege eingesetzt, später dann auf das menschliche Proteom angewandt. Die Methode basiert auf der Erkenntnis, dass Transkriptionsfaktoren, die das Auslesen von Proteinen aus ihren Genen steuern, in eine Aktivierungs- und eine DNA-Bindungsdomäne zerlegt werden können. Beide Domänen behalten dabei ihre Funktionalität. Verknüpft man diese Domänen mit zwei unterschiedlichen menschlichen Proteinen und exprimiert sie in Hefe, wird ein neuer Transkriptionsfaktor gebildet, der das Ablesen von Reporter genen aktiviert, wenn beide Proteine

Abb. 1: Y2H-Verfahren (A): Protein X (bait = „Köder“) ist mit einer DNA-Bindungsdomäne (DBD) gekoppelt, Protein Y mit einer Aktivierungsdomäne (AD). Erst wenn beide Proteine in Wechselwirkung treten und die Domänen in räumliche Nähe kommen, wird der Transkriptionsfaktor aktiviert und das Reporter gen ausgelesen. (B) verdeutlicht den Matrix-Ansatz: Jedes Bait-Protein X wird gegen eine Prey (Beute)-Library getestet.



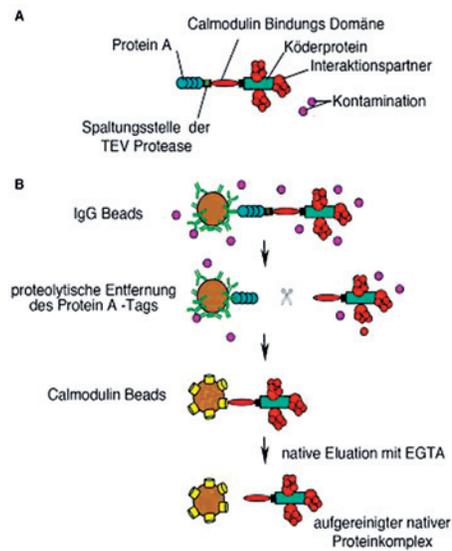


Abb. 3: Koderprotein mit dem TAP-Tag (A). Die Aufreinigung von Koderprotein und Interaktionspartnern erfolgt zunächst durch Zugabe kleiner Polymerpartikel, an die Antikörper gebunden sind (IgG Beads), die spezifisch mit Protein A interagieren. Nach Isolation des Komplexes und Abtrennung der Beads kann in einem zweiten Schritt der native Proteinkomplex gewonnen werden (B).

zenzmarkierte Antikörper binden, hochspezifisch nachgewiesen werden.

Anschließend wird ein zellbasiertes Phänotypscreening durchgeführt, wofür entsprechende Hochdurchsatzroboter entwickelt und eingesetzt werden. Diese Methode ist sehr effektiv bei der Suche nach biologisch aktiven Verbindungen. Mittlerweile konnten am HZI in Braunschweig Inhibitoren für Proteine des Proteasoms, einem Proteinkomplex, der im Cytoplasma und im Zellkern den Zellzyklus regulierende, aber auch fehlerhafte Proteine, etc. zu Fragmenten abbaut, gefunden werden, die eine potenzielle Antitumorwirkung haben. Ebenso konnten Bindungspartner

für Caytaxin gefunden werden. Mutationen im Gen für Caytaxin stehen in Verbindung mit spinocerebellärer Ataxie, einer neurodegenerativen Erkrankung, die zu Bewegungsstörungen, Beeinträchtigung der Wahrnehmungsfähigkeit und schließlich zum Tod führt. 2004 schloss sich die Initiative für chemische Genomik des NGFN mit Chemikern, Bioinformatikern und Biologen aus ganz Deutschland im ChemBioNet (www.chembio-net.de) zusammen, um die Molekülbibliotheken gemeinsam der wissenschaftlichen Nutzung zuzuführen.

Bestimmung dreidimensionaler Strukturen

Die Röntgenkristallographie am MDC erlaubt eine präzise Bestimmung der dreidimensionalen Struktur biologischer Makromoleküle und Komplexe. Medizinisch relevante Proteine aus den Y2H- und TAP-Tag Projekten werden kloniert, gegebenenfalls sequenziell modifiziert und in *E.coli* oder Insektenzellen produziert und gereinigt. Durch Koexpressionsvektoren können auch mehrere Proteine parallel hergestellt werden, um anschließend die Proteinkomplexe direkt anzureichern. Bei der folgenden Kristallisation liegt die Hauptschwierigkeit darin, geeignete Proteinkristalle für die Beugungsexperimente zu erzeugen. Dieses Problem soll durch eine Erhöhung des Durchsatzes entschärft werden. Roboter übernehmen die Zusammenstellung der verschiedenen Kristallisationsbedingungen, das Pipettieren der Screeninglösungen und die Lagerung der Kristallisationsexperimente in Mikrotiterplatten. Ein halbautomatisches Visualisierungs- und Trackingverfahren erlaubt die Parallelisierung vieler Experimente. Eine Datenbank wurde aufgebaut und listet derzeit über 400 000 Datensätze zu unterschiedlichen Proteinen und Kristallisationsbedingungen. Die Datenbank stellt ein wichtiges Werkzeug für die Experimentatoren beim Design weiterer Kristallisationsexperimente dar. Zuletzt wer-

den die Kristalle mithilfe der Strahlrohre für Röntgenstreuung der Freien Universität am Berliner Elektronensynchrotron (BESSY) in Beugungsexperimenten analysiert, um die Struktur der Proteine zu bestimmen. Abbildung 4 zeigt die Kernstruktur des TRAPP-Komplexes, der für den Proteintransport in einer Zelle wichtig ist. Insgesamt wurden ca. 100 verschiedene Proteine hergestellt und 43 davon zur Kristallisation gebracht. Acht Strukturen wurden schon aufgeklärt, drei weitere werden in Kürze beschrieben.

Für die SMP Protein wurde am MPI für Molekulare Genetik eine Datenbank entwickelt, um alle eingesetzten Materialien und durchgeführten Experimente aufzunehmen. Für diese integrierte Datenplattform wird das hierarchische und flexible XML-Format (Extended Meta Language) gewählt, um den Wissenschaftlern die Möglichkeit zu geben, experimentelle Daten einzubinden aber auch Datenstrukturen zu ändern. Über die Website des Projektes kann jeder beteiligte Wissenschaftler umgehend eigene Ergebnisse in die Datenbank laden und Partnern im Projekt Zugriff gewähren. Zudem wurden Programme entwickelt, die die Daten aus der Datenbank weiter aufarbeiten. Ein Visualisierungsprogramm für Proteinwechselwirkungen beispielsweise macht sofort sichtbar, welche Proteine bisher untersucht und welche Interaktionen gefunden wurden. Dadurch wird den Arbeitsgruppen eine abgestimmte Planung ermöglicht. Damit ist nicht nur ein schneller Daten- und Informationsaustausch möglich, sondern auch ein effizientes Projektmanagement, da der aktuelle Projektstand direkt ablesbar ist.

Literatur

- Stezl, U. et al. 2005; A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell*, 122:957-968
- Stezl, U., and Wanker, E. 2006; The value of high quality protein-protein interaction networks for systems biology. *Curr. Op. Curr. Biol.*, 10:551-558
- Müller et al. 2006; A centrosome-independent role for gamma-TuRC proteins in the spindle assembly checkpoint. *Science*, 314:654-657
- Kümmel, D. et al. 2006; Structure of the Bet3-Tpc6 Core of TRAPP: Two Tpc6 Paralogs Form Trimeric Complexes with Bet3 and Mum2. *J. Mol. Biol.* 361:22-32

Kontakt

Prof. Dr. Erich E. Wanker
Max-Delbrück-Centrum
für Molekulare Medizin (MDC)
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin
E-Mail: ewanker@mdc-berlin.de

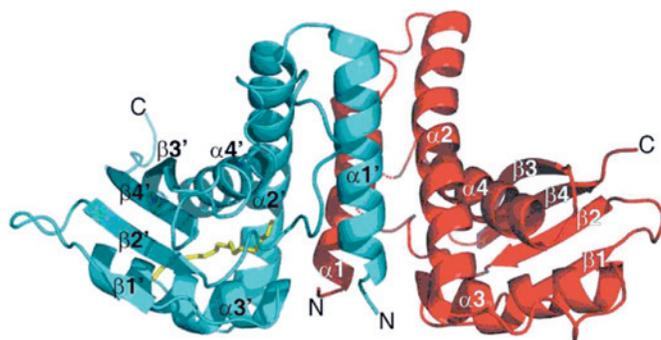


Abb. 4: Struktur des Bet3-Tpc6-Komplexes. Bet3 (blau) und Tpc6 (rot) bilden ein Heterodimer, welches als Unterkomplex des Transport Protein Partikels (TRAPP) eine wichtige Funktion in der Verankerung in Membranen des Golgi-Apparates einnimmt. Die gelbe Acylkette im Bet3 stellt die Verbindung zu einem Membranprotein dar.

Die alternde Gesellschaft – eine Herausforderung für die Forschung

Das Human Brain Proteome Project untersucht das Protein-Netzwerk im Gehirn

Tanja Hardt, Katrin Marcus, Michael Hamacher, Helmut E. Meyer

Das Risiko einer neurodegenerativen Erkrankung wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson steigt mit zunehmendem Alter an. Durch die höhere Lebenserwartung der Bevölkerung in den westlichen Industrieländern sind immer mehr Menschen von Krankheiten des zentralen Nervensystems betroffen. Dieses Problem wird sich in den nächsten Jahren vehement verschärfen. Zurzeit wird die Zahl der Menschen, die weltweit an Morbus Alzheimer erkrankt sind, auf 26 Millionen geschätzt. Laut einer 2005 veröffentlichten Studie wird sich die Zahl der Erkrankten in 20 Jahren verdoppeln und auf 81 Millionen Erkrankte im Jahre 2040 ansteigen. Dabei ist das Ausmaß dieses Anstiegs nicht einheitlich: Während in den westlichen Ländern von 2001 bis 2040 eine Verdopplung der Patientenzahl zu erwarten ist, wird in Indien, China und in den südlich angrenzenden Regionen mit einer Steigerung um bis zu 300 % gerechnet. Neurodegenerative Erkrankungen wirken sich dabei nicht nur schwerwiegend auf die Lebensqualität und das Wohlbefinden der Betroffenen aus, auch die entstehenden Kosten für Therapie und Pflege der Erkrankten müssen von den Betroffenen und von der Gesellschaft über das Gesundheitssystem getragen werden.

Bisher gibt es leider keine klare nicht-invasive prädiktive Diagnostik für Morbus Alzheimer und viele andere Demenzen. Patienten können deshalb meist nur auf breiter Basis und nicht spezifisch behandelt werden, was zu einer ineffektiven und kostenintensiven Behandlung führt. Jedoch könnte man unter Umständen das Fortschreiten einer Demenz verzögern, wenn eine frühzeitige Diagnose möglich wäre und erste Symptome gezielt, z. B. mittels Diäten, Sport, etc., behandelt würden. Es wird geschätzt, dass sich die Zahl der Betroffenen im Jahr 2050 um 12 Millionen verringern würde, wenn der Ausbruch von Morbus Alzheimer um ein Jahr hinausgezögert werden könnte. Aus diesem Grund wird ein besseres Verständnis

der Krankheitsmechanismen angestrebt, die dieser Erkrankung zugrunde liegen. Dies ist das erklärte Ziel des Human Brain Proteome Projects innerhalb des Nationalen Genomforschungsnetzes.

HBPP: Das interdisziplinäre Konsortium

Innerhalb des NGFN wurde seit 2001 das Human Brain Proteome Project (HBPP, www.smp-proteomics.de) initiiert, um speziell Mechanismen neurodegenerativer Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson sowie Alterungsprozesse mithilfe moderner Technologien und Tiermodellen aufzuklären. Im HBPP haben sich Forschergruppen aus den Bereichen Genetik, Zellbiologie, Tiermodelle, Molekularbiologie, Biochemie und Bioinformatik zusammengefunden, so dass

eine interdisziplinäre Infrastruktur entstanden ist, die sowohl funktionelle Genomik als auch Proteomik umfasst.

In der ersten Förderphase bestand das Konsortium HBPP1 aus neun akademischen Gruppen und zwei Vertretern der Industrie. Ziele des Konsortiums waren die Charakterisierung von Mensch- und Mausgehirnen, die Identifizierung von Protein- und mRNA-Profilen, die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen sowie die Validierung von Proteinen, die als potenzielle Ansatzpunkte für Therapien in Frage kommen. Um diese Ziele zu erreichen, wurden vor allem die bestehenden Methoden der Proteomik weiter verbessert und neue Technologien etabliert. Zwecks Analyse der entstandenen Datenmenge der verschiedenen Gruppen wurde der Bereich der Bioinformatik ausgebaut, wobei unter anderem ein geeignetes Daten-

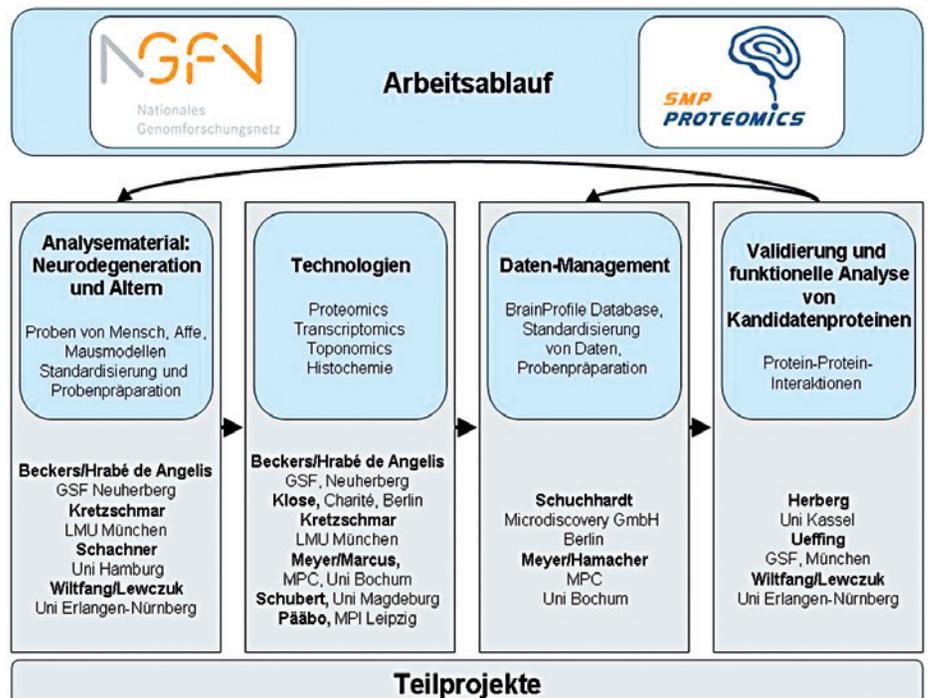


Abb. 1: Arbeitsablauf innerhalb des Konsortiums.

Tab. 1: Übersicht zu den Proben von Mensch, Maus und Affe, die im HBPP2 untersucht werden.

| | Modell für Erkrankung | Quelle |
|--------------|--|----------------------------------|
| Mensch | M. Alzheimer, Creutzfeld-Jacob-Erkrankung (CJD) | BrainNET Germany/BrainNet Europe |
| | Zerebrospinal-Flüssigkeit (CSF, Liquor) und Blut | Kompetenznetz Demenzen |
| Affe | Gehirngewebe von Schimpansen und Rhesusaffen | |
| Maus Modelle | M. Alzheimer, APP-Modell | Novartis |
| | M. Alzheimer, UBB+1-Modell | F. van Leeuwen, Amsterdam |
| | M. Parkinson, α -synuclein [$>$ Glossar] ko-Modell | G. Auburger, Frankfurt/Main |
| | M. Parkinson α -synuclein (A53T) transgenes Modell | G. Auburger, Frankfurt/Main |
| | M. Parkinson, L1ko-/MPTP-Modell | M. Schachner, Hamburg |

banksystem, die „BrainProfile“ Datenbank, entwickelt wurde, um die Daten der Genexpression- und Proteomanalysen zusammenzuführen.

Die zweite Förderphase HBPP2 startete im Jahr 2004 und wird bis 2008 andauern. Es wurde ein teilweise neues Konsortium gebildet, das sich aus neun akademischen Einrichtungen und einem Industriepartner zusammensetzt. Im HBPP2 werden die in HBPP1 entwickelten Technologien und optimierten Strategien für die Diagnose und Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen weiter ausgebaut und angewendet. Zu den wesentlichen Zielen gehören:

- (1) Der Ausbau der Technologien aus der ersten Förderphase: Proteomik-Technologien (2D-DIGE, multidimensionale Chromatographie, Massenspektrometrie), Toponomik, Genexpression-Profilung sowie funktionelle Studien.
- (2) Die Untersuchung neurodegenerativer Erkrankungen mit den neuen proteomischen und genomischen Methoden: Systematische Studien zu Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson mit vergleichenden Analysen von Mausmodellen und Patientenproben
- (3) Kollaborationen innerhalb des Konsortiums: Entwicklung von Standards für die Probenaufarbeitung und -auswertung, Ausbau einer gemeinsamen Datenbank für das Sammeln aller erzeugten Daten im Konsortium.

Der Arbeitsfluss des Konsortiums ist in Abbildung 1 dargestellt. Die einzelnen Arbeitsbereiche werden in den folgenden Paragraphen kurz erläutert.

Alzheimer durch Störungen beim Proteinabbau

Die systematische Auftrennung, Identifizierung und Charakterisierung von Proteinen im Nervensystem (Tiermodelle und Gewebe aus humanen Gehirnbanken, auch humane Körperflüssigkeiten wie Liquor und Blut) bieten einen vielversprechenden Ausgangspunkt, um die Mechanismen dieser neurodegenerativen Erkrankungen zu verstehen.

Da menschliches Probenmaterial nur sehr begrenzt zur Verfügung steht, sind Mausmodelle unverzichtbar. Es wurden knock-out, transgene und chemisch veränderte Mausmodelle untersucht, die entweder innerhalb des Konsortiums an der Deutschen Mauslinik in München-Neuherberg oder bei externen Partnern gezüchtet werden. Ein Beispiel ist die UBB+1-Maus, ein Mausmodell für Morbus Alzheimer von Dr. Fred van Leeuwen (Amsterdam, NL).

Als Ursache für die Entstehung von Morbus Alzheimer werden verschiedenste molekulare Störungen diskutiert: Stress durch schädliche reaktive Sauerstoffverbindungen, durch Mutationen begünstigte Proteinaggregation [extrazelluläre β -Plaques und intrazelluläre τ -Fibrillen $>$ Glossar] sowie Fehlfunktion der Mitochondrien und Proteasomen. Das Proteasom ist ein Multiprotein-Verbund, der eingeschleuste Proteine zu kurzen Peptiden abbaut. Der Proteinabbau ist für die Zelle lebensnotwendig. So werden metabolische Enzyme, Transkriptionsfaktoren oder auch den Zellzyklus regulierende Proteine degradiert. Ebenso werden fehlerhafte Proteine abgebaut. Der Abbau der meisten Proteine erfolgt über das

Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), wobei abzubauen Proteine mit dem kleinen Protein Ubiquitin markiert werden, um so vom Proteasom erkannt zu werden. Die Störung des UPS und der dadurch defekte Abbau von intrazellulären Proteinen tragen dabei wahrscheinlich zu vielen neuropathologischen Veränderungen und dem Absterben von Neuronen bei. Die Mechanismen, die das UPS bei Morbus Alzheimer beeinflussen, sind jedoch unklar.

Es gibt allerdings Hinweise, dass eine Variante des Ubiquitin B, sogenanntes UBB+1, ein Bestandteil von Plaques im Nervensystem ist. UBB+1 ist aufgrund einer Mutation um 19 Aminosäuren verlängert. Daraus resultiert ein Verlust des C-terminalen Glycins, das essenziell für die Anknüpfung an andere Ubiquitin-Moleküle und seine Substrate ist. Die UBB+1-Maus exprimiert diese Ubiquitin-Variante, bildet Plaques aus und kann somit als ein Mausmodell für Morbus Alzheimer dienen. Um den Zusammenhang von β -Toxizität auf der einen und proteasomaler Fehlfunktion auf der anderen Seite zu verstehen, werden diese transgenen Mäuse auf Transkriptom- und Proteom-Ebene untersucht.

Die menschlichen Proben stammen aus den Hirnbanken von BrainNet Deutschland und BrainNet Europe (www.brain-net.net) sowie aus dem Kompetenznetz Demenzen (www.kompetenznetz-demenzen.de). Gemeinsam mit Pathologen haben die HBPP-Partner dabei Standards zur Probengewinnung sowie zur mRNA- und Proteinextraktionen entwickelt. Diese standardisierten Proben werden dem gesamten Konsortium zur Verfügung gestellt. Es werden nur identische Proben für die Analysen mit den verschiedenen Technologien verwendet. Damit bleiben die Ergebnisse vergleichbar. In Tabelle 1 werden die Modelle zusammengefasst, die untersucht wurden.

Ein erster Schritt zur molekularen Diagnostik

Die Analyse der molekularen Phänotypen (mRNA- und Protein-Expressions-Profile) wird zu einem neuen Krankheitsverständnis und letztlich zu einer neuen Subklassifizierung der untersuchten Erkrankungen führen. Diese beruht nicht auf traditionellen, klinischen Phänotypen, sondern auf den molekularen pathologischen Eigenschaften. Hierbei kommen im HBPP2 sowohl eine standardisierte klinische Phänotypisierung als auch geeignete Proteomik- und Genomik-Technologien (2D-PAGE,

Multidimensionale Chromatographie, Massenspektrometrie, DNA-Arrays) zum Einsatz. Beispielsweise wurde die oben bereits erwähnte UBB+1 Maus zu verschiedenen Entwicklungsstadien auf Transkriptions- und Proteinebene durch die Deutsche Mauslinik in München-Neuherberg, und das Medizinische Proteom-Center in Bochum, untersucht, wobei signifikante Expressionsunterschiede einiger Schlüsselproteine des UPS nachgewiesen werden konnten.

Auch das Toponom, die Lokalisation der Proteine in der Zelle, zeigte signifikante Unterschiede, wie Wissenschaftler aus Magdeburg, nachweisen konnten. Darüber hinaus wurden weitere Mausmodelle für verschiedene neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Huntington und die Creutzfeld-Jakob-Erkrankung auf verschiedenen Ebenen (Proteom, Genom) analysiert. Potenzielle Biomarker müssen nach ihrer Identifikation zunächst mit herkömmlichen biochemischen Methoden validiert werden. Anschließend folgen funktionelle Studien der Proteine. Mit gehirnspezifischen Proteinen werden *in vitro* und *in vivo* Protein-Interaktionsanalysen durchgeführt. Bei diesen funktionellen Analysen handelt es sich um Methoden, die zum Beispiel auf Immunfluoreszenz- bzw. GFP-markierten Proteinen basieren (FRET/BRET).

Es konnten einige wesentliche Fortschritte zum Verständnis der neurodegenerativen Erkrankungen gemacht werden. Zum Beispiel wurde im Bereich der Erforschung von Morbus Parkinson das Gen, das am häufigsten für familiäre und sporadische Fälle der Parkinson-Erkrankung verantwortlich gemacht wird, durch eine Arbeitsgruppe am GSF München, untersucht: *LRRK2*. Mit funktionellen und biochemischen Analysen wird die genaue Funktionsweise dieses Gens weiter charakterisiert. Auch bei der molekularen Diagnose von Morbus Alzheimer können essenzielle Fortschritte verzeichnet werden. NGFN-Wissenschaftlern aus Erlangen und Nürnberg ist es gelungen, eine Methode für die Diagnose von Morbus Alzheimer zu entwickeln. Dabei wird das relative Verhältnis von A β 42/40 als Marker für diese Erkrankung bestimmt. Bei Patienten mit verändertem A β -Gesamtgehalt kann dieser Quotient eine genauere Diagnose ermöglichen.

Die Bioinformatik: Datenmanagement und Datenintegration

Die im Konsortium gewonnenen Daten werden in einer neuartigen Datenbank gesammelt, wobei neue Standards, SOPs und Softwarelösungen für das Datenmanagement sowie die Datenintegration entwickelt wurden. Da in einem großen Konsortium verschiedene Strategien, Technologien, Geräte und Ausrüstungen zum Einsatz kommen, sind die produzierten Daten recht heterogen. Die parallele Analyse der gleichen Proben mit verschiedenen Methoden führt aber zu einem umfassenderen Einblick in die bearbeitete Fragestellung. Daher wurde die „BrainProfile Database“ in Berlin etabliert. Entsprechend den internationalen Standards können verschiedene Datenformate eingelesen und interpretiert werden. Damit wurde eine Analyse von experimentellen Datensätzen aus den verschiedenen beteiligten Gruppen ermöglicht. So konnten Studien zur Identifikation von biochemischen Markern zur Früherkennung der Alzheimer Demenz durchgeführt werden. Diese schlossen u. a. einen Methodenvergleich eines Markersatzes anhand von statistischen Eigenschaften und die Identifikation stabiler und reproduzierbarer Marker ein. Des Weiteren wurden mathematische Modelle zur Entstehung von Morbus Alzheimer entwickelt, die externe Kontrollparameter, stochastische Prozesse und die technische Erweiterung der Modellierungsplattform einschlossen. Außerdem konnte das Verständnis zur Plaquebildung durch die Modellierung der Wirkung spezifischer beteiligter Proteine erweitert werden.

Das Netzwerk

Die Partner im HBPP konnten über die Projektlaufzeit von inzwischen sechs Jahren ein gut funktionierendes nationales wie internationales Forschungsnetz ausbilden. Alle Mitarbeiter treffen sich mindestens einmal jährlich zum Human Brain Proteome Meeting. Die gemeinsame Datenbank wird rege genutzt und ermöglicht allen Beteiligten einen optimalen Informations- und Probenaustausch. Die Partner im Konsortium sind federführend an Kooperationen beteiligt, die über den nationalen Rahmen des HBPP2 hinausgehen, wie beispielsweise

am internationalen Brain Proteome Project unter der Schirmherrschaft von HUPO (HUPO BPP, www.hupo.org). HUPO wurde als gemeinnützige Organisation im Jahr 2001 gegründet. Ziel von HUPO ist die Verbreitung und Entwicklung der Proteomforschung. Mehrere HUPO-Initiativen fokussieren auf verschiedene menschliche Organe, wie zum Beispiel das Liver Proteome Project (LPP), das Plasma Proteome Project (PPP) und das Brain Proteome Project (BPP) (www.hbpp.org). Das HUPO BPP wird, wie das deutsche HBPP, vom Medizinischen Proteom-Center Bochum (MPC) sowohl administrativ koordiniert als auch inhaltlich mitgestaltet. Von Bochum aus wird auch das Proteomics Data Collection (ProDaC, www.fp6-prodac.eu) geleitet, eine internationale Initiative, die die Standardisierung der proteomischen Daten und bioinformatischen Analyse zur Aufgabe hat. Die Mitglieder des HBPP sind in diesen und vielen weiteren Projekten engagiert beteiligt und haben weitere verwandte Projekte ins Leben gerufen, wie z. B. das EU-geförderte Projekt cNEUPRO.

Ausblick

Sechs Jahre Human Brain Proteome Project im NGFN haben gezeigt, dass interdisziplinäre Forschung auf hohem Niveau nicht nur möglich, sondern auch erfolgreich sein kann. Die Entwicklung und Anwendung neuester Techniken in Proteomik sowie in funktioneller Genomik unter standardisierten Bedingungen erlauben die strukturierte Analyse komplexer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson. Unterstützt durch eine geeignete Bioinformatik und Biostatistik können auf diese Weise Kandidatenproteine für Frühdiagnose und Therapie identifiziert werden. Die Ergebnisse des HBPP2 werden Anfang 2008 in einem Sonderband der Zeitschrift PROTEOMICS erscheinen, der einen vollständigen Überblick über die Arbeit des Konsortiums geben wird.

Kontakt

Tanja Hardt
 Medizinisches Proteom-Center
 Ruhr-Universität Bochum, ZKF E.143
 Universitätsstraße 150, 44801 Bochum
 E-Mail: Tanja.Hardt@rub.de

Unersetzliche Werkzeuge für Genprodukte

Die Antikörperfabrik – Antikörper für die funktionale Genomforschung

Thomas Schirrmann, Michael Hust und Stefan Dübel

Antikörper [> Glossar] sind unersetzliche Werkzeuge für die Analyse von Proteinen und damit Schlüsselreagenzien für die Bewältigung der gegenwärtigen Hauptaufgabe der Genomforschung – der Zuordnung von Funktionen zu den vielen noch uncharakterisierten Gensequenzen und den dazugehörigen Genprodukten. Zur Bewältigung dieser monumentalen Aufgabe arbeitet die SMP Antikörperfabrik (Antibody Factory) an der Weiterentwicklung des Phagen-Displays. Dabei werden spezifische Antikörper aus menschlichen Antikörper-Genbibliotheken [> Glossar] vollständig versuchstierunabhängig in Bakterien hergestellt. Diese Reagenzglas-Technologie (*in-vitro*) ermöglicht

die Miniaturisierung und Automatisierung der Antikörperselektion und -charakterisierung. Im Gegensatz zu versuchstierabhängigen Methoden werden nicht nur die Antikörper selbst isoliert, sondern gleichzeitig auch die Gensequenzen, die für die jeweiligen Antikörperfragmente kodieren. Dadurch ergeben sich ganz neue Möglichkeiten für die Modifikation und den Einsatz der Antikörper bei der Untersuchung der Funktionen unbekannter Gene.

Ein Antikörper und sein Zielprotein

Fast jeder Zellbiologe oder Biochemiker hat schon einmal Antikörper eingesetzt, um ein

Protein zu charakterisieren, zu reinigen, oder um zu untersuchen, wo es in der Zelle lokalisiert ist. Im Rahmen des Humangenomprojektes und bei vielen weiteren Genomanalysen wurde eine immense Anzahl von Genen und Genprodukten identifiziert, deren Funktion es zu bestimmen gilt. Für ihre Erforschung werden viele tausend Antikörper benötigt (Abb.1). Besondere Relevanz hat hier die Untersuchung klinischer Proben, z. B. die Analyse von Geweben (*tissue profiling*). Mithilfe von Antikörpern kann auch nach Interaktionspartnern des unbekanntes Gens gesucht werden. Hierbei wird ein Nachweisverfahren eingesetzt, bei dem ein spezifischer Antikörper an sein Zielprotein bindet und anschließend der Antikörper-Protein-Komplex ausgefällt und aufgereinigt wird (*pull-down*). An das Zielprotein gebundene Interaktionspartner werden mitausgefällt und können dann mit molekularbiologischen Methoden identifiziert werden.

In der Antikörperfabrik konnte gezeigt werden, dass es auch möglich ist, in der lebenden Zelle durch intrazelluläre Produktion der Antikörper bestimmte Proteine hochspezifisch herunterzuregulieren oder zu inaktivieren (*knock-down/knock-out*).

Die in der Antikörperfabrik eingesetzte versuchstierunabhängige Antikörperproduktion hat mehrere wesentliche Vorteile gegenüber der Antikörpergewinnung durch Immunisierung von Tieren. Die herkömmliche Antikörperproduktion in Mäusen, Ratten oder Kaninchen stößt oft an ihre Grenzen, denn nicht jedes Protein ruft eine Immunantwort und damit die Bildung von Antikörpern hervor. Außerdem können Antikörper gegen körpereigene und hochkonservierte Proteine sowie gegen giftige Substanzen oft nur schwierig oder gar nicht isoliert werden. Solche Schwierigkeiten lassen sich mit der *in-vitro*-Herstellung von Antikörpern vermeiden, denn diese Methode umgeht das Immunsystem und ermöglicht eine vollständige Kontrolle des biochemischen Milieus während des eigentlichen Antikörperselektionsprozesses. So lassen sich auch Antikörper erzeugen,

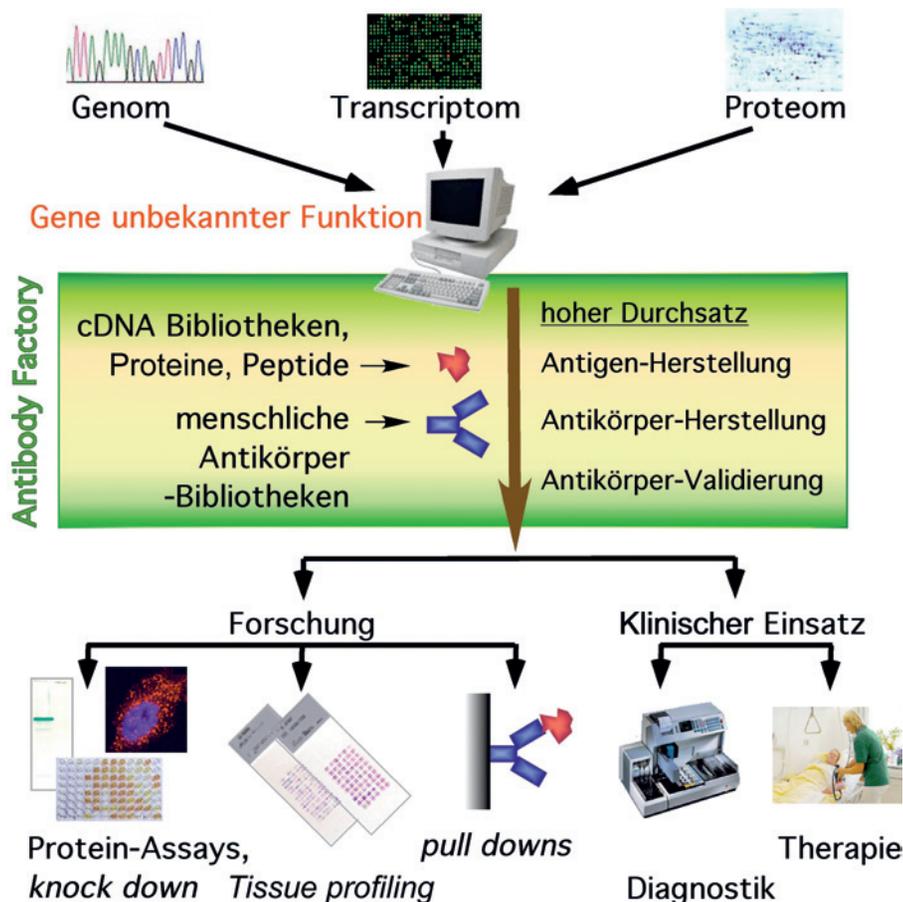


Abb. 1: Die Aufgaben der „Antibody Factory“.

die Strukturvarianten eines Proteins erkennen, z. B. nach Bindung eines Co-Faktors.

Wie Goldwaschen mit der Pfanne

Das Phagen-Display ist die weitverbreitetste Technologie zur *in-vitro*-Selektion von Antikörpern. Bei dieser Methode kommen bestimmte Viren zum Einsatz, Bakteriophagen oder kurz Phagen [$>$ Glossar], die sich an die Oberfläche von Bakterien heften und ihr Erbgut in das Bakterium einschleusen. Beim Antikörper-Phagen-Display werden Antikörperfragmente als Fusionsprotein mit einem Phagen-Hüllprotein produziert, so dass der Antikörper auf der Oberfläche des Phagen präsentiert wird. Das Gen für den Antikörper ist im Phagen-genom bzw. typischerweise auf einem speziellen Phagemidvektor [$>$ Glossar] lokalisiert, der im Phagen verpackt wird. Auf diese Weise befinden sich das Antikörpergen und dessen Genprodukt, der Antikörper, im bzw. auf demselben Phagenpartikel. Die Antikörpergene können so anhand der von ihnen kodierten Antigenbindungsfunktionen identifiziert und isoliert werden. Dieser Selektionsprozess von Antikörpern aus einer Antikörper-Genbibliothek wird in Anlehnung an die Goldsuche als Panning bezeichnet. Ähnlich wie beim Goldwaschen mit der Pfanne, gibt es auch beim Antikörper-Phagen-Display einen sich wiederholenden Waschprozess, der es ermöglicht, aus der großen Vielfalt verschiedener Moleküle, die in einer Antikörper-Genbibliothek enthalten sind, spezifische Antikörper aufgrund ihrer Bindestärke herauszusortieren. Dazu wird das Protein, gegen das man einen Antikörper gewinnen möchte, auf einer festen Oberfläche – z. B. in einem Plastikröhrchen oder an magnetischen Partikeln – immobilisiert. Nach Inkubation mit einem Gemisch von Milliarden verschiedener Antikörper-Phagen (aus einer Antikörper-Genbibliothek) werden die nicht oder nur schwach gebundenen Antikörper-Phagen weggewaschen. Nach mehreren Waschschrritten bleiben nur Phagen mit dem spezifischen Antikörperfragment an das Protein gebunden. Sie werden im nächsten Schritt von dem immobilisierten Protein abgelöst, in das Darmbakterium *Escherichia coli* infiziert und dort vermehrt, wodurch eine selektive Anreicherung erzielt wird. Dieses Antikörper-Phagengemisch kann in weiteren Panning-Runden eingesetzt werden, wobei mit jeder Runde der Anteil an antigenspezifischen Antikörper-Phagen zunimmt

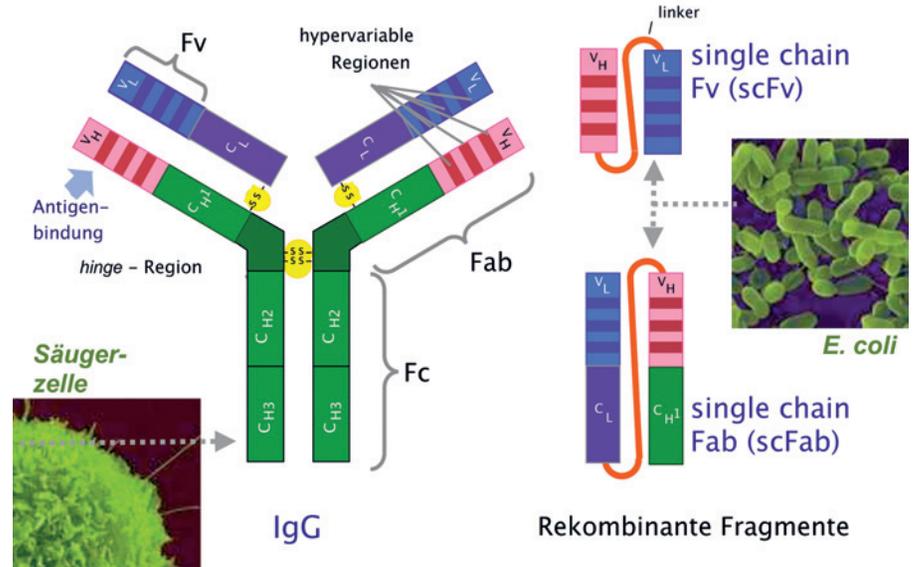


Abb. 2: Die rekombinanten Antikörperformate der Antibody Factory.

Die Herausforderung: Antikörper gegen viele Antigene

Die *in-vitro*-Selektionsmethoden und das Antikörperformat wurden bisher fast ausschließlich für den Einsatz humaner Antikörper in der Therapie optimiert. Die Therapeutikaentwicklung ist auf wenige, sehr gut charakterisierte Antigene [$>$ Glossar] ausgerichtet, die in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Außerdem werden die therapeutischen Antikörper meistens auch im Hinblick auf Stabilität, Bindestärke und Pharmakokinetik [$>$ Glossar] optimiert, und sie werden so konstruiert, dass sie nicht als körperfremd eingestuft werden und keine oder nur eine geringe Immunantwort auslösen. Die Anforderungen an den Antikörper-Selektionsprozess für den breiten Einsatz in der Forschung sind dagegen völlig anders. Eine Optimierung der Antigengewinnung und der Antikörper ist viel zu aufwändig und sollte aus Zeit- und Kostengründen vermieden werden. Die Antikörper müssen also in einem robusten Format vorliegen, das kompatibel zu den etablierten Tests in Forschung und Diagnostik ist und möglichst keine weitere individuelle Optimierung der Antikörper erfordert. Aus diesen Gründen wurden Antikörperfragmente aus Phagen-Display-Bibliotheken bisher kaum in der Grundlagenforschung eingesetzt. Als besonders kritischer Punkt erwies sich das Format des Antikörpers. Beim Phagen-Display werden meistens single chain Fv-Fragmente (scFv-) (Abb. 2) verwendet, die aus den variablen Regionen der schweren und der leichten Antikörperkette und einem sie verbindenden Peptidlinker bestehen. Doch der Einsatz von scFv-Fragmenten bereitet auch

Schwierigkeiten: Zum einen lassen sie sich nur durch spezielle Methoden nachweisen, zum anderen sind sie manchmal nicht stabil genug. Als Alternative bietet sich das Fab-Format an. Die Antikörperfragmente bestehen in diesem Fall aus der leichten Kette und den Endteilen der schweren Ketten. Das Fab-Format ist aufgrund der zusätzlichen konstanten Antikörperdomänen nicht nur sehr stabil, sondern in aller Regel auch kompatibel mit bestehenden Antikörper-tests. Der Nachteil des Fab-Fragmentes liegt jedoch darin, dass zwei unterschiedliche Antikörperketten in *Escherichia coli* synthetisiert und in dessen Periplasma korrekt zusammenlagert werden müssen. Deshalb wurde in der Antikörperfabrik das single chain Fab-Format (scFab) entwickelt, welches die Vorteile des scFv-Fragmentes mit denen des Fab-Fragmentes vereint. Beim scFab sind die leichte Kette und das Endfragment der schweren Kette durch einen langen Peptidlinker verbunden, so dass das Bakterium nur eine Polypeptidkette synthetisieren und ins Periplasma [$>$ Glossar] transportieren muss und die beiden Antigenbindungsdomänen wesentlich einfacher zusammenfinden. Gleichzeitig sind Stabilität und Anwendungscompatibilität mit denen des Fab-Fragmentes vergleichbar.

Das Antikörper-Phagen-Display hat den Vorteil, dass der gesamte Prozess von der Genidentifikationsnummer bis zum fertigen Antikörper automatisierbar ist. So können möglichst viele Antikörper gleichzeitig hergestellt werden, um den Anforderungen der funktionalen Genomprojekte nachzukommen. Außerdem können bei dieser Methode viele Schritte des

Antikörperherstellungprozesses parallel durchgeführt werden. So können z. B. Mikrotiterplatten verwendet werden, die mit Pipettier-Robotern und anderen Automatisierungstechnologien kombinierbar sind, so dass sich zahlreiche Proben gleichzeitig untersuchen und bearbeiten lassen.

Ein weiteres Projekt widmet sich der Bereitstellung von Proteinen, mit denen die Phagen-Antikörper-Bibliothek durchsucht wird. Denn meistens liegt dem Forscher nur die DNA-Sequenz vor, das Protein, für das in der Bibliothek der passende Antikörper gefunden werden soll, ist aber nicht verfügbar oder nur schwer herstellbar. Als alternative Antigenquelle werden in der Antikörperfabrik deshalb synthetische Peptide hergestellt, die auf Computerprognosen basieren und mit denen oft ebenfalls die passenden Antikörper aus Antikörper-Genbibliotheken isoliert werden können. Dieser Ansatz könnte die aufwändige Produktion vollständiger Antigene unnötig machen und auch die Herstellung von Antikörpern gegen „problematische Antigene“ erleichtern.

Aufgaben und Erfolge der Antikörperfabrik

Die Aufgabe der Antikörperfabrik ist es, die Herstellung von Antikörpern für die Proteomforschung zu optimieren. Um die Grundlage dafür zu schaffen, müssen zunächst zahlreiche

Parameter für die Herstellung, Charakterisierung und Anwendung von Antikörpern untersucht werden. Durch den Aufbau und die erfolgreiche Validierung einer höchst komplexen Antikörper-Genbibliothek (>109 unabhängige Klone), eine deutliche Vereinfachung der erforderlichen Prozessschritte und das *proof-of-principle* eines neuen, robusteren Antikörperformates wurden bereits wesentliche Schritte auf diesem Weg getan.

Die nun anstehende anspruchsvolle Aufgabe, eine validierte Sammlung von Antikörpern gegen alle menschlichen Proteine herzustellen, ist so umfangreich, dass sie auf viele verschiedene Labore verteilt werden muss. Die Antikörperfabrik arbeitet deshalb im Rahmen der Europäischen Initiative *Proteome Binders* eng mit anderen wichtigen Einrichtungen zusammen. Immerhin müssen 30 000 bis 100 000 verschiedene Antikörper hergestellt werden, um gegen jedes menschliche Eiweiß einen Antikörper verfügbar zu haben. Allein in der Testphase der Antikörperfabrik wurden bereits über 1 000 monoklonale Antikörper gegen mehr als 120 sehr verschiedene Antigene hergestellt.

In der Antikörperfabrik konnten außerdem neue Einsatzgebiete von Antikörpern für die funktionale Genomforschung demonstriert werden, wie z. B. die Ausschaltung (knock-out) einzelner Proteine durch die Produktion von intrazellulären Antikörpern gegen sie. An die-

sem Beispiel wird ein Vorteil der *in-vitro*-Herstellung von Antikörpern besonders deutlich: Das kodierende Gen für den Antikörper steht von Anfang an zur Verfügung und kann direkt für neuartige funktionale Nachweisverfahren eingesetzt werden, die mit herkömmlichen Antikörpern generell nicht möglich sind. Die Antikörperfabrik eröffnet so auch ganz neue Wege für die Erforschung unbekannter Genfunktionen.

Literatur

- Breitling, F. et al. (1991). A surface expression vector for antibody screening. *Gene* 104, 147-153
- Hust, M., and Dübel, S. (2004). Mating antibody phage display with proteomics. *TiBtech* 22, 8-14
- Hust, M. et al. (2007) Single chain Fab (scFab) fragment. *BMC-Biotechnology* 7:14
- Konthur, Z. et al. (2005) Perspectives for systematic *in vitro* antibody generation. *Gene* 364, 19-29
- Taussig, M.J. et al. (2007) *ProteomeBinders: Planning a European Resource of Affinity Reagents for Analysis of the Human Proteome*, *Nature Meth.* 4, 13-17

Kontakt

Prof. Dr. Stefan Dübel
 Technische Universität Braunschweig
 Institut für Biochemie und Biotechnologie
 Abteilung Biotechnologie
 Spielmannstraße 7, 38106 Braunschweig
 E-Mail: s.duebel@tu-bs.de

Mäuse als Modelle für menschliche Erkrankungen

Beatrix Naton, Thomas Floss, Valérie Gailus-Durner, Johannes Beckers, Wolfgang Wurst, Martin Hrabé de Angelis

Genetisch bedingte Erkrankungen können alle Organsysteme betreffen und entweder früh im Leben oder erst später im Alter auftreten. Die Ursache von Volkskrankheiten wie Arteriosklerose, Diabetes mellitus, Osteoporose oder Depression beinhaltet auch immer genetische Anteile. Zur Aufklärung der molekularen Ursachen genetisch bedingter Erkrankungen hat sich die Maus als Modellorganismus etabliert. So ist das Genom der Maus zu 95 % mit dem des Menschen identisch – viele Gene entsprechen einander und können beim Menschen und bei der Maus dieselbe Krankheit auslösen. Um Modelle für menschliche Erkrankungen zu erzeugen, lässt sich das Genom der Maus mit verschiedenen Methoden verändern. Solche

Veränderungen auf genetischer Ebene können Störungen in der Funktionsweise von Organen, der Physiologie und im Verhalten der Maus verursachen. Die umfassende Analyse des veränderten Phänotyps dient dem Verständnis der Genfunktion(en) und schafft Grundlagen für die Entwicklung neuer Behandlungs- und Diagnosemethoden menschlicher Erkrankungen.

Innerhalb des Nationalen Genomforschungsnetzes wurde ein international kompetitives Forschungsprogramm errichtet, welches das ganze Spektrum der Mausgenetik inklusive umfassender Phänotypisierung beinhaltet, um Modelle für die Pathogenese menschlicher Erkrankungen zu erstellen, umfassend zu analysieren und zu archivieren.

Gene in der Falle

Mutante Mauslinien können mit verschiedenen Methoden erzeugt werden: Durch eine gezielte Behandlung mit erbgutverändernden Chemikalien wie Ethylnitrosoharnstoff (ENU) oder mittels molekularbiologischer Methoden. Hier bietet sich besonders die Verwendung von Genfallen [gene trapping > Glossar] an. Dabei wird Fremd-DNA mithilfe eines Vektors [> Glossar] in das Mausgenom eingeschleust und stört dort die Gensequenz. Dadurch kann das von dem jeweiligen Gen kodierte Protein nicht mehr gebildet werden. Das betroffene Gen lässt sich leicht identifizieren, indem man die mutierte Sequenz mit dem bekannten Mausgenom vergleicht. Führt man die Genfallenmuta-

| | | Age [weeks] | | | | | | | | | | |
|---------------------|------------------------------|---------------------------------|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | | 0 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| Pipeline 1 | Screens | | | | | | | | | | | |
| | Methods | | | | | | | | | | | |
| | Dysmorphology | anatomical observation | | | | | | | | | | |
| | | DEXA, X-ray | | | | | | | | | | |
| | Cardiovascular | blood pressure | | | | | | | | | | |
| | | heart weight | | | | | | | | | | |
| | Energy Metabolism | calorimetry | | | | | | | | | | |
| | Clinical Chemistry | simplified PGTT | | | | | | | | | | |
| | Eye | eye size (LEB) | | | | | | | | | | |
| | Lung Function | plethysmography | | | | | | | | | | |
| Miscel. Phenotyping | expression profiling | | | | | | | | | | | |
| | | Age [weeks] | | | | | | | | | | |
| | | 0 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 |
| Pipeline 2 | Behaviour | open field | | | | | | | | | | |
| | | acoustic startle & PPI | | | | | | | | | | |
| | Neurology | modified SHRPA, grip strength | | | | | | | | | | |
| | | rotarod | | | | | | | | | | |
| | Hocception | hot plate | | | | | | | | | | |
| | Eye | ophthalmoscopy & slit lamp | | | | | | | | | | |
| | Clinical Chemistry | clinical chemical analysis | | | | | | | | | | |
| | | haematology | | | | | | | | | | |
| | Immunology / Allergy | FACS analysis of PBcs, Ig conc. | | | | | | | | | | |
| | Steroid Metabolism | DHEA, testosterone | | | | | | | | | | |
| Cardiovascular | ANP | | | | | | | | | | | |
| | ECG or Echo | | | | | | | | | | | |
| Pathology | micro & microscopic analysis | | | | | | | | | | | |

Abb. 1: Der Phänotypisierungsworkflow in der Deutschen Mauslinik.



Abb. 2: Mithilfe des Mikrocomputertomographen werden Skelettfehlbildungen visualisiert und vermessen.

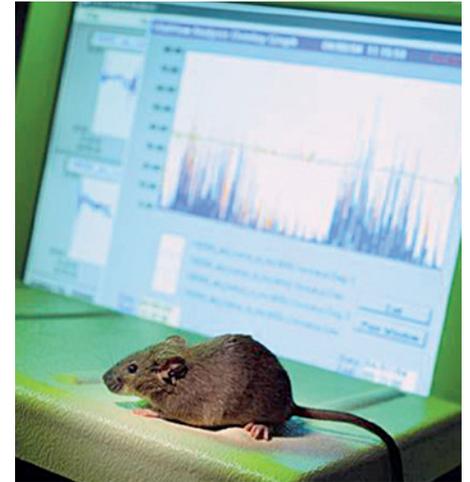


Abb. 3: Auch Mäuse folgen einem Tag-Nacht-Rhythmus, wie das Aktivitäts- und Körpertemperaturprofil auf dem Bildschirm zeigt.

genese an embryonalen Stammzellen der Maus durch und bringt die so manipulierten Zellen in einen drei Tage alten Embryo hinein, so beteiligen diese sich an der Entwicklung aller Körperzellen und sogar bei der Entwicklung der Keimzellen der entstehenden Maus. Es entsteht eine mutante Mauslinie, die eine funktionelle Genanalyse im Kontext des Gesamtorganismus ermöglicht.

Die Genfallen-Technologie wird im Deutschen Genfallenkonsortium (German Gene Trap Consortium (GGTC), www.genetrap.de) zur Hochdurchsatzmutagenese des Mausgenoms genutzt. Seit seiner Gründung hat das GGTC bereits 60 439 mutierte Maus-ES-Zellklone [$>$ Glossar] generiert. Hierfür wurden insgesamt 75 unterschiedliche und teilweise neuartige Genfallen entwickelt und eingesetzt. Für 43 842 dieser Klone konnte der Ort der Vektorintegration bestimmt und das mutierte Gen annotiert werden, was die Effizienz des Ansatzes verdeutlicht. Durch die Arbeiten des GGTC wurde es möglich, das von der EU geförderte EUCOMM Konsortium (www.eucomm.org) mit dem Ziel zu gründen, alle Gene der Maus konditional, d. h. reversibel, zu mutieren. Beide Konsortien, das GGTC und EUCOMM, sind außerdem Gründungsmitglieder des International Gene Trap Consortiums (IGTC, www.igtc.org.uk), das in einem weltweiten Projekt die komplette Mutagenese des Mausgenoms anstrebt.

Die bereits vom GGTC mutierten Klone repräsentieren derzeit 6 910 unterschiedliche Gene; 507 dieser Gene werden mit humanen Erkrankungen in Verbindung gebracht, z. B. neurologischen, (Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und Schizophrenie) und psychiatri-

schen Krankheiten (Depression und Angst-/Panikerkrankungen) sowie mit unterschiedlichen Arten von Krebserkrankungen (Leukämie, Brustkrebs, Melanom).

Mit dieser Technologie wurde beispielsweise erst kürzlich eine *HDAC2*-defiziente Maus erzeugt, die im Gegensatz zu genetisch unveränderten Kontrollmäusen (Wildtyp), auch bei starker Belastung, z. B. durch Stress oder Überanstrengung, keine belastungsbedingte Vergrößerung des Herzens zeigt. Gelänge es, die *HDAC2*-Genexpression spezifisch zu hemmen, so könnte ein Medikament gegen diese Form von Herzinsuffizienz entwickelt werden. Eine umfassende Phänotypisierung dieser Mauslinie findet zurzeit in der Deutschen Mauslinik statt.

Eine Diagnoseklinik für die Mäuse

Die German Mouse Clinic (GMC, www.mouseclinic.de) wurde in enger Zusammenarbeit mit den Münchener Universitäten TUM und LMU sowie den Universitäten von Bonn, Heidelberg und Marburg an der GSF in München/Neuherberg zur standardisierten und umfassenden Analyse der wachsenden Zahl von Mausmutanten errichtet. Diese Plattform bietet eine umfangreiche Phänotypisierung von Mausmodellen, die mit unterschiedlichen Methoden erstellt wurden (transgene und knock-out Linien, ENU-Linien, Genetrap-Linien). Hier arbeiten Experten aus verschiedenen Bereichen der Mausphysiologie, -genetik und -pathologie in enger Kollaboration mit Klinikern zusammen. Labor- und Tierhaltungsräume wurden in einem Gebäude integriert. Dies erlaubt nicht nur standardisierte Mess- und Haltungsbedingungen, sondern fördert auch insbesondere den wis-

senschaftlichen und interdisziplinären Austausch.

Mutante Mauslinien werden in einem systemischen Screen umfassend auf grundlegende, phänotypische Veränderungen getestet. Die Untersuchungen beinhalten Messungen auf den Gebieten Allergie, Augen, Energiemetabolismus, Herz-Kreislauf, klinische Chemie, Knochen und Knorpel, Lungenfunktion, molekulare Phänotypisierung, Neurologie, Schmerz-wahrnehmung, Steroidmetabolismus, Pathologie und Verhalten.

Der Primärscreen, in dem mehr als 320 Parameter gemessen werden, dient dem Auffinden auffälliger Phänotypen. Die Tiere werden nach Geschlechtern getrennt untersucht, um auch geschlechtsspezifische Auffälligkeiten erfassen zu können. Die Reihenfolge und Auswahl der Untersuchungen ist auf die spezifischen Anforderungen der einzelnen Screens abgestimmt. Geräte und Methoden aus dem normalen Klinikbetrieb wurden der Größe und den Anforderungen der Mäuse angepasst. Die Blutuntersuchung mit einem automatischen Blutanalysator oder die Analyse mit einem Knochendichtemessgerät, gehören genauso dazu wie z. B. Röntgenaufnahmen. Weitere, eingehendere Untersuchungen (sekundäre und tertiäre Screens), wie zum Beispiel die Untersuchung mit Mikrocomputertomographie oder Elektroenzephalographie, werden von den einzelnen Labors der GMC ebenfalls angeboten.

Bei der systemischen Untersuchung der ersten 70 mutanten Mauslinien wurden überraschenderweise in 90 % der Linien veränderte Parameter gefunden. Viele hochsignifikante Unterschiede sind zudem geschlechtsabhän-

gig. Auch konnten neue, bisher nicht bekannte Phänotypen bei Mausmutanten gezeigt werden, die schon längere Zeit etabliert sind, bisher jedoch nicht einer so umfassenden Phänotypisierung unterzogen werden konnten. Weltweit einzigartig ist das Konzept der GMC: Es werden nicht nur Mauslinien aus den eigenen Forschungsbereichen untersucht, sondern jeder interessierte Forscher kann „seine“ Mauslinie auf der Basis einer wissenschaftlichen Kollaboration untersuchen lassen.

„Berühmte“ Mauslinien

Im Dymorphologiemodul, das auch gleichzeitig die Aufnahmestation ist, wird jeder Maus eine Nummer zugewiesen, sie wird gemessen und gewogen, auf Fehlbildungen untersucht und die körperliche Konstitution notiert. Hier wird die Maus auch geröntgt und ihre Knochendichte und Körperzusammensetzung gemessen. So lassen sich Mäuse mit Knochen- und Knorpeldefekten wie Krümmung der Wirbelsäule (Skoliose) und Osteoporose identifizieren. Mit einem speziell für die Mauslinie miniaturisierten Computertomographen können dreidimensionale Bilder der inneren Organe und Knochen erzeugt werden.

Beispielsweise wurde nach ENU-Mutagenese (Munich ENU Mutagenesis Project) eine Mauslinie entdeckt, die alle klinischen Symptome der Glasknochenkrankheit (Osteogenesis imperfecta) aufweist: Kleinwuchs, Osteoporose, deformierte Knochen, Skoliose, starke Neigung zu Knochenbrüchen und Hautveränderungen. Im Serum offenbarten sich erhöhte Werte der Knochenstoffwechselmarker Osteocalcin, TRACP 5b, Parathormon und Calcitonin. Diese Mäuse sind durch einen gesteigerten Knochen turnover und Osteoblastenapoptose gekennzeichnet und sprechen auf die gleiche medikamentöse Therapie mit Biphosphonaten wie Patienten an. Diese Mauslinie ist somit ein Werkzeug zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Glasknochenkrankheit.

Ein weitere berühmte Mauslinie aus dem Dymorphologiescreen ist die sogenannte Beethoven-Maus, die im Alter taub wird. Diese Mauslinie ist ein Modell zur Erforschung der genetischen altersbedingten Degeneration der inneren und äußeren Haarzellen im Corti-Organ.

Vollständiger Checkup

In den nächsten Modulen Verhalten, Neurologie und Nozizeption werden Reflexe, Koordination, Muskelkraft und Sinneswahrnehmung

geprüft. Auch das Lernvermögen und Sozialverhalten kann getestet werden. So lassen sich Rückschlüsse auf Depressions- und Angsterkrankungen ziehen, oder Hinweise auf neurodegenerative Erkrankungen und Muskeldystrophien finden.

Im Augenscreen gibt die natürliche Folgereaktion der Augen und des Kopfes auf bewegte Bilder einen ersten Hinweis, ob die Mäuse sehen können. Mit speziellen Lupenlampen untersuchen die Augenspezialisten dann Linse, Hornhaut und Augenhintergrund und vermessen die Augenlänge.

Wie in einer Diagnoseklinik wird ein Blutbild in der klinisch-chemischen Abteilung erstellt. In einer Blutprobe werden Neigung zu Allergien, pathologische Veränderungen im Hormonspiegel, Elektrolythaushalt, Blutbild, Glukosespiegel, Enzymaktivitäten und Immunstatus sichtbar gemacht. Eine ENU-Mauslinie war beispielsweise durch verstärktes Trinken bei gleichzeitig erhöhter Harnproduktion aufgefallen. Eine Blutanalyse brachte den entscheidenden Hinweis: Der Elektrolytspiegel und die Harnstoffkonzentration im Blutplasma waren verändert, alles Indizien für das Bartter-Syndrom, einer seltenen erblichen Nierenfunktionsstörung. Mit diesen Hinweisen konnte man das für den Phänotyp verantwortliche Gen schnell identifizieren.

Die genetischen Komponenten von Übergewicht werden in der Energiestoffwechsellabteilung untersucht, indem der tägliche Futterkonsum gemessen und der Energieverbrauch bestimmt wird. Mit speziellen Diäten kann der Einfluss der Ernährungszusammensetzung auf das Gewicht und die Blutwerte untersucht werden.

Zu einem vollständigen Checkup gehören auch noch ein EKG und eine Blutdruckmessung im Herz-Kreislaufmodul und die Messung des Atemmusters im Lungenfunktionsscreen. Am Ende der Untersuchungen werden alle Organveränderungen in einer ausführlichen histologischen Untersuchung dokumentiert und die Genexpressionsmuster in betroffenen Organen mittels DNA-Chip-Technologie analysiert. Erst durch diese systemische Herangehensweise, die alle Organsysteme betrachtet, wurden die Erfolge und neuen Erkenntnisse möglich.

Welche Rolle spielt die Umwelt?

Einen wichtigen Platz nimmt in der Deutschen Mauslinie die Aufklärung umweltbedingter Erkrankungen ein. Welche Rolle spielt die Ernährung bei Mäusen mit einer Prädispo-

sition für Diabetes? Verzögert Bewegung einen Ausbruch? Wie greift Feinstaub in das allergische Geschehen ein? Welchen Einfluss hat Stress auf den Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen? Diese und andere Fragen versucht man in der neu geschaffenen Challengeplattform zu beantworten, in der die Mäuse kontrollierten veränderten Umweltbedingungen ausgesetzt werden.

In der nächsten Zeit werden speziell für einige klinische Arbeitsgruppen des NGFN erzeugte Linien in der Mauslinie untersucht. Gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung werden für 32 Gene mutante Mauslinien hergestellt. Die ausgewählten Gene werden mit einer weiten Spanne von Leiden in Verbindung gebracht, unter anderem Brustkrebs, Prostatakrebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Immunerkrankungen (Allergien, Neurodermitis), Rheuma und sogenannten umweltbedingten Erkrankungen wie Morbus Crohn. Für diese Gene haben bis heute geeignete Mausmodelle, an denen man die physiologischen Veränderungen, die letztendlich zum Ausbruch einer Krankheit führen, untersuchen kann, gefehlt.

Auf europäischer Ebene hat die Deutsche Mauslinie federführend an der Entwicklung eines gemeinsamen europäischen Phänotypisierungsstandards mitgewirkt (EUMORPHIA, www.eumorphia.org/). Die standardisierten Protokolle sind der wissenschaftlichen Gemeinschaft frei zugänglich. Im Rahmen von EUMODIC (The European Mouse Disease Clinic, www.eumodic.org/) werden in den nächsten Jahren mit Mauskliniken aus Frankreich und England die von EUCOMM generierten mutanten Mauslinien für wichtige Krankheiten nach diesen Protokollen analysiert.

EMMA – das Europäische Maus Mutanten Archiv

Das letzte Glied in der Kette nach der Erstellung und umfassenden Phänotypisierung von Mausmodellen stellt die Archivierung dieser mutanten Linien dar. Die bereits erwähnte Ähnlichkeit der Genomsequenz zwischen Mensch und Maus, die entscheidend zur Etablierung der Maus als Modell für humane Erkrankungen beitrug, und die Entwicklung neuer Technologien zur Herstellung von Mausmutanten haben die Anzahl an Linien in den letzten Jahren sehr stark ansteigen lassen. Damit diese wertvollen Mauslinien erhalten bleiben, wurde es unumgänglich, ein zentrales Archiv aufzubauen, in dem die Mutanten sicher

aufbewahrt werden. Das Europäische Maus Mutanten Archiv EMMA (www.emmanet.org), hat sich neben der Archivierung auch die Bereitstellung dieser Tiere zu Forschungszwecken an die wissenschaftliche Gemeinschaft zum Ziel gesetzt. In EMMA werden die mutanten Mauslinien in Form von Spermien oder Embryonen kryokonserviert. Diese werden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und können zu einem beliebigen Zeitpunkt in Form lebender Tiere oder, je nach Bedarf, auch im kryoarchivierten Zustand interessierten Wissenschaftlern zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt werden. An EMMA sind sieben Institute sechs verschiedener europäischer Länder beteiligt (Deutschland, England, Frankreich, Italien, Portugal, Schweden). Das Konsortium wird von Martin Hrabé de Angelis an der GSF geleitet. Außerdem ist EMMA ein Gründungsmitglied von FIMRe (The Federation of International Mouse Resources, www.fimre.org), einer weltweiten Kooperation der Mausarchive und -Ressourcen. Der EMMA-Direktor Martin Hrabé de Angelis ist auch gleichzeitig der Vizepräsident im Gremium der europäischen Direktoren.

Ausblick

In Zukunft werden besonders komplexe genetische Erkrankungen von weitem Interesse sein. Zu ihrer funktionellen Analyse werden internationale Anstrengungen unternommen, wobei Deutschland dank der Bündelung der Projekte im NGFN eine sichtbare und führende Rolle einnimmt. Die systemische Analyse von Mausmodellen findet als wegweisendes Konzept breite Anerkennung und setzt bereits heute einen neuen Standard in der Charakterisierung von Modellen. Insbesondere die Humanisierung von Mäusen (Einschleusung humaner Mutationen und humaner Signaltransduktionsketten in Mäuse) sind die neuen Herausforderungen und Werkzeuge. Weiterhin ist die enge Zusammenarbeit von Grundlagenforschung mit klinischen Gruppen das Konzept der Zukunft. Auch hierbei spielt das NGFN mit der Helmholtz-Gemeinschaft (HGF) eine essenzielle Rolle.

Literatur

- Gailus-Durner, V. et al. (2005) *Introducing the German Mouse Clinic: Open access platform for standar-*

dized phenotyping. Nature Methods 2(6), 403-4

- Vreugde, S. et al. (2002) *Beethoven, a mouse model for dominant, progressive hearing loss DFNA36. Nature Genetics* 30, 257-258

- Hansen, J. et al. (2003) *A large scale, gene-driven mutagenesis approach for functional analysis of the mouse genome. Proc. Natl. Acad. Sci USA* 100, 9918-9922.

- Trivedi, CM. et al. (2007) *Hdac2 regulates the cardiac hypertrophic response by modulating Gsk3 beta activity. Nature Medicine* 13(3), 324-31

- Lisse, T. et al. (2008) *ER stress-mediated apoptosis in a new mouse model of osteogenesis imperfecta. (Submitted)*

Kontakt

Prof. Dr. Martin Hrabé de Angelis

GSF-Forschungszentrum für

Umwelt und Gesundheit

Institut für Experimentelle Genetik

Ingolstädter Landstraße 1

85764 München-Neuherberg

E-Mail: hrabe@gsf.de

Wie man aus Interventionseffekten über Signalwege in einer Zelle lernen kann

Holger Fröhlich, Mark Fellmann, Ruprecht Kuner, Annemarie Poustka, Holger Sülthmann, Tim Beissbarth

Systembiologie und Interventionseffekte

In der Abteilung Molekulare Genomanalyse am DKFZ werden Hochdurchsatzdaten produziert und analysiert, um ein besseres Verständnis über die molekularen Prozesse zu bekommen, die bei der Krebsentwicklung eine Rolle spielen und gegebenenfalls zur Verbesserung der Diagnose und Therapie von bestimmten Krebsarten führen können. Verschiedene moderne biotechnologische Methoden haben sich als besonders nützlich herausgestellt, um ein detailliertes Bild über die molekulare Organisation eines zellulären Systems zu erlangen. Zum Beispiel ermöglicht die DNA-Microarray Technologie die parallele Messung der Expressionslevel aller Gene eines Genoms. Ein zusätzliches Werkzeug ist mit der Entdeckung der RNA-Interferenz (RNAi) entstanden, für die Andrew Fire und Craig Mello 2006 mit dem

Nobelpreis prämiert wurden. RNAi erlaubt es, gezielt und schnell interessante Gene „abzuschalten“, also ihr Expressionsniveau auf ein Minimum zu reduzieren.

Innerhalb der SMP RNA werden diese Technologien kombiniert, um die molekularen Signaltransduktionswege (Pathways), die eine Rolle bei der Brustkrebsentwicklung spielen, zu untersuchen. Innerhalb der SMP Bioinformatik werden Algorithmen und Software entwickelt, um die Analyse und Interpretation solcher Daten zu ermöglichen. So werden beispielsweise Werkzeuge für die statistische Analyse von DNA-Microarray Daten entwickelt und verbessert, die anschließend als Softwarepakete über die open-source Plattform „Bioconductor“ (www.bioconductor.org) zur Verfügung gestellt werden. Weiterhin werden Schulungen für diese Pakete in den Kursen *Practical Microarray Analysis and Good Statistical Practice* im Rah-

men des NGFN angeboten.

Die grundlegende Analyse von Microarray Daten besteht vornehmlich aus Qualitätskontrolle, Analyse differenzieller Genexpression und Klassifikation. Diese grundlegende Analyse soll nun erweitert werden, um ein besseres Verständnis der funktionalen Zusammenhänge und der molekularen Prozesse zu erhalten, die in unseren Experimenten eine Rolle spielen. Dabei ist die Analyse von überrepräsentierten biologischen Funktionen in den aus den primären Analysen resultierenden Genlisten bereits zu einer Routineanwendung geworden, die es erlaubt, biologisch sinnvolle Interpretationen zu erhalten. Weiterhin sind die Signaltransduktionswege nützliche Einheiten, um essenzielle biologische Prozesse in Form von Gensets zu beschreiben. In solchen Signaltransduktionswegen wird ein externer Stimulus innerhalb einer Zelle über Kaskaden von Pro-

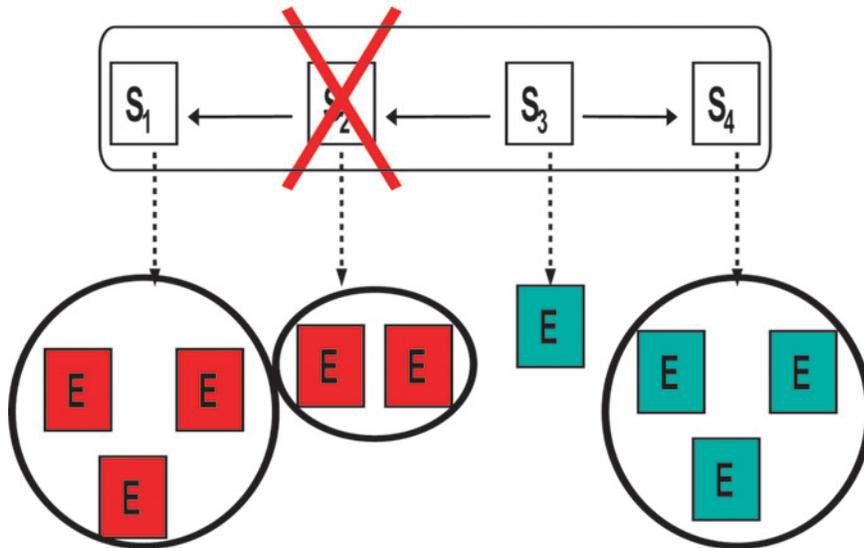


Abb. 1: Schema eines Netzwerkes mit Signalgenen (S) und Messungen der Effekte anhand der Genexpression von Effektgenen (E). Durch das Ausschalten eines bestimmten S-Gens erwartet man Effekte auf alle im Signalfluss darunter gelegenen E-Gene.

tein-Protein-Wechselwirkungen und Phosphorylierungsereignissen übertragen und führt letztendlich zu einer zellulären Antwort, die sich häufig durch eine Änderung des zellulären Programms und der veränderten Expression vieler Gene äußert.

Der Begriff Systembiologie beschreibt den Versuch, Einblicke in die Architektur und das Verhalten komplexer zellulärer und genomischer Prozesse zu gewinnen, anstatt sich in traditioneller Weise nur auf einzelne Gene oder Proteine zu beschränken. Dieser junge Forschungszweig hat in den vergangenen Jahren große Aufmerksamkeit auf sich gezogen, da das Verständnis komplexer zellulärer Zusammenhänge wesentlich ist, um Zielproteine für eine spätere Arzneimittel- und Wirkstoffentwicklung zu identifizieren. Eine wichtige Aufgabe in diesem Zusammenhang ist die Entdeckung von neuen Abhängigkeiten zwischen Genprodukten.

Die Rekonstruktion von Signaltransduktionswegen ist eine schwierige und vermutlich nicht lösbare Aufgabe, wenn man ausschließlich Genexpressionsdaten zur Verfügung hat. Daher muss man zusätzliche Systemkomponenten untersuchen und manipulieren, um den Signalfluss in einer Zelle zu studieren. Das kann dadurch erreicht werden, dass man mithilfe der RNA-Interferenz (RNAi) Komponenten des Signaltransduktionsnetzwerkes gezielt ausschaltet (knock-downs) und diesen Vorgang mit einer Messung der knock-down-Effekte auf die globale Genexpression kombiniert. Markowitz

et al. haben eine statistische Theorie entwickelt, um den Signalfluss zwischen Komponenten eines molekularen Netzwerkes, basierend auf der Messung von sekundären Effekten, zu rekonstruieren. Dieses theoretische Gerüst wurde von NGFN-Wissenschaftlern am DKFZ Heidelberg erweitert. Im Folgenden werden einige Resultate präsentiert.

Nested-Effects-Modelle

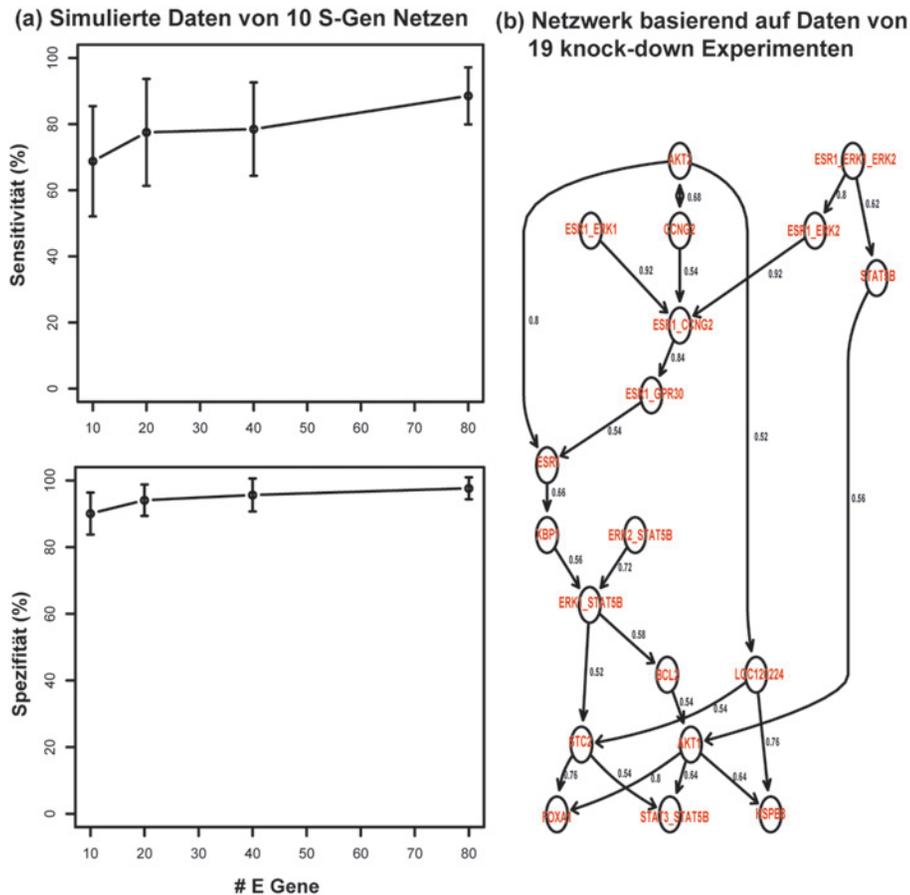
Die Kombination aus gezielten Interventionen mittels der RNAi Technologie und der Messung der Effekte auf die Genexpression mithilfe von DNA-Microarrays erlaubt es Wissenschaftlern, den Signalfluss zwischen Proteinen in einer Zelle zu rekonstruieren. Dadurch lassen sich im Prinzip Abhängigkeiten zwischen Genprodukten auch auf einer nicht-transkriptionellen Ebene beobachten. Für interessant befundene Gene werden herunterreguliert, und die dadurch entstehenden Sekundäreffekte auf die Genexpression werden mithilfe von DNA-Microarrays gemessen. Welche Gene bei welchem knock-down signifikant hoch- oder herunterreguliert werden, erlaubt nun Schlüsse über den Signalverlauf in der Zelle zwischen den herunterregulierten Genen. Dabei spielt insbesondere eine Rolle, in welcher Weise die beobachteten Interventionseffekte „verschachtelt“ sind. Sind z. B. die Effekte aus dem knock-down von Gen A eine Teilmenge der Effekte aus dem knock-down von Gen B, kann man also sagen, dass B im zellulären Signalpfad vor A liegen muss.

Dies funktioniert im Prinzip wie folgt: In einem Signaltransduktionsweg, der mehrere Transkriptionsfaktoren aktiviert, werden durch die Blockierung eines weit „vorne“ in der Signalkaskade liegenden Elementes sämtliche Zielgene der Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Hingegen hat das Ausschalten eines einzelnen, am Ende der Signalkaskade gelegenen Transkriptionsfaktors nur Einfluss auf dessen direkte Zielgene (siehe Abb. 1). Daher erlaubt das Schätzen der Teilmengenverhältnisse in den gemessenen Effekten (daher „nested effects“, verschachtelte Effekte) die Rekonstruktion der Kanten im Signalfluss. Nested-Effects-Modelle sind ein statistisches Gerüst, um verschiedene Netzwerkhypothesen zu bewerten (im Kontext bayesianischer Statistik). Dies funktioniert, indem man die theoretisch erwarteten Effekte aller möglichen Netzwerkhypothesen mit den beobachteten Effekten in den Daten vergleicht. Durch dieses Bewertungsschema kann man sich also auf die wahrscheinlichsten Hypothesen für weitere Experimente fokussieren. Ein Nachteil der ursprünglichen Methode von Markowitz et al. ist allerdings, dass alle möglichen Netzwerkhypothesen aufgezählt und bewertet werden müssen, was nur für kleine Netzwerke mit nicht mehr als fünf Genen machbar ist.

Erweiterungen des Nested-Effects-Modell-Frameworks

Die ursprüngliche Idee wurde um mehrere Aspekte erweitert, und alternative statistische Modellierungsansätze wurden untersucht. Ein wesentlicher Punkt dabei war die Einbeziehung von biologischem Vorwissen in den Algorithmus, da statistische Modelle immer auf Annahmen über die Realität basieren. Je genauer diese Annahmen die Wirklichkeit widerspiegeln, desto eher kann man von dem Nested-Effects-Modell erwarten, dass es „wahre“ Aussagen macht. A priori bekanntes biologisches Wissen über die Netzwerkstruktur, z. B. basierend auf bekannten Proteinwechselwirkungen, können in das Bewertungsschema aufgenommen werden. Es wurden zwei verschiedene Methoden untersucht, um zwischen den a priori Vermutungen und der optimalen Passform der Daten abzuwägen: Erstens ein Modell Auswahlverfahren basierend auf dem Akaike-Informations-Kriterium, zweitens durch geeignete „Prior“ Verteilungen in einem bayesianischen Ansatz.

Durch Entwicklung neuartiger Algorithmen ist man inzwischen theoretisch in der



durchgeführt. Es wurden 15 Gene, von denen in vorhergehenden Experimenten gezeigt wurde, dass diese in Zusammenhang mit dem Östrogenrezeptor-Pathway bei Brustkrebs stehen, mithilfe von RNAi herunterreguliert und der Effekt auf die globale Genexpression wurde mittels Microarrays gemessen. Der Module Networks Ansatz wurde angewendet, um die Nested-Effects-Modelle von einem Netzwerk aus elf Einzel-, sieben Doppel- und einem Dreifach-knock-down zu berechnen. Durch Bootstrap-Analyse zeigte sich, dass die Rekonstruktion statistisch stabil ist (Abb. 2b). Für einige der geschätzten Kanten wurde auch Evidenz in der Literatur gefunden.

Zusammenfassung

In dem modernen Feld der Systembiologie versuchen Wissenschaftler, die Architektur komplexer zellulärer und genomischer Prozesse zu verstehen. Eine wichtige Aufgabe in diesem Kontext ist es, neue Wechselwirkungen zwischen Genprodukten vorherzusagen. Der Ansatz der Nested-Effects-Modelle liefert durch Schätzen von verschachtelten Interventionseffekten Einblicke in zelluläre Signalpfade. Die Kenntnis dieser Signalpfade ist wiederum eine entscheidende Voraussetzung für die spätere Arzneimittel- und Wirkstoffentwicklung. Im Rahmen der SMP Bioinformatik entwickelte statistische Modelle und Algorithmen ermöglichen es, verschachtelte Interventionseffekte in großem Maßstab robust zu schätzen. Dies wird zurzeit insbesondere bei der Aufklärung von Signalwegen in Brustkrebszellen angewendet. Der Source-Code für diese Methoden ist in dem Bioconductor R Paket „nem“ verfügbar.

In Zukunft soll der Nested-Effects-Modell Ansatz noch ausgebaut und auf weitere biomedizinische Datensätze angewendet werden. Dies ist ein wichtiger Schritt in Richtung einer Medizinischen Systembiologie.

Literatur

- Schneider et al. *Int J Cancer* 119:2974-9, 2006
- Beißbarth et al. *Methods Enzymol*, 411:340-52, 2006
- Fröhlich et al. *BMC Bioinformatics*, 8:166, 2007
- Markowitz et al. *Bioinformatics*, 21:4026-32, 2005
- Fröhlich et al. *Proceedings of GCB*, 2007

Kontakt

Dr. Tim Beißbarth
 Deutsches Krebsforschungszentrum
 Molekulare Genomanalyse
 Im Neuenheimer Feld 580, 69120 Heidelberg
 E-Mail: t.beissbarth@dkfz-heidelberg.de

Abb. 2: Evaluierung der Schätzung von Nested-Effects-Modellen. (a) Sensitivität und Spezifität basierend auf simulierten Daten. (b) Geschätzte Nested-Effects-Struktur von Genen im Östrogen-Rezeptor Signalweg bei MCF-7 Zellen basierend auf experimentellen Daten. Die Zahlen von 0-1 spiegeln die Konfidenz der entsprechenden Kanten wider.

Lage, verschachtelte Effektstrukturen mit bis zu 100 beteiligten Genen zu schätzen. Ein neuer Ansatz, den man Module Networks nennt, wurde eingeführt, um den Originalansatz, welcher auf fünf Gene limitiert war, hochzuskalieren. In diesem Ansatz werden die Daten schrittweise (rekursiv) in mehrere kleinere Netzwerke aufgeteilt, die individuell berechnet und später wieder zusammengeführt werden. Es wurden verschiedene heuristische Verfahren, im Bezug auf Sensitivität, Spezifität und Geschwindigkeit verglichen. Realistische Simulationen auf künstlichen Daten wurden ausgeführt, um zu zeigen, dass unser Ansatz gute Resultate liefert (Abb. 2a).

Wie gut ein Modell funktioniert, kann man am besten durch Simulationen herausfinden, in denen man bereits weiß, was das Nested-Effects-Modell idealerweise schätzen sollte. Durch Vergleich der geschätzten mit der tatsächlichen verschachtelten Effektstruktur kann man dann ein Gütemaß errechnen. Dieses

Gütemaß erlaubt zudem, verschiedene Algorithmen miteinander systematisch zu vergleichen und Aussagen darüber zu machen, welche Algorithmen in welchen Fällen die besten Resultate vermuten lassen. Momentan geht man aufgrund von Simulationen davon aus, dass die Nested-Effects-Modelle mit ca. 80-90 % Genauigkeit die wahre Effektstruktur wiederfinden können. Man glaubt daher, dass dieser Ansatz auch nützliche Resultate für biologische Daten liefern kann.

Anwendung auf biologische Daten – Brustkrebs

Wie schon in der Einleitung erwähnt, steht bei uns die genomische Erforschung der Ursachen von Krebs im Vordergrund. Eine wichtige Rolle spielt dabei insbesondere die Untersuchung von Brustkrebs, der einer der meist verbreiteten Krebsarten bei Frauen ist.

Die biologischen Experimente wurden an einer bestimmten Brustkrebs-Zelllinie (MCF-7)

Aufwändige Erforschung komplexer Krankheiten

Die Genetisch-Epidemiologischen Methodenzentren im Nationalen Genomforschungsnetz

Max P. Baur, Heike Bickeböller, Jenny Chang-Claude, Rolf Fimmers, Kari Hemminki, Michael Krawczak, Norbert W. Paul, Klaus Rohde, Helmut Schäfer, Konstantin Strauch, H.-Erich Wichmann, Thomas F. Wienker, Andreas Ziegler

Die Genetische Epidemiologie sucht, ausgehend von der Beobachtung, dass manche Krankheiten in einigen Familien häufiger auftreten als in anderen, nach den genetischen Faktoren, die kausal das Risiko für das Auftreten einer Krankheit bei einer Person verändern. Bei einigen seltenen Krankheiten ist dieses Risiko hundertprozentig bestimmt durch eine einzige Mutation eines Genes. Diese monogenen Krankheiten folgen innerhalb einer Familie einem Mendelschen Erbgang. Bei den im Nationalen Genomforschungsnetz untersuchten, sogenannten genetisch komplexen Krankheiten wird das genetische Krankheitsrisiko durch das Zusammenwirken zahlreicher Einzelfaktoren im Genom in Interaktion mit Umwelteinflüssen (Infekte, Ernährung, Luft, etc.) moduliert. Um eine solche Krankheit wie z. B. Asthma, Depression, Herz-Kreislauf-Erkrankungen oder Diabetes zu erforschen, benötigt es die Zusammenarbeit von klinisch orientierten Wissenschaftlern, Molekulargenetikern und den Methodenwissenschaftlern der Genetischen Epidemiologie.

Wichtigste Voraussetzung: Ausreichend viele Stichproben

Die Grundvoraussetzung für die Erforschung genetischer Risikofaktoren einer Krankheit ist die Rekrutierung einer ausreichend großen Stichprobe von Kranken (und teilweise deren Familienangehörigen) mit einem klar charakterisierten Krankheitszustand. Während bei einigen wenigen Krankheiten die Diagnose selbst für den Laien klar und einfach erscheint, ist in den meisten Fällen die Bestimmung des Phänotyps (Krankheitszustandes) ein komplexer und aufwändiger Vorgang, der mit hunderten zu bestimmender Parameter (Laborwerte, Messwerte, Verlaufsbeobachtungen, etc.) verbunden sein kann, die alle zum Krankheitsbild beitragen und selbst genetischer Steuerung unterliegen können. Da die Erkennung von (genetischen) Risikofaktoren primär durch Vergleich zu nicht-erkrankten Kontrollpersonen (innerhalb einer Familie oder zu nicht-verwandten Personen) beruht, müssen auch diese Kontrollpersonen in gleicher Weise phänotypisch charakteri-

siert werden. Diese Aufgabe kann nur von kompetenten ärztlichen Wissenschaftlern erfüllt werden und wird innerhalb des NGFN von den wissenschaftlichen Gruppen der Krankheitsnetze erbracht.

Wie Stecknadeln im Heuhaufen

Während die Krankheit selbst sich im äußeren Erscheinungsbild, dem Phänotyp, darstellt, sind die genetischen Faktoren, die ursächlich zum Krankheitsrisiko beitragen, durch unterschiedlich vorhandene Ausprägungen [Allele > Glossar] an bestimmten Stellen ihrer DNA-Stränge (Chromosomen) definiert. Diese Variabilität im Genom ist an Millionen von Positionen gegeben und in den meisten Fällen bedeutungslos. Die komplexe Aufgabe besteht darin, die Stecknadel(n) im Heuhaufen – die variablen Positionen – zu finden, die das genetische Risiko für die beforschte Krankheit beeinflussen. Hierfür haben die technischen Möglichkeiten der Genotypisierung (Bestimmung der variablen Ausprägungen eines Menschen an einer bestimmten Position) enorme Fortschritte in den letzten Jahren gemacht. Während es vor zehn Jahren noch aufwändig und teuer war, für eine Stichprobe von einigen hundert Individuen mehrere hundert polymorphe Markersysteme zu typisieren, können heute mit Chiptechnologie in einem an Industrieproduktion erinnernden Verfahren in einem Arbeitsschritt 500 000 bzw. 1 000 000 unterschiedliche Positionen, die in dichter Folge alle Chromosomen eines Menschen abdecken, genotypisiert werden. Allein die Größenordnung der entstehenden Datensätze (für 500 Kranke im Vergleich zu 1 000 Kontrollpersonen – $(500 + 1\,000) \times 1\,000\,000 = 1\,500\,000\,000$ Genotypen) erfordert neue Vorgehensweisen von der Qualitätskontrolle über die Datenlogistik bis zur Datenanalyse.

Unterschiedliche Datenstrukturen für unterschiedliche Fragen

Aus der erkennbaren Größenordnung der oben dargestellten Aufgaben in Phänotypisierung und Genotypisierung ist unmittelbar ersichtlich, dass die Erforschung komplexer Krankheiten auf-

wändig, kompliziert und teuer ist und somit große Bedeutung auf methodische Kompetenz gelegt werden muss. Diese Methoden fangen an bei der Definition des Studiendesigns – für unterschiedliche Fragestellungen werden unterschiedliche Datenstrukturen benötigt. Das können abhängig vom Krankheitstyp große Familien mit mehreren Generationen sein, bei denen kranke und gesunde Individuen in die Untersuchung einbezogen werden müssen. Das können Stichproben von erkrankten Geschwistern sein, bei denen es wünschenswert ist, zusätzlich zumindest eine Blutprobe der beiden Eltern verfügbar zu haben. Es kann auch eine Stichprobe einzelner Kranker sein, deren Eltern unabhängig von ihrem eigenen Krankheitszustand Blut zur Analyse verfügbar machen. Letztlich kann für die Fall-Kontroll-Studie eine große Stichprobe Kranker mit einer großen Stichprobe nicht-verwandter Kontrollpersonen verglichen werden, wobei gerade im letzten Beispiel die Vergleichbarkeit dieser Fälle und Kontrollen von großer Bedeutung ist. Nach der Festlegung des Studiendesigns unterstützt der Genetische Epidemiologe den gesamten Prozess der Rekrutierung, Phänotypisierung und Genotypisierung durch das Festlegen von standardisierten Datenformaten, die Planung und Implementierung der elektronischen Datenbank, die Sicherstellung des Datenschutzes, die Kontrolle der Datenqualität, die Datenlogistik von und zum Genotypisierungszentrum, die Zusammenführung von Phänotypdaten und Genotypdaten, ehe dann letztendlich die statistische Analyse aller Daten mit komplexen statistischen Methoden (Kopplungsanalysen, Assoziationsanalysen, etc.) erfolgt. Abschluss dieser Aufgaben ist dann die gemeinsame Diskussion aller Ergebnisse mit den klinischen und molekulargenetischen Partnern zur inhaltlichen Interpretation der Befunde.

Riesiges Netzwerk geknüpft

Die Systematisch-Methodische Plattform der Genetisch-Epidemiologischen Methodenzentren (GEM) hat innerhalb des NGFN die Aufgabe sämtliche genetisch-epidemiologischen Projekte der Krankheitsnetze methodisch zu unterstützen. An

den acht Standorten Berlin, Bonn, Göttingen, Heidelberg, Kiel, Lübeck, Marburg und München gibt es in Universitäten und Großforschungseinrichtungen Gruppen, die in direkter Kooperation mit den Krankheitsgruppen der Krankheitsnetze des NGFN zusammenarbeiten (eine weitere Gruppe aus Mainz arbeitet auf dem Gebiet der Public Health Genomics und ist der SMP GEM assoziiert). Neben der Zusammenarbeit mit den Krankheitsnetzen interagieren die GEMs unmittelbar mit der Genotypisierungsplattform des NGFN, in der fünf große Zentren in Berlin, Bonn, Kiel, Köln und München zusammengefasst sind. Diese für Deutschland bisher einzigartige Kooperation hat zu einer großen Zahl herausragender wissenschaftlicher Publikationen und zur Entdeckung von Genen geführt, die kausal das Risiko der untersuchten Krankheiten verändern.

Neue Verfahren und Methoden

Neben den kooperativen, krankheitsorientierten Projekten in Zusammenarbeit mit den Krankheitsnetzen betrieben alle Mitglieder der SMP GEM eigene methodische Projekte, deren Ergebnisse allen anderen GEMs verfügbar gemacht wurden.

- **GEM-Bonn** organisierte Ringversuche zur externen Qualitätskontrolle für die Hochdurchsatz-Genotypisierungszentren des NGFN. Typisierungsergebnisse der fünf Zentren an identischer DNA wurden in Bezug auf Fehlerraten und Qualität der Ergebnisse verglichen.
- **GEM-Bonn** erarbeitete einen gemeinsamen verbindlichen Standard für die Projekte, um Datenaustausch und Sicherstellung der Datenqualität zu gewährleisten.
- **GEM-Göttingen** und **GEM-München** erarbeiteten Methoden zur statistischen Analyse von Phänotypen, die sich über die Zeit verändern (Gewicht, Blutdruck, etc.).
- **GEM-Heidelberg** und **GEM-Berlin** entwickelten neue Methoden zur Analyse von Haplotypen (allele Ausprägungen in benachbarten Positionen auf demselben DNA-Strang eines Individuums) in Assoziationsstudien.
- **GEM-Berlin** entwickelte Verfahren zur Analyse von großen Datensätzen aus der Genotypisierung mit DNA-Chips.
- **GEM-Marburg, GEM-Heidelberg** erarbeiteten neue Verfahren zur Analyse von Gen-Umwelt Interaktionen.
- **GEM-München** und **GEM-Kiel** analysierten die Frage möglicher genetischer Heterogenität (Unterschiede zwischen Populationen) auf der Basis der Biobanken KORA-gen und popgen.



Abb. 1: Automatisches System zur Hochdurchsatz-Genotypisierung. Das Bild zeigt den Blick entlang der Roboterschleife, auf der Mikrotiterplatten zu einem Pipettiergerät bewegt werden. Die Mikrotiterplatten haben viele kleine Vertiefungen, die in Reihen angeordnet sind und in denen sich jeweils die zu untersuchenden DNA-Proben befinden.

- **GEM-Lübeck** und **GEM-Göttingen** entwickelten Ausbildungs- und Trainingsmaterialien für Wissenschaftler in Genetischer Epidemiologie.
- **GEM-Kiel** etablierte die Biobank popgen zur populationsbasierten Rekrutierung von Patienten und Kontrollen zur Analyse komplexer Genotyp-Phänotyp Beziehungen.
- **IGTEM-Mainz** etablierte das nationale Ressourcenzentrum für Public Health Genetics.

Eine der weltweit größten Studien zu Volkskrankheiten

Auf der Basis der neu verfügbar gewordenen Technologie zur genomweiten Genotypisierung von 500 000 bzw. 1 000 000 Einzelnukleotid Polymorphismen [SNPs > Glossar] startete das Projektkomitee des NGFN im Oktober 2006 das nationale GWAS-Konsortium [Genome-wide Association Study > Glossar]. 16 600 Kranke und Kontrollen (aus den gut phänotypisierten Stichproben der Krankheitsnetze und den Kontrollpopulationen der Biobanken popgen und KORA-gen) sollten mit Chips der Affymetrix und Illumina Technologie genotypisiert und anschließend im Ansatz einer Assoziationsanalyse verglichen werden. Das ganze Projekt wurde, begleitet von umfassenden Qualitätssicherungsexperimenten, im Frühjahr und Sommer 2007 durchgeführt. Verantwortlich für die gesamte Datenlogistik und Qualitätssicherung ist das GEM-Bonn, die Analysen der einzelnen Krankheiten werden in den

jeweiligen Krankheitsnetzen und ihren Partner-GEMs betrieben, für die krankheitsübergreifenden Gesamtanalysen sind GEM-Bonn sowie GEM-Kiel und GEM-München (die beiden Betreiber der Biobanken) zuständig. Die zentrale Markerdatenbank aller Genotypisierungsergebnisse (ca. 4-5 Terrabyte) wurde im Oktober 2007 fertig gestellt, die Analyse der Daten ist Aufgabe der nächsten Monate.

Die Zusammenarbeit von klinischen Wissenschaftlern, Molekulargenetikern und Genetischen Epidemiologen ist unabdingbar für die erfolgreiche Erforschung genetischer Risikofaktoren häufig auftretender, genetisch komplexer Krankheiten. Die Zusammenarbeit der GEMs mit den Krankheitsnetzen und der Genotypisierungsplattform im NGFN ist ein extrem erfolgreiches Modell kooperativer Forschung. Die Erfolge gerade der letzten Monate beweisen, dass dieses Forschungsparadigma einen wichtigen Beitrag zur Erforschung komplexer Krankheiten liefert und dass Deutschland auf diesem international extrem kompetitiven Forschungsfeld wettbewerbsfähig bleiben kann, falls der eingeschlagene Weg weiter begangen und gefördert wird.

Kontakt

Prof. Dr. Max P. Baur
 Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie, Universität Bonn
 Sigmund-Freud-Straße 25, 53105 Bonn
 E-Mail: max.baur@ukb.uni-bonn.de

Die Einheit für Service und Ressourcen als Serviceanbieter

Die besondere Stellung der SMP Zentrale Einheit für Service und Ressourcen als Infrastruktur

Johannes Maurer

Die SMP Zentrale Einheit für Service und Ressourcen ist im Gegensatz zu den anderen im NGFN geförderten Projekten kein Verbundprojekt, sondern wurde einzig vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung (RZPD) durchgeführt. Als echter Serviceanbieter für die anderen SMPs, KGs und EPs lag der Fokus dabei eher auf der Herstellung von biologischen Ressourcen und der Technologieentwicklung als auf der Generierung wissenschaftlicher Daten. Die SMP bestand aus zwei Infrastruktur-Projekten (Ressourcenarchivierung und Bioinformatik) und drei Projekten zur Ressourcen- bzw. Technologieentwicklung (Expression Profiling Facility, ORF-Klonierung, Entwicklung von Protein-Chips). Um seiner Rolle als Serviceanbieter entsprechend nachkommen zu können, befand sich das RZPD im ständigen Austausch mit allen Mitgliedern des NGFN, damit der Bedarf der Arbeitsgruppen aufgenommen und jede Möglichkeit zur gemeinsamen Produkt- und Technologieentwicklung ausgeschöpft werden konnte.

Für das NGFN wurden genomweite Ressourcen für Hochdurchsatzmethoden der SMPs ebenso angeboten wie vollständig annotierte [[> Glossar](#)] individuelle Klonressourcen für die krankheitsbasierten Anwendungen der krankheitsorientierten Genomnetze. Dabei wurde jedoch nur ein kleiner Teil des vom RZPD angebotenen Portfolios über eine Förderung des BMBF unterstützt. Daher wurden die meisten der vom RZPD angebotenen Ressourcen und Serviceleistungen für NGFN-Wissenschaftler zu einem 30-prozentigen Preisnachlass angeboten. Das RZPD hat zum 31.07.2007 seinen operativen Betrieb eingestellt. Wesentliche Teile seiner Dienstleistung werden jedoch von zwei Ausgründungen, der ImaGenes GmbH und der Atlas Biolabs GmbH weitergeführt.

Investitionen zur Nutzung für alle Forscher

Die Zentralisierung bestimmter Infrastrukturfunktionen bietet im gesamten Bereich der

molekularen Lebenswissenschaften signifikante Vorteile für Wissenschaftler und Förderer:

- Wissenschaftler haben mehr Zeit, sich auf ihre eigentliche kreative Arbeit zu konzentrieren, anstatt Zeit für die Erstellung von Materialien oder die Etablierung von Technologien aufzubringen.
- Innovative Technologien und Ressourcen sind allen Forschern zugänglich, unabhängig von Grundausstattung, Vorarbeiten oder Kollaborationen, und müssen daher nicht mehrfach etabliert werden. Dies bedeutet insbesondere für den Förderer eine optimale Nutzung der limitierten vorhandenen Gelder.
- Die Verfügbarkeit von Ressourcen, die alle Gene eines Organismus repräsentieren sowie entsprechende Hochdurchsatzmethoden für die Analyse der Funktionen aller Gene sind Grundvoraussetzung zum ganzheitlichen Verständnis eines Organismus als System sowie für die innerhalb dieses Systems auftretenden Krankheitsprozesse.
- Ein strenges Qualitätsmanagementsystem nach Industriestandard, sowohl für eigene als auch für importierte Ressourcen, garantiert eine hohe Reproduzierbarkeit der erzielten wissenschaftlichen Ergebnisse sowie eine sichere Archivierung und nachhaltige Nutzung der mit öffentlichen Geldern erzeugten Materialien.
- Das RZPD sicherte allen Nutzern ohne weitere Bedingungen die vollen wissenschaftlichen und kommerziellen Verwertungsrechte für einen erfolgreichen und unbürokratischen Technologietransfer.
- Bisher getätigte Investitionen in die Datenbank, deren Vernetzung und in eine entsprechende Technologieplattform kommen der wissenschaftlichen Gemeinschaft nachhaltig zugute.
- Hergestellte Bezüge zwischen Ressourcen und Genen erleichtern die Datenintegration und erhöhen dadurch die internationale Sichtbarkeit der erzielten Forschungsergebnisse.

- Die geschaffene Struktur ist von der grundlagenorientierten Genomforschung über angewandte klinische Forschung bis hin zur Integration und Modellierung in der Systembiologie universell einsetzbar und unterstützt somit neue Schwerpunktthemen in der biomedizinischen Forschung.

Vom Forschungsprojekt zur Firma

Das RZPD Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung wurde 1995 als Service- und Referenzzentrum im Rahmen des Deutschen Humangenomprojekts (DHGP) eingerichtet, um den vergleichsweise späten Eintritt Deutschlands in die internationale Genomforschungsinitiative durch eine koordinierte und arbeitsteilige Vorgehensweise zu kompensieren.

Bei seiner Gründung wurde das RZPD zunächst als Drittmittelprojekt des Max-Planck-Instituts für molekulare Genetik und des Deutschen Krebsforschungszentrums geführt. Im Jahr 2000 wurde als erster Schritt zur langfristigen Etablierung die Gründung einer gemeinnützigen GmbH mit Beteiligung der Max-Planck-Gesellschaft, des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) und des Max-Delbrück-Centrums (MDC) durchgeführt. Dieser Schritt ermöglichte die Etablierung einer unabhängigen Geschäftsführung sowie einer Struktur mit ausreichender Flexibilität zum Aufbau extensiver Firmenkollaborationen und eines eigenen Vertriebssystems. Bereits zu Beginn der GmbH-Phase wurden die Kostenstrukturen des gesamten RZPD-Portfolios analysiert und ein Controlling der einzelnen Bereiche eingeführt. Seit ihrer Gründung Mitte 2000 konnte die RZPD GmbH ihre Umsatzerlöse fast jedes Jahr zwischen 20 und 50 % steigern. Die RZPD GmbH generierte ca. 50 % ihrer Umsatzerlöse in Deutschland und hatte parallel dazu einen internationalen Kundenstamm erschlossen.

Das RZPD hat zwei Förderperioden des Deutschen Humangenomprojektes, das Deut-

sche Pflanzengenomprojekt GABI, das Deutsche Nutztiergenomprojekt FUGATO sowie das NGFN-1 erfolgreich begleitet und bildete seit 2004 die Systematisch-Methodische Plattform Zentrale Einheit für Service und Ressourcen innerhalb des NGFN-2.

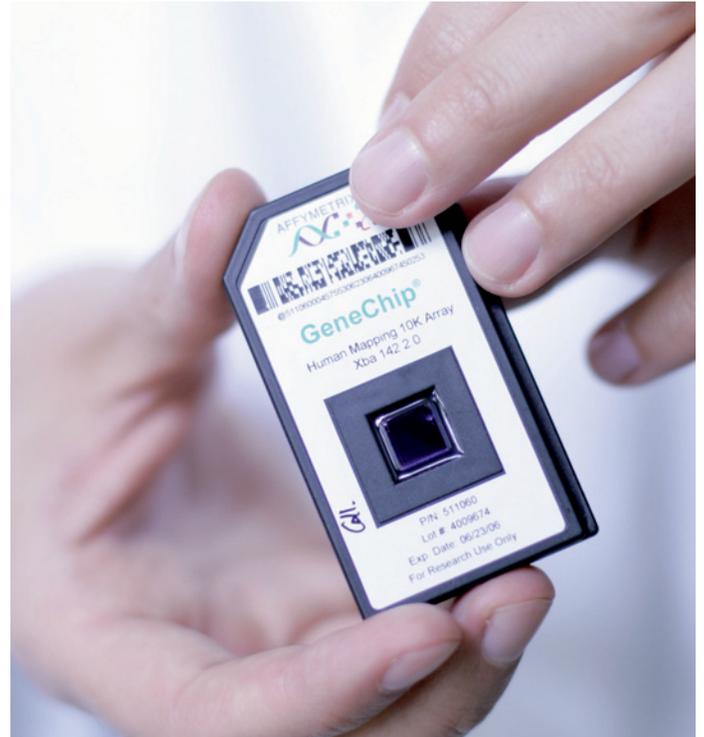
Jeweils mehr als 20 akademische und industrielle Kooperationsvereinbarungen unterstreichen die Attraktivität des kontinuierlich für die gesamten molekularen Lebenswissenschaften aktualisierten Portfolios sowie die internationale Akzeptanz und das erfolgreiche Branding des RZPD. Zu diesem Zweck wurden am RZPD permanent neue Produkte und Dienstleistungen entwickelt, die sich an den aktuellen Anforderungen der Genomforschung, der Proteomics und der Systembiologie orientieren (z. B.: genomweite Proteinarrays, Hochdurchsatzscreening von Protein-Protein-Wechselwirkungen, Analyse von „Chip on chip“-Daten, Integration experimenteller Ergebnisse in weltweit standardmäßig benutzter Genombrowser), während Bereiche, die keine ausreichende Relevanz mehr für die entsprechenden Forschungsfelder hatten, eingestellt wurden.

Ein intuitiver Webshop (www.rzpd.de) macht alle Materialien des RZPD über wissenschaftliche Suchkriterien einfach zugänglich und bestellbar und bietet überdies eine direkte Verbindung zu internationalen Genom- und Krankheitsdatenbanken. So werden auf einzigartige Weise validierte Materialien, Grundlagendaten und klinisches Wissen integriert. Diese über Jahre aufgebaute Technologie-, Biobank- und Datenintegrationsplattform dient somit als grundlegende Infrastruktur für die gesamten molekularen Lebenswissenschaften, von der Genomforschung bis zur Systembiologie.

International wegweisende Qualitätsstandards

Im Jahr 2003 war das RZPD das erste Servicezentrum für die Genomforschung weltweit, das nach ISO 9001:2000 Qualitätsstandards zertifiziert wurde. Dies qualifizierte das RZPD als Zulieferer und Kooperationspartner für die pharmazeutische Industrie. Seine Expertise im Qualitätsmanagement von Logistik, Datenintegration und Microarrayanalytik brachte das RZPD auch maßgeblich in die innerhalb des NGFN etablierten Qualitätsmanagement-Arbeitsgemeinschaften ein und förderte so Vergleichbarkeit und Austausch von Daten, Nachhaltigkeit der Ressourcen und internationale Sichtbarkeit der Ergebnisse des Gesamtprojektes.

Abb. 1: Ein DNA-Chip ermöglicht die gleichzeitige Analyse einer großen Anzahl von Genen. So kann schnell und effektiv untersucht werden, welche Gene in welchen Geweben oder zu welchem Zeitpunkt abgelesen werden.



Die Vorteile einer solchen Struktur sind inzwischen auch andernorts erkannt worden. Als Konsequenz sind in vielen Ländern bereits ähnliche Zentren aufgebaut worden oder werden gerade etabliert (Frankreich, Kanada, Singapur, Taiwan, siehe dazu auch „OECD-Report on Biological Resource Centers“).

Integration in die internationale Wissenschaft

Das RZPD war an einer Vielzahl erfolgreicher EU-Projekte beteiligt, in denen es regelmäßig über eigene Forschungs- und Entwicklungsarbeiten hinaus strukturelle oder strukturgebende Aufgaben übernahm (bspw. BASMAP, DESPRAD, EUCOMM, EUREXPRESS, INTEGR8, Pancreatic Cancer, Proteome Binders). Mittels zahlreicher Kontakte ins europäische Ausland wurden als Vorbereitung für FP7 bereits gemeinsame Konzepte erarbeitet, in denen die Notwendigkeit koordinierter Strukturen für die nachhaltige Stärkung des Europäischen Forschungsraums herausgearbeitet wurden. Mit den nationalen Vertretern im „European Strategy Forum on Research Infrastructures“ (ESFRI) wurden Konzepte erarbeitet, um die für Deutschland durch die bereits etablierten Strukturen entstehenden Vorteile entsprechend im europäischen Umfeld zur Geltung zu bringen. Als Ergebnis war das RZPD an der Initiierung der „Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure“ beteiligt.

Das Projekt „Central Infrastructure for Molecular Pathology (CRIP)“, ist eine virtuelle Biodatenbank, die in Deutschland vorhandene Gewebeproben in standardisierter Weise für akademische und industrielle pharmazeutische Forschung und Entwicklung zugänglich macht. Das Projekt bezog von Beginn an deutsche und österreichische Partner ein und bereitete somit eine engere europäische Verzahnung und Standardisierung für eine weitere internationale Anknüpfung vor.

Das RZPD pflegte bereits seit langem einen intensiven Kontakt und Datenaustausch mit dem European Bioinformatics Institute (EBI) und kooperierte mit allen weiteren internationalen Zentren, die eine Infrastrukturfunktion in den molekularen Lebenswissenschaften übernehmen. Gemeinsame Projekte zu Forschung, Material- und Datenaustausch sowie zur Wissensintegration als Basis für die Systembiologie bestanden mit dem Broad-Institute, dem Los Alamos und Lawrence Livermore National Laboratory, dem National Cancer Institute (Mammalian Gene Collection) und dem japanischen RIKEN.

Kontakt

Dr. Johannes Maurer
 RZPD Deutsches Ressourcenzentrum
 für Genomforschung GmbH, Berlin
 Derzeitige Adresse: ImaGenes GmbH, Berlin
 E-Mail: j.maurer@rzpd.de

Explorative Projekte (EP)

Neue Ansätze für neue Methoden

Explorative Projekte im NGFN

Chris Turck

Die Entwicklung neuer Technologien ist eine wichtige Komponente des wissenschaftlichen Fortschrittes und insbesondere im Bereich der humanen Genomforschung von großer Bedeutung. In der zweiten Phase des Nationalen Genomforschungsnetzes wurde deshalb das Programm der Explorativen Projekte (EP) etabliert, um Forschungsprojekte zu fördern, in denen innovative Ideen zur Entwicklung neuer Methoden und Technologien bearbeitet werden, die in die existierenden und etablierten NGFN Netzwerke und Plattformen integriert werden können.

Die neunzehn EPs können in zwei sich überschneidende Kategorien eingeteilt werden. Eine Gruppe von Projekten konzentriert sich auf die Verbesserung von wissenschaftlichen Methoden. Hierbei handelt es sich entweder um die Weiterentwicklungen bereits existierender Technologien oder aber um vollständi-

gig neue Ansätze. Dazu gehören unter anderem RNAi-Technologien, zelluläre Nachweisverfahren, Peptid- und Protein-Chips, Technologien zur Untersuchung der Genexpression, Massenspektrometrie, Bioinformatik und Tiermodelle.

Der andere Teil der Projekte befasst sich mit neuen Wegen der Entdeckung von Biomarkern.

Biomarker für die Diagnose

Biomarker sind Substanzen im Organismus, die für die Verbesserung von Diagnoseverfahren oder als Indikatoren für Umwelteinflüsse und bestimmte biologische Prozesse eingesetzt werden können. In den Explorativen Projekten des NGFN wollen die Wissenschaftler neue Biomarker für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, AIDS, Magen-Darm-Erkrankungen, Krebs, affektive Störungen und Langlebigkeit des Menschen identifizieren. Diese Studien sind

somit für die fünf Krankheitsorientierten Genomnetze des NGFNs relevant.

Im Folgenden werden zwei ausgewählte EPs vorgestellt, um dem Leser einen Eindruck dieses Fördermechanismus zu vermitteln.

Gene humaner Stammzellen aufgespürt

Körpereigene Stammzellen gewährleisten zeitlebens die Regeneration unserer Gewebe. Diese sogenannten adulten Stammzellen zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, sich einerseits selbst zu erneuern, um den Stammzellpool zu erhalten, und andererseits in verschiedene gewebsspezifische Zellen zu differenzieren. Die molekularbiologischen Mechanismen, welche diese duale Funktion ermöglichen, sind jedoch noch weitgehend undefiniert. Im Rahmen eines EPs werden von Wolfgang Wagner und Anthony Ho an der Medizinischen Klinik V der Universität Heidelberg die molekularen Eigenschaften von Mesenchymalen Stammzellen als Vorläufer von Knochen-, Knorpel- und Fettgewebe sowie von Blutstammzellen, den sogenannten Hämatopoetischen Stammzellen, untersucht.

Gen-Chips für mehr Profil

Mithilfe von Gen-Chips wurden Genexpressionsprofile erstellt. Solche Profile zeigen an, welche Gene in den Stammzellen aktiv sind und welche nicht. Durch einen Vergleich der Genexpressionsprofile konnten dabei Muster von Genen entdeckt werden, die insbesondere in Mesenchymalen Stammzellen und Hämatopoetischen Stammzellen abgelesen (exprimiert) werden. Zusätzlich wurde auch die Proteinzusammensetzung der Mesenchymalen Stammzellen untersucht. Selbsterneuerung und Differenzierung scheinen jedoch nicht nur auf zell-eigenen Charakteristika zu beruhen, sondern vielmehr – den physiologischen Erfordernissen entsprechend – durch die zelluläre Umgebung



Abb. 1: Phasenkontrastaufnahme von CD34+ hematopoetischen Progenitorzellen auf humanen MSC.

kontrolliert zu werden. Die Studien haben dabei deutlich gezeigt, dass eine direkte Wechselwirkung von Blutstammzellen mit benachbarten Zellen durch verschiedene spezifische Zellverbindungsproteine bewerkstelligt wird. Die Arbeiten stellen somit eine Grundlage dar, um die Regulationsmechanismen von körpereigenen Stammzellen besser zu verstehen. Dies ist sowohl für die Blutstammzelltransplantation als auch für die Stammzellforschung von fundamentaler Bedeutung.

Mehr Information aus wenigen Genen

Das Humangenomprojekt hat in den letzten Jahren eindrucksvoll gezeigt, dass die relativ geringe Zahl von ca. 30 000 Genen für die sehr komplexe und gewebespezifische Proteinausstattung (Proteom) einer Zelle bzw. des ganzen Organismus ausreicht. So liegt überraschenderweise die Zahl der Gene des vergleichsweise einfach aufgebauten Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* mit ca. 19 000 Genen in einer Größenordnung, die der des Menschen durchaus vergleichbar ist.

Zur Erklärung dieses Phänomens und damit der Komplexität des Systems Mensch spielt das RNA-Spleißen (engl. splice = miteinander verbinden) eine wichtige Rolle: Die Proteinbauleitung der Gene liegt meist gestückelt vor. Zwischen Bereichen mit wichtiger Information für die Herstellung eines Proteins (Exons) liegen immer wieder Abschnitte ohne Bauinformation, deren Funktion noch weitgehend unbekannt ist (Introns). Um eine funktionsfähige mRNA für die Proteinsynthese bereitzustellen, wird zunächst eine durchgängige Kopie – ein sogenanntes Primärtranskript – des gesamten Gens erstellt. Aus dieser Kopie werden dann alle Bereiche ohne Information herausgeschnitten. Dieser Mechanismus wird in der Fachsprache als Spleißen bezeichnet. Dadurch werden die proteinkodierenden Exons präzise miteinander verknüpft und die dazwischenliegenden, nichtkodierenden Intron-Bereiche herausgeschnitten.

Gesteuerte „Genschere“

Als Schneidewerkzeug dient das sogenannte Spleißosom, eine Maschinerie aus über 100 Proteinen und fünf kleinen RNAs, die im Zellkern von eukaryotischen Zellen lokalisiert ist.

Diese Spleißmaschinerie wird durch Spleißregulatoren gesteuert. Beim Menschen gibt es mindestens 50 Spleißregulatoren, die für jeweils ein Gen oder eine Genklasse spezi-

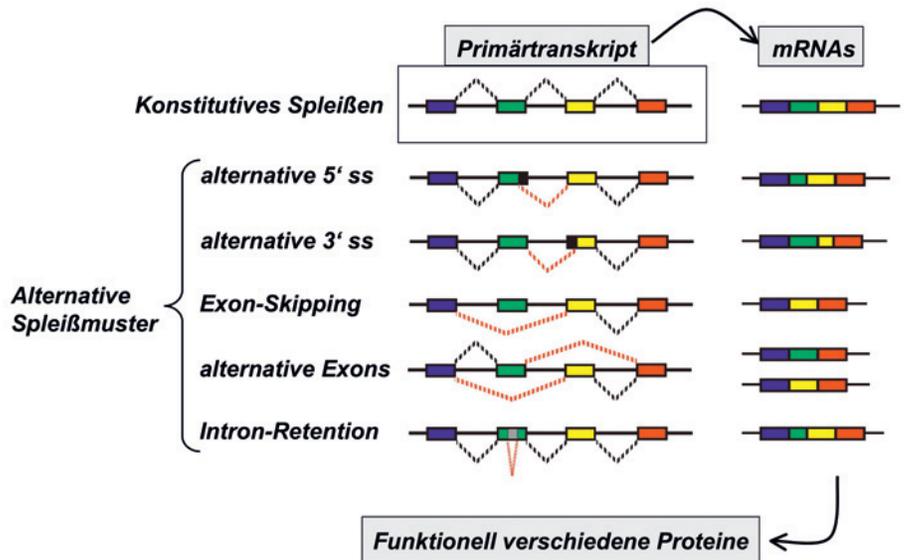


Abb. 2: Alternatives mRNA-Spleißen: Wie aus einem Gen und einem Primärtranskript durch unterschiedliche Spleißmuster mehrere mRNA-Spleißvarianten und entsprechend funktionell verschiedene Proteine entstehen.

fisch sind. Spleißregulatoren bestimmen die Effizienz oder die Benutzung bestimmter Spleißstellen (alternatives Spleißen), indem sie an Erkennungssequenzen in Introns oder Exons binden und über Wechselwirkungen mit der generellen Spleißmaschinerie diese positiv bzw. negativ regulieren. Auf diese Weise steuern die Spleißregulatoren, dass das mRNA-Molekül auf eine ganz bestimmte Weise zu recht geschnitten wird.

Alternatives Spleißen

Alternatives mRNA-Spleißen ist in menschlichen Zellen weit verbreitet und unerlässlich für die Funktion von weit mehr als der Hälfte aller humanen proteinkodierenden Gene, wie neuere Bioinformatikansätze zeigten. Durch die alternative Wahl von Spleißstellen und das Überspringen von Exons können aus einem Primärtranskript (und damit einem Ursprungsgen) verschiedene mRNAs (Spleißvarianten) entstehen, die letztendlich zu funktionell unterschiedlichen Proteinen führen.

Viele alternative Spleißprozesse sind inzwischen gut charakterisiert: Ein klassisches Beispiel ist das menschliche Calcitonin-Gen, aus dem nicht nur das Peptidhormon Calcitonin entsteht, das spezifisch in der Nebenschilddrüse vorkommt, sondern auch der Botenstoff CGRP in Nervenzellen. Fehlerhaftes alternatives Spleißen, zum Beispiel durch Mutationen verursacht, führt häufig zu Krankheiten, wie zum Beispiel der Spinalen Muskelatrophie. Und nicht zuletzt unterscheiden sich Tumorgewebe von gesundem Gewebe oft auch in ihren alter-

nativen Spleißmustern, sodass sich hier neue Möglichkeiten für die Diagnose abzeichnen.

Aus diesen Gründen werden in einem von Prof. Albrecht Bindereif an der Justus-Liebig-Universität Gießen geleiteten Explorativen Projekt systematische genomweite Ansätze entwickelt, um die Spleißmuster aller humanen Gene zu erfassen. Das Team um Prof. Bindereif verwendet hierfür spezielle Gen-Chips, sogenannte Exonarrays, mit denen alle bekannten Exons im Humangenom detektiert werden können. Die NGFN-Forscher erhalten also nicht nur Informationen über die Expression aller Gene in einem Experiment, sondern auch darüber, wie alternative Spleißmuster in verschiedenen Zelltypen und Geweben des Menschen variieren und wie sich die Spleißmuster während der Entwicklung und insbesondere bei Krankheitszuständen verändern. Um dieses Experiment zu etablieren, konzentrierte sich die Arbeitsgruppe zunächst auf ein Modellsystem: Sie verwendete kultivierte menschliche Zellen (HeLa-Zellen), bei denen das Protein hnRNP L, welches als globaler Spleißregulator von vielen humanen Genen wirkt, ausgeschaltet wurde. Es gelang, eine Vielzahl von Veränderungen in einzelnen Spleißmustern mithilfe der Exonarrays nachzuweisen und diese auch experimentell zu bestätigen. In Zukunft sollen weitere Gen-Chips getestet werden, und vor allem soll dieser neu etablierte Ansatz auf Fragestellungen aus der Molekularen Medizin angewandt werden.

Literatur

- Ho, AD. and Wagner, W. *The beauty of asymmetry-asymmetric divisions and self-renewal in the hematopoietic system. Current Opinion in Hematology.* 2007;14:330-336.
- Wagner, W. et al. *Molecular evidence for stem cell function of the slow-dividing fraction among human hematopoietic progenitor cells by genome-wide analysis. Blood.* 2004;104:675-686.

- Wagner, W. et al. *The heterogeneity of human mesenchymal stem cell preparations-Evidence from simultaneous analysis of proteomes and transcriptomes. Exp Hematol.* 2006;34:536-548.
- Brow, DA. *Allosteric cascade of spliceosome activation. Annu Rev Genet.* 2002;36:333-360.
- Hui, J. et al. *HnRNP L stimulates splicing of the eNOS gene by binding to variable-length CA repeats. Nat. Struct. Biol.* 2003;10:33-37.

Kontakt

Prof. Dr. Chris Turck
 Max Planck Institut für Psychiatrie
 Proteomics and Biomarkers
 Kraepelinstraße 2, 80804 München
 E-Mail: turck@mpipsykl.mpg.de

Akteure und Aktivitäten im NGFN

Das Lenkungsgremium und die Evaluation des Nationalen Genomforschungsnetzes

Im NGFN konnten etwa 350 verschiedene Arbeitsgruppen gefördert werden, aus denen die krankheitsorientierten Genomnetze, Systematisch-Methodischen Plattformen und Explorativen Projekte zusammengesetzt sind. Eine solch große Zahl an Forschungsgruppen und Projekten bedarf der Steuerung und Koordination.

Das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) hat daher für das NGFN eine Steuerungsstruktur mit einer internen und einer externen Ebene etabliert. Dem Projektkomitee oblag die interne Selbststeuerung, in der es von einem Projektmanagement unterstützt wurde. Die externe Aufsicht über die inhaltliche Ausrichtung und die wissenschaftliche Strategie des NGFN jedoch wurden maßgeblich von den Mitgliedern des NGFN-Lenkungsgremiums gestaltet. Es hatte die Funktion eines unabhängigen, externen Beraterkreises.

Dem Lenkungsgremium gehörten acht Persönlichkeiten aus der akademischen und industriellen Forschung an, die alle ehrenamtlich tätig waren. Als wesentliche Grundlage für die Entscheidungen des Förderers formulierte das Lenkungsgremium Empfehlungen über Prioritäten und Inhalte von Forschungsthemen, über die Einführung neuer Technologien in das NGFN und die dazu erforderliche Bereitstellung

von Ressourcen. Einzelne Mitglieder des Lenkungsgremiums engagierten sich zusätzlich in fachlichen Begutachtungen von NGFN-Anträgen und begleiteten intensiv die Arbeit des Projektkomitees und verschiedener von ihm gebildeter Arbeitsgruppen. Von besonderer Bedeutung war auch die Zuständigkeit des Lenkungsgremiums für die Evaluation des Gesamtprogramms.

Hat sich die Förderung gelohnt?

Seit 2001 hat das BMBF für das NGFN knapp 400 Mio. Euro aufgewendet. Nach einer ersten und sehr positiven internationalen Evaluation des Programms Ende 2002 / Anfang 2003 war das BMBF bereit, im Zeitraum 2004 bis 2007 eine zweite Förderphase zu finanzieren. Auch diese zweite Phase wurde einer externen Evaluation unterzogen. Im Mittelpunkt der Evaluationen standen folgende Fragen: Hat sich die inhaltliche Ausrichtung des NGFN als richtig erwiesen? Inwieweit wurden im NGFN international wettbewerbsfähige Forschungsarbeiten zur Förderung gebracht? Konnte eine wissenschaftlich produktive und synergieauslösende Vernetzung von Forschungsgruppen angestoßen werden? Sind die aufgebauten Strukturen innerhalb des NGFN

sinnvoll und zielführend? Gab es einen effizienten Informationsaustausch sowie ein gutes Qualitäts- und Kapazitätsmanagement? Die Evaluationen nahm das NGFN-Lenkungsgremium vor, das hierfür durch weitere internationale Experten erweitert und ergänzt wurde.

Im Rahmen der ersten Evaluation Ende 2002 erläuterten die Wissenschaftler des NGFN dem internationalen Gutachtergremium in mehrtägigen Präsentationen, wie sich ihr jeweiliger NGFN-Forschungsbereich entwickelt hat und wie sich die Projekte in das Gesamtkonzept des NGFN einfügen. Umfassende schriftliche Evaluationsunterlagen lieferten dem Evaluationskreis zusätzliche Grundlagen für die Bewertung. Als Ergebnis dieser ersten Evaluation erarbeitete das Lenkungsgremium im Frühsommer 2003 ein Thesenpapier, das dem BMBF übermittelt wurde. Darin bewertete das Lenkungsgremium das NGFN als international einzigartige, sehr erfolgreiche und wegweisende Forschungsinitiative. Auch die inhaltliche Ausrichtung des NGFN auf die fünf wichtigsten Krankheitsgebiete hätte sich als richtig und erfolgreich herausgestellt. Das NGFN sei für die Innovations- und Wettbewerbsfähigkeit Deutschlands auf dem Gebiet der Krankheitsbekämpfung „von größter Bedeutung“.

NGFN weltweit einmalig

Die daraufhin vom BMBF gestartete zweite Förderphase wurde im Jahr 2006 einer weiteren Evaluation unterzogen. Das Lenkungsgremium beschloss, in dieser zweiten Evaluation über die wissenschaftlichen Inhalte hinaus vor allem die Verbund- und Steuerungsstrukturen des NGFN in den Blick zu nehmen. Die Basis der Evaluation bildeten schriftliche Evaluationsberichte aller Forschungsverbände, zu denen jeweils schriftliche Stellungnahmen von externen Experten eingeholt worden waren. Auch das Projektkomitee, das Projektmanagement und die Koordinierungsstelle Technologietransfer (KTT) präsentierten Tätigkeitsbe-

richte und formulierten aus der jeweils spezifischen Perspektive Schlussfolgerungen und Anregungen. Im Ergebnis dieser zweiten Evaluation kam das Lenkungsgremium zu der Überzeugung, dass die Erfolge aus der ersten Förderphase des NGFN in der zweiten Förderphase ausgebaut werden konnten. Das NGFN-Konzept der engen Vernetzung von systematischer Genomforschung und krankheitsorientierten Forschungsansätzen habe sich bewährt. Es sei weltweit in seiner konsequenten Umsetzung nach wie vor einmalig und trage erheblich zur Stärkung der deutschen biomedizinischen Genomforschung im internationalen Wettbewerb bei. Der Einfluss der Forschungsergebnis-

se auf das Verständnis und daraus ableitbare Ansätze zu einer verbesserten Bekämpfung von Volkskrankheiten wurde als bedeutend angesehen. Das Lenkungsgremium formulierte eine Reihe von Empfehlungen, die vor allem die Verbesserung der Verbundstrukturen, die stärkere thematische Fokussierung und Vernetzung der Forschungsgruppen und die Intensivierung der Koordination zum Gegenstand hatten, und riet die Förderung des NGFN fortzusetzen mit dem Ziel, die Erfolg versprechende Zusammenarbeit von Grundlagenforschern und Klinikern durch eine stärkere Beteiligung von Industrieunternehmen zu ergänzen.

Das Projektkomitee des NGFN

Die interne Selbststeuerung des NGFN erfolgt durch das Projektkomitee (PK). Als internes Gremium ist seine Funktion der eines Vorstandes vergleichbar. Die Zusammensetzung des Projektkomitees spiegelt die Struktur des NGFN wider. Das derzeitige PK besteht aus 13 Mitgliedern und 13 Stellvertretern, jeweils sechs Vertretern der Systematisch-Methodischen Plattformen und der krankheitsorientierten Genomnetze sowie einem Mitglied der Explorativen Projekte. Sie repräsentieren gleichberechtigt die verschiedenen wissenschaftlichen Bereiche des NGFN. Auf eine ausgewogene Repräsentation einzelner Institutionen wurde geachtet.

Aufgaben des Projektkomitees

Schon im frühen Aufbaustadium des NGFN hat das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) ein internes Steuerungsgremium etabliert, das umfassende Aufgaben hinsichtlich Koordination und Steuerung in dieser Fördermaßnahme übernahm. Zu den Hauptaufgaben des Projektkomitees gehören: die wissenschaftliche Koordination im NGFN, die interne Überprüfung des Verlaufes der wissenschaftlichen Projekte und die Koordination der Öffentlichkeitsarbeit. Im Rahmen der Fördermaßnahmen und mit Berücksichtigung der Empfehlungen des Lenkungsgremiums, ent-

scheidet das PK über wissenschaftliche Inhalte und Ressourcen. Die Entscheidungen sind für alle Gruppen im NGFN bindend.

Das PK kann eine Umverteilung von vorhandenen Fördermitteln zu spezifischen Projekten initiieren, was die Integration neuer Projekte oder eine Modifikation einzelner Projekte erlaubt, um das Gesamtnetz zu optimieren. Das PK wird dadurch im Hinblick auf die Inhalte der Forschungsarbeiten und der hierfür verwendeten Forschungsmittel steuernd tätig.

Um diese koordinierenden und steuernden Aufgaben auszuführen, trifft sich das PK regelmäßig jeden zweiten Monat.

Das Projektkomitee ist maßgeblich daran beteiligt, dass sich das NGFN zu einem wissenschaftlich integrierten Netzwerk entwickelt hat. Besonders während des Überganges von der ersten zur zweiten Förderperiode konnte die Bedeutung des Projektkomitees unter Beweis gestellt werden.

Interaktionen mit anderen NGFN Elementen

Als internes Steuerungsgremium des NGFN ist das PK das Zentrum der Organisationsstruktur und hat engen Kontakt zu allen Netzwerkelementen. Es besteht ebenfalls eine enge Interaktion zum Lenkungsgremium. Die Zusammenarbeit von PK und LK dient der konstruktiven Diskussion des wissenschaftlichen

Gesamtfokus und der grundsätzlichen Ausrichtung des NGFN. Das PK hält zudem eine enge Kooperation und Kommunikation zum Projektmanagement, das das PK sehr effektiv und verlässlich in seinen Aufgaben unterstützt.

Die Interaktion des PK mit den wissenschaftlichen NGFN Elementen erfolgt durch die Präsentationen einzelner Teilbereiche mit anschließenden Empfehlungen für diesen Bereich. Die direkten Interaktionen und Interessensvertretung erfolgen durch die jeweils verantwortlichen PK Mitglieder für die Plattformen, krankheitsorientierten Netze oder Explorativen Projekte des NGFN. Die Entscheidungen des PK auf den Sitzungen werden im NGFN Intranet veröffentlicht und so für alle Partner transparent gemacht.

Mit der Teilnahme eines Vertreters der Koordinierungsstelle Technologietransfer (KTT) als Gast an den PK-Sitzungen ist ein regelmäßiger Informationsaustausch zwischen PK und KTT gesichert.

Das Projektkomitee trägt durch seine enge Zusammenarbeit mit dem Lenkungsgremium und dem Projektmanagement zweifelslos zu einer Sicherstellung der wissenschaftlichen Koordination innerhalb des Netzwerkes bei und steht somit insgesamt für die Interessen der deutschen Genomforschung.

Das Projektmanagement des NGFN

Das Projektmanagement des Nationalen Genomforschungsnetzes (PM-NGFN) übernimmt für das gesamte Netzwerk die Aufgaben der operationalen Koordination und Steuerung. Diesen neuartigen Auftrag zur Unterstützung komplexer Förderinitiativen vergab das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Oktober 2001 an den Projektträger im DLR. Dieser konnte langjährige Erfahrungen in Fragen der Forschungsförderung und des Wissenschaftsmanagements vorweisen.

Das Projektmanagement unterstützt das Projektkomitee bei seinen Koordinierungs- und Steuerungsaufgaben sowie der Umsetzung aller administrativen Maßnahmen und informiert beide Gremien regelmäßig über den Zustand und die Entwicklung des Gesamtprojektes.

Zum Aufgabenspektrum des Projektmanagements zählen auch der Aufbau von NGFN-internen Kommunikationsstrukturen sowie die Gestaltung und Verwaltung von NGFN-Internet und -Intranet, Organisation und Durchführung von Sitzungen und wissenschaftlichen Tagungen und Beratungen sowie die Bereitstellung von aufbereiteten Informationen über die Ergebnisse der medizinischen Genomforschung für die interessierte Öffentlichkeit. Damit sollen möglichst weite Kreise der allgemeinen Bevölkerung auf gleicher Augenhöhe über dieses oftmals schwer zugängliche Forschungsfeld allgemeinverständlich informiert werden.

Das Projektmanagement hat zur regelmäßigen Information über die wissenschaftliche Entwicklung aller Gremien des Gesamtprojektes ein begleitendes Monitoring entwickelt, das mithilfe einer internetbasierten Datenerfassung durch-

geführt wird. Sämtliche Rohdaten werden vom Projektmanagement ausgewertet, in Berichten dokumentiert und den Gremien zur Verfügung gestellt. Aus dem Vergleich dieser Auswertungen kann man ablesen, wie sich Kommunikation und Interaktion innerhalb der einzelnen Bereiche entwickeln und wie der Vernetzungsgrad eines bestimmten NGFN-Bereiches mit dem wissenschaftlichem Erfolg einhergeht. Zukunftsrelevante Entwicklungen können so frühzeitig erkannt und notwendige strukturelle Anpassungen vorgenommen werden.

Die drei Ks: Kommunikation, Komiteesitzungen und Kongresse

Um die Kommunikation zwischen den einzelnen Netzwerkpartnern so effektiv wie möglich zu gestalten, laufen alle Fäden beim Projektmanagement zusammen. Von dort werden den Teilprojektleitern des NGFN, den Steuerungsgremien und dem BMBF verschiedenste Informationen termingerecht zugestellt. Umgekehrt können von allen Akteuren im NGFN Informationen für anstehende Entscheidungen abgerufen werden. Darüber hinaus gestaltet das Projektmanagement die Internetseiten des NGFN, organisiert die Berechtigungen für den Online-Zugang zum NGFN-Intranet, erstellt Online-Formulare und betreut die Forschungseinrichtungen bei deren Nutzung.

Das Projektmanagement organisiert die Sitzungen des Projektkomitees, bereitet die entsprechenden Unterlagen vor und dokumentiert die Ergebnisse in Protokollen.

Das jährliche Projektleitertreffen und weitere NGFN-Symposien werden ebenfalls vom Projektmanagement durchgeführt. Das PM-

NGFN stimmt die inhaltliche Gestaltung mit den beteiligten Wissenschaftlern ab und übernimmt alle Aufgaben der Durchführung vor Ort bis hin zur Dokumentation.

Im Bereich der Öffentlichkeitsarbeit werden zahlreiche Veranstaltungen vom Projektmanagement organisiert, beispielsweise Vorlesungen im Rahmen von Kinderuniversitäten, Journalistenworkshops sowie Präsentationen des NGFN bei Wissenschaftsnächten oder auf Messen und Kongressen.

Offen für die Öffentlichkeit

Neben den verschiedenen Veranstaltungen ist das Projektmanagement darüber hinaus für unterschiedliche Veröffentlichungen verantwortlich. Der offene Umgang – auch mit sensiblen moralischen und ethischen Fragestellungen – soll dazu beitragen, die Bedeutung des NGFN für die Aufklärung von Krankheitsursachen und die Entwicklung von maßgeschneiderten individuellen Therapien zu verdeutlichen. Dabei vermittelt das NGFN den Dialog zwischen Bürgern und Wissenschaftlern über die Chancen und Risiken der Genomforschung. Informationsbroschüren, der NGFN-Internetauftritt, Pressemitteilungen und eine aktive Einbeziehung der Bürger, z. B. durch die Einrichtung eines Hotline-Genom-Telefons bei wissenschaftlichen Tagungen, sollen die Arbeitsweisen der Forscher transparent machen.

Somit führt das Projektmanagement nicht nur wichtige Aufgaben innerhalb des Forschungsnetzwerkes aus, sondern hat auch eine Vermittlerfunktion zwischen Wissenschaft und Öffentlichkeit.

Qualitätsmanagement im Nationalen Genomforschungsnetz

Die Optimierung von Arbeitsabläufen ...

... und die Sicherung und Steigerung der Qualität erarbeiteter Resultate ist das Ziel eines sogenannten Qualitätsmanagements (QM). Um eine Qualitätsgarantie gewährleisten zu können, müssen Standards zu allgemeinen Vorgehensweisen und zur Durchführung von Experimenten etabliert und eingesetzte Materialien und Arbeitsabläufe detailliert und einheitlich dokumentiert werden. Nur so kann in der Wissenschaft die Qualität und Relevanz von Forschungsergebnissen beurteilt werden. Dies trifft besonders für die im Nationalen Genomforschungsnetz durchgeführten Hochdurchsatzexperimente zu, bei denen mehrere Tausend bis hin zu mehreren Millionen Moleküle (z. B. Protein, RNAs, cDNAs) untersucht werden. Biologische Systeme sind sehr komplex und unterschiedlich, so dass ein Befund, der in einem System identifiziert wurde, nicht notwendigerweise auf ein anderes System übertragbar ist. Deshalb ist die Einhaltung der vorgegebenen Qualitätsstandards besonders wichtig, da ausschließlich so eine Verwertbarkeit der Ergebnisse sichergestellt werden kann. Nur eine genaue Beschreibung der Arbeitsvorgänge und Materialien ermöglicht eine Beurteilung, inwiefern die gewonnenen Erkenntnisse allgemeingültig und damit auf andere Systeme übertragbar sind.

Projektkomitee und Projektmanagement haben bereits im Jahr 2003 die Notwendigkeit eines solchen Qualitätsmanagements innerhalb des Netzwerkes erkannt und gaben den Anstoß für ein inzwischen umfangreiches Qualitätsmanagement im NGFN, um qualitativ hochwertige Forschung, Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und einen möglichst uneingeschränkten Datenaustausch und -vergleich zu gewährleisten.

Es wurde die Arbeitsgruppe Qualitätsmanagement & Standards gegründet, deren Ziel-

setzung es ist, Richtlinien für die Steigerung und Sicherung der Qualität von Hochdurchsatzdaten aus den verschiedenen Projekten des NGFN zu erarbeiten.

Die Arbeitsgruppe Qualitätsmanagement & Standards im NGFN

In regelmäßigen Abständen treffen sich seit 2003 die Wissenschaftler aus den verschiedenen Bereichen des Nationalen Genomforschungsnetzes, um sich in Workshops mit dem Thema Qualität zu befassen. Diese Treffen haben die Zielsetzung, Informationen über Qualität und Standards sowie deren Management zu verbreiten. Ferner dienen diese Zusammenkünfte dem Informationsaustausch, der Diskussion sowie der Pflege und Weiterentwicklung der bestehenden Qualitätsmanagementstrukturen. So kommt es zur Optimierung qualitätssichernder Maßnahmen, sowohl was die Organisation betrifft, als auch die Vorgehensweisen des Material- und Datenaustausches oder der Prozesskontrolle. Schließlich werden die Neuerungen und Optimierungen in den Projekten des NGFN umgesetzt. Durch die aktive Beteiligung von Vertretern des Lenkungsgremiums sowie die stetige Unterstützung durch das Projektkomitee wird die Stellung von Qualitätsmanagement & Standards und der Arbeitsgruppe innerhalb des Förderkonzepts NGFN unterstrichen.

Standard Operating Procedures – SOPs

Sogenannte Standardprotokolle (SOPs) sind wesentliche Elemente der Qualitätssicherung und der Standardisierung. Sie beschreiben detailliert den Ab- und Verlauf von Prozessen und geben jedem Anwender einheitliche Anleitungen, anhand derer eine vergleichbare und hochwertige Herstellung von Proben sowie die Durchführung von Experimenten möglich sind.

Im Hinblick auf die nationale und internationale Forschung ist die Sammlung von SOPs, die in verschiedenen NGFN-Projekten kooperativ entwickelt und eingesetzt werden, von großer Bedeutung.

Die Protokolle sind frei über das Internet verfügbar. Sie werden dort themenspezifisch systematisiert und unterliegen regelmäßigen Aktualisierungen. Um eine Nachvollziehbarkeit der Entwicklung sicherzustellen sind alle Versionen abrufbar.

Datenstrukturen und Datenintegration

Das Management der enormen und stets wachsenden Datenmengen, die durch verschiedene Hochdurchsatztechnologien erzeugt werden, stellt einen Schwerpunkt der Aktivitäten des Qualitätsmanagements im NGFN dar. Um eine effiziente und projektübergreifende Nutzung dieser Daten zu gewährleisten, gibt es im NGFN mehrere Datenbank-Initiativen wie beispielsweise LIFEdb, eine Datenbank am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ), in der Daten zur Funktion von Genen veröffentlicht werden, oder die Datenbank der Krankheitsorientierten Netze und der Genetisch-Epidemiologischen Methodenzentren (KN-GEM-DB), ein Übersichtswerkzeug für die Forscher im NGFN, um zu recherchieren, ob bestimmte klinische Daten erhoben wurden und an welchen Standorten und wie häufig diese Proben/Daten im NGFN vorhanden sind.

Um die Rechte von Patienten zu schützen, müssen Studien mit klinischen Daten und Patientenproben die bestehenden Datenschutzrichtlinien erfüllen. Eindeutige Regeln für den Umgang mit Patienteninformationen werden im NGFN gemeinsam mit der Telematikplattform für Medizinische Forschungsnetze (TMF e.V.) entwickelt und mit relevanten Ethikkommissionen (z. B. der DFG) sowie in enger Kooperation mit lokalen Ethikkommissionen abgestimmt.

Ausblick

Die oben genannten Beispiele sind nur ein kleiner Einblick in die vielfältigen Themenkomplexe, die die Arbeitsgemeinschaft Qualitätsmanagement & Standards bearbeitet. Die Vorgehensweisen zur Sicherung der Qualität und der Standards befinden sich in einem kontinuierlichen Entwicklungsprozess, so dass es nicht nur bei einer Sicherung bleibt, sondern auch eine Steigerung der Effizienz mit einhergeht. Ende 2006 wurde in Zusammenarbeit mit dem NGFN-Projektkomitee ein Konzeptpapier zur Vorgehensweise entwickelt. Darin enthaltene Aspekte sind unter anderem die noch stärkere Durchdringung des NGFN mit Konzepten für Qualitätsmanagement und Standardisierung, um das Potenzial zur Inte-

grierbarkeit von Daten aus verschiedenen Projekten weiter zu erhöhen.

Darüber hinaus sollen verstärkt Firmenkompetenzen in die Arbeitsgruppe eingebunden werden, um so die Gesamtheit an Erfahrungen und Fähigkeiten zu bündeln und zusammen innovative Konzepte für die Umsetzung von Protokollen in standardisierte Prozeduren erarbeiten zu können. Ein weiterer Kernpunkt bezieht sich auf die flexibel gestaltete finanzielle Unterstützung neuer, als wichtig und zukunftsweisend identifizierter Projekte des Qualitätsmanagements, um so beispielsweise vergleichende Studien durchführen zu können oder um spezifische Workshops zu aktuellen Themen zu ermöglichen.

Künftig wird weiterhin eine enge Zusam-

menarbeit zwischen der Arbeitsgruppe, den Steuerungselementen des NGFN und den Wissenschaftlern angestrebt, um innovative Konzepte zur weiteren Steigerung und Sicherung der Qualität von Forschungsarbeiten und deren Resultaten voranzutreiben. Wie das NGFN in der Projektlaufzeit unter Beweis stellen konnte, entspricht die Deutsche Genomforschung im internationalen Vergleich höchsten Qualitätsstandards und erzielt außerdem Erkenntnisse mit großem Nutzen für die Allgemeinheit. Die Arbeitsgemeinschaft leistet somit nicht nur einen Beitrag zur Etablierung von Qualitätssicherung und -optimierung sowie zu internationalen Standards, sie trägt auch ungemein zur internationalen Sichtbarkeit des NGFN bei.

Von der Forschung auf den Markt

Technologietransfer im Nationalen Genomforschungsnetz

Isabel von Korff

Know-how und Erfindungen schlummern häufig ungenutzt in den Laborbüchern der Forscher. Weltweit werden zum Beispiel nur fünf bis sieben Prozent der Patente aus wissenschaftlichen Forschungseinrichtungen kommerziell genutzt. Andererseits müssen große Geldmengen in die Forschung investiert werden, damit neue Erkenntnisse gewonnen werden können. Optimal wäre es, wenn ein Teil dieser Investitionen durch Patentierung und wirtschaftliche Nutzung wieder zurückgewonnen werden könnten. Diese Einnahmen könnten dann weiteren Forschungsprojekten zugutekommen.

Dies kann durch Technologietransfer erreicht werden: Wissenschaftler und Entwickler von Technologien schließen sich mit Akteuren der Wirtschaft zusammen, damit innovative Technologien und Forschungsergebnisse möglichst in die Praxis umgesetzt und kommerziell genutzt werden können.

Mittlerweile gibt es bundesweit Technologietransfereinrichtungen und Patent- und Verwertungsagenturen (PVAs), die mögliche Erfindungen identifizieren und die Vorausset-

zungen dafür schaffen, diese bestmöglich zu verwerten. Außerdem vermitteln diese Einrichtungen den Kontakt zur Industrie und unterstützen die Zusammenarbeit von Wissenschaft und Wirtschaft.

Die meisten dieser Patent- und Verwertungsagenturen sind regional organisiert und betreuen fächerübergreifend bestimmte Einrichtungen in ihrer Region. Damit kann ein PVA-Team beispielsweise gleichzeitig für ein mechanisches Getriebe, einen Porzellan-Werkstoff, ein Asthma-Medikament und einen Mikro-Chip zuständig sein. In den letzten Jahren gründeten sich allerdings auch eine Reihe Technologietransfereinrichtungen, die sich auf ein Fachgebiet spezialisiert haben. Zum Beispiel die Ascenion GmbH, die aus einer Initiative mehrerer Helmholtz-Institute hervorgegangen ist und deren Schwerpunkt die Lebenswissenschaften sind.

Im Dialog mit der Wirtschaft

Anfang 2005 erhielten die Ascenion GmbH und die Max Planck Innovation GmbH vom Bundesministerium für Bildung und For-

schung (BMBF) den Auftrag, den Technologietransfer im Nationalen Genomforschungsnetz (NGFN-2) zu unterstützen. Im Rahmen dieses Auftrages wurde 2005 die Koordinierungsstelle Technologietransfer (KTT) gegründet, mit dem Ziel, alle Akteure des NGFN-2 sowie die verschiedenen Technologietransferstellen zu koordinieren und dadurch die Kommunikationsstrukturen innerhalb des Netzwerkes zu verbessern.

Zu den Aufgaben der KTT gehört die Beratung der NGFN-Forscher in allen patentrechtlichen und wirtschaftlichen Fragen, die Abfrage von Berichten über erfolgte Technologietransferaktivitäten und eine Plausibilitätsprüfung für die Verwendung der Mittel aus den Patentfonds.

Außerdem überprüft die KTT alle Forschungsergebnisse im NGFN-2 nach definierten Qualitätsstandards und sichtet alle geplanten Publikationen auf schutzrechtlich oder wirtschaftlich relevante Inhalte, bevor sie zur Veröffentlichung eingereicht werden.

Die KTT ist auch zentrale Anlaufstelle und Informationsquelle für Unternehmen, die an

der Nutzung der Forschungsergebnisse aus dem NGFN interessiert sind.

In den zweieinhalb Jahren seit ihrer Gründung hat die KTT über 1 850 Veröffentlichungen aus dem NGFN auf schutzrechtliche Inhalte überprüft, aus denen sich bislang 25 Patentfamilien ergeben haben. Außerdem half die KTT bei der Formulierung, bei der Verhandlung und beim Abschluss zahlreicher Konsortialverträge zwischen NGFN-Akteuren. Die KTT unterstützte die Arbeit des NGFN Projektkomitees und veranstaltete Workshops und Seminare, um denjenigen, die im Bereich Technologietransfer tätig sind, die Möglichkeit des Informationsaustausches zu bieten.

Marktplatz für die Industrie

Seit Juni 2005 gibt es die Internetplattform Genome Marketplace (www.genomemarketplace.de). Auf diesem „Marktplatz“ findet die Industrie alle wirtschaftlich interessanten Ergebnisse aus dem NGFN. Damit wird das Prinzip „one face to the customer“ konsequent umgesetzt. Auf der Internetseite werden patentierte Erfindungen und Technologien, aber zum Beispiel auch Tiermodelle angeboten. Sobald ein Unternehmen an einer Technologie interessiert ist, stellt die Koordinierungsstelle den Kontakt zu den Wissenschaftlern und/oder zur verantwortlichen Technologietransfereinrichtung her. Zurzeit werden in diesem Online-Portal 28 Technologieangebote präsentiert.

Die Koordinierungsstelle steht auch in direktem Dialog mit Akteuren der Wirtschaft. Auf zahlreichen internationalen Fachveranstaltungen, wie den Partneringkonferenzen BIO oder BIO Europe, präsentierte die KTT ausgewählte Technologieangebote. Auf nationaler Ebene wurde eine Allianz mit BIO Deutschland (Biotechnologie-Industrie-Organisation Deutschland) eingegangen. Die Mitglieder der BIO Deutschland, die ideal positioniert sind, um Technologien und Produktideen der Forschung voranzubringen und weiterzuentwickeln, erhalten nun beschleunigten Zugang zu NGFN-2 Ergebnissen. Über „Technologie-Wunschlisten“ können die Mitglieder die KTT über ihren derzeitigen Bedarf an Technologien informieren und so gezielt angesprochen werden.

Erfolgreiche Verwertung – Zwei Beispiele

Durch diese Aktivitäten und mit der Hilfe verschiedener Technologietransfereinrichtungen konnten bereits viele Projekte in die Phase der Vermarktung gebracht werden. Zwei Beispiele:

Vielversprechende Behandlung des Neuroblastoms

Wissenschaftler des Nationalen Genomforschungsnetzes haben entdeckt, dass ein bestimmtes Pilzgift möglicherweise als Medikament zur Behandlung des Neuroblastoms eingesetzt werden kann. Das Neuroblastom ist ein Tumor des Nervengewebes und tritt vor allem bei Kindern häufig auf. Erste experimentelle Daten lassen vermuten, dass der Pilzgift-Wirkstoff den bestehenden Behandlungsverfahren überlegen ist. Diese Daten wurden von der KTT beim regulären Sichten der Publikationen als patentrelevant eingestuft.

Nach einer eingehenden Marktanalyse der Ascenion GmbH wurde ein Patentanwalt beauftragt, und nur zwei Monate nach Erfindungsmeldung wurde eine prioritätsbe-gründende Patentanmeldung beim Europäischen Patentamt eingereicht. Bereits kurz danach wurde mit der Vermarktung begonnen. Schnell konnte die Ascenion GmbH zwei potenzielle Interessenten gewinnen, eine schweizerische und eine deutsche Biotech Firma.

Beide unterzeichneten in der zweiten Hälfte 2006 ein Geheimhaltungsabkommen, um die Daten weiter auswerten zu können. Die Verhandlungen laufen noch und sollen durch neue Daten aus Tiermodellen, die für Ende 2007 erwartet werden, zusätzlich beschleunigt werden. In der Zwischenzeit wurde eine dritte Geheimhaltungsvereinbarung mit einer weiteren deutschen Biotech Firma abgeschlossen. Auch hier dauert die Evaluierung des Projekts noch an.

Neue Diagnostik für Parkinson

Im Jahr 2004 entdeckte ein internationales Forscherteam im Gen LRRK2 krankheitsassoziierte Varianten, die zur Entstehung von Parkinson beitragen können. Nach einer gemeinsamen Patentanmeldung beauftragte

das Forscherteam die KTT damit, einen Industriepartner zu suchen, um so das große Potenzial der Forschungsbefunde für die Diagnostik und eine Therapie der Parkinsonkrankheit auszuschöpfen. Derzeit wird eine Lizenzvereinbarung mit einer amerikanischen Diagnostikfirma verhandelt. Die Firma hat bereits einen PCR Test für die LRRK2-Varianten entwickelt, der die Mediziner bei der Auswahl einer geeigneten Therapie für die Patienten unterstützen wird.

Überdurchschnittliche Verwertungsergebnisse

Auch im Hinblick auf die Zahl der Patentanmeldungen können die NGFN-Wissenschaftler zusammen mit der KTT auf erfolgreiche Jahre zurückblicken: Beispielsweise gab es im Jahr 2005 insgesamt 13 Patentanmeldungen, die aus der Forschungsarbeit von etwa 500 NGFN-Wissenschaftlern resultieren. Wenn man dieses Verwertungsergebnis mit dem Durchschnitt von neun Patentanmeldungen pro 1 000 Wissenschaftlern in Europäischen Forschungseinrichtungen (Quelle: Association of European Science & Technology Transfer Professionals (ASTP)) vergleicht, so ist das ein beeindruckendes Ergebnis.

Das derzeitige KTT Projekt wird Anfang 2008 mit den letzten Projekten des NGFN-2 enden. Eine weitere Förderphase wird sich im Rahmen des Programmes der medizinischen Genomforschung anschließen und die KTT wird erneut die Koordination des Technologietransfers in diesem Programm gestalten. Die Erfahrungen, die die KTT in den letzten drei Jahren gesammelt hat, sind sehr wertvoll und werden dazu beitragen, eine angepasste Technologietransfer-Strategie in der nächsten Förderphase der medizinischen Genomforschung umzusetzen.

Kontakt

Dr. Isabel von Korff
 Ascenion GmbH
 Herzogstraße 64, 80803 München
 E-Mail: korff@ascenion.de
www.ascenion.de
www.genome-marketplace.de

Glossar

α -synuclein: Ein Protein, das vor allem bei Morbus Parkinson zu unlöslichen Proteinablagerungen aggregiert (sogenannten Lewy-Körperchen). Mutationen im α -synuclein-Gen (z. B. A53T) begünstigen diesen Prozess.

A β – Amyloid- β -Peptid: Ein aus dem Amyloid-Vorläuferprotein (APP) bei Morbus Alzheimer fehlerhaft generiertes Peptid, das zu erhöhter Proteinaggregation neigt und dabei sogenannte A β -Plaques bildet.

Allel: Ein Allel eines Gens ist die unterschiedliche Form oder Variante dieses Gens. Unterscheidet sich ein Gen beispielsweise an einem Punkt der Sequenz, spricht man von zwei verschiedenen Allelen desselben Gens.

Annotation: Eine aufgrund von Sequenzähnlichkeiten und typischen DNA-Elementen mithilfe von Computern vorhergesagte Gensequenz.

Antigene: Moleküle, die durch Antikörper gebunden werden.

Antikörper: Bindemoleküle des Immunsystems, die unser Körper gegen Millionen verschiedener Antigene hochspezifisch bilden kann.

Antikörper-Genbibliothek: In Bakterien klonierte Sammlung von Milliarden verschiedener Baupläne (Gene) für Antikörper.

DNA-Chip-Technologie: Verfahren, mit dem die Genexpressionsmuster in ausgewählten Geweben analysiert werden können. Dazu markiert man die aus dem Gewebe extrahierte RNA mit einem Farbstoff und lässt sie an die komplementäre DNA (= Gene) binden, die an einen Träger gebunden sind. Mit einem Lesegerät können die gefärbten (= exprimierten) Gene sichtbar gemacht werden.

ES-Zellen: Embryonale Stammzellen verfügen noch über die Fähigkeit, sich in einer geeigneten Umgebung zu allen Zelltypen des Körpers zu entwickeln.

Genetische Assoziation: Statistisch gehäuftes Auftreten einer genetischen Variante mit einer Erkrankung.

Genfalle: Fremde DNA-Sequenzen, die in embryonale Stammzellen von Mäusen eingeschleust werden. Sie integrieren sich dabei in ein Gen der Maus, wodurch dieses ausgeschaltet wird.

GWA (Genomweite Assoziationsstudie): Studie, in der nach Häufungen bestimmter genetischer Merkmale (z. B. SNPs) aus dem gesamten Genom eines Patienten bei einer bestimmten Erkrankung gesucht wird.

Haplotyp: Haplotypen sind die individuellen Kombinationen der genetischen Variationen zwischen den Menschen. Beispiel: Gibt es bei einem Organismus die genetische Variation A und a und an einer anderen Stelle die genetische Variation B und b, so kann der Haplotyp aus AB|ab oder Ab|aB zusammengesetzt sein. Da das menschliche Genom üblicherweise nicht zufällig in beliebig langen Abschnitten neu kombiniert und vererbt wird, sondern zu einem großen Teil in Form von langen Segmenten, sind die Haplotypen meist in Blöcken organisiert. Deshalb gibt es sehr häufig relativ gleich bleibende, charakteristische Gruppen von genetischen Varianten, die gemeinsam vererbt werden. Wenn man also die eine Variante kennt, dann kann man mit einer erheblichen Wahrscheinlichkeit auf das Vorliegen der zweiten Variante schließen. Diesen Zusammenhang kann man beispielsweise bei der Suche nach Krankheitsgenen ausnutzen, denn die Wissenschaftler brauchen dann bei ihren Untersuchungen nicht alle genetischen Varianten einer Person zu untersuchen, sondern sie können sich auf ausgewählte Varianten beschränken.

Herzinsuffizienz: Unvermögen des Herzens, jederzeit den Körper ausreichend mit Blut und damit Sauerstoff zu versorgen.

Kardiomyopathie: Erkrankungen des Herzmuskels mit Störungen der mechanischen bzw. elektrischen Funktion des Herzens. Häufigste Ursache von Herzinsuffizienz und Transplantationen.

knock-out-Maus: Maus, bei der ein bestimmtes Gen ausgeschaltet wurde, um die Funktion einzelner Gene zu untersuchen.

miRNA: microRNA, kurze RNA-Moleküle, die eine wichtige Rolle bei der Genregulation, insbesondere bei der RNA-Interferenz spielen. Sie binden spezifisch an mRNA und kontrollieren die Genexpression durch Regulation der mRNA-Stabilität und der Translation (siehe auch Kasten: RNA-Interferenz S. 41).

Periplasma: Zellkompartiment zwischen Zytoplasmamembran und äußerer Membran bei Gram-negativen Bakterien. Das Periplasma umgibt die gesamte Zelle und kann bis zu 40 % des gesamten Zellvolumens ausmachen. Es enthält eine hohe Konzentration von Enzymen sowie Binde- und Transportproteinen.

Phagemid: Spezielles Plasmid mit einem Phagen-Replikationsorigin zur Bildung einer einzelsträngigen DNA-Kopie; Voraussetzung für die Verpackung in die Phagenpartikel.

Phagen: Kurzform für filamentöse Bakteriophagen; Viren, die Bakterien (hier: E. coli) infizieren und sich dort vermehren.

Pharmakokinetik: Die Pharmakokinetik befasst sich damit, wie rasch und in welchem Ausmaß nach der Verabreichung eines Stoffes dieser anschließend im Blutplasma und in den verschiedenen Körpergeweben auftritt und wo und in welcher Weise er wieder ausgeschieden wird. Auch wird untersucht, welche chemische Form das Arzneimittel durch Stoffwechselforgänge im Körper annimmt, wie es verändert und abgebaut wird. Die Pharmakokinetik wird z. B. in der Arzneimittelentwicklung angewendet, um für einen Arzneistoff eine passende Darreichungsform und sinnvolle Dosierungsempfehlungen zu entwickeln.

Real-time PCR: Eine PCR zur Quantifizierung von geringen Mengen an mRNA oder DNA. Die Methode erlaubt den Vergleich zweier unterschiedlicher Zustände zu einem definierten Zeitpunkt oder zweier unterschiedlicher Gewebe.

Reportergene: Gene, mithilfe derer bestimmte Qualitäten und Effekte anderer Gene gezeigt werden können.

siRNA: small interfering RNA, entsteht aus längerer freier doppelsträngiger RNA, die z. B. von Viren stammt (siehe Kasten: RNA-Interferenz S. 41).

SNP (Single Nucleotide Polymorphism): SNPs werden Variationen von einzelnen Basenpaaren in einem DNA-Strang bezeichnet, die bei mindestens 1 % der jeweiligen Population vorkommen. SNPs stellen ca. 90 % aller genetischen Varianten im menschlichen Genom dar.

SOP: Standard Operation Procedure: standardisierte Arbeitsanweisung, um die Reproduzierbarkeit von Experimenten und Ergebnissen zu garantieren.

Vektor: Ringförmiges DNA-Molekül, mit dessen Hilfe Fremdgene in eine Zelle oder ein Bakterium eingeschleust werden. Es kann sich in der Wirtszelle selbständig vermehren. Konditionelle Vektoren ermöglichen es, das Vektorgen gezielt an- oder abzuschalten.

Buchbesprechung: Aufgelesen

Gott-Gen und Großmutterneuron

Geschichten von Gehirnforschung und Gesellschaft

Eine Gruppe unserer Vorfahren in Afrika beschließt in unbekanntes Gelände aufzubrechen. Viele sind gescheitert, einige aber nicht. Und von denen stammen wir ab – weltweit. Es haben sich also die durchgesetzt, die neugierig waren, auch mal etwas wagten und mit Glück, Optimismus im Bauch, Hoffnung im Herzen – und Dopamin im Kopf losgingen. Vielleicht hat das C-Allel des VMAT2-Gens etwas mitgeholfen?

Darüber sinniert der bekannte Hirn- und Lernforscher Manfred Spitzer pointiert und mit Witz in seiner Veröffentlichung „Gott-Gen und Großmutterneuron“ über das Buch eines amerikanischen Verhaltensgenetikers, der unter dem Titel *Das Gott-Gen* „über weite Strecken entweder Geschichten erzählt, oder Tatsachen verbreitet.“ Der durchaus interessante Gehalt des Buches ließe sich nämlich in einem Satz zusammenfassen: Als Nebenprodukt von Arbeiten zur Genetik von Suchterkrankungen wurde

entdeckt, dass die Persönlichkeitseigenschaft der Neigung zur Spirualität mit Varianten (Allelen) eines Gens korreliert, das ein Protein kodiert, welches in der Transmission von Dopamin, Serotonin und Noradrenalin eine Rolle spielt.

Der genetische Polymorphismus A33050C betrifft das Gen VMAT2, dessen Produkt am Transport von Monaminen im Gehirn beteiligt ist und bei kokainsüchtigen Patienten als erniedrigt gefunden wurde. Das Gen liegt auf Chromosom 10 im menschlichen Genom, sein Name bezeichnet den genauen Ort, an dem sich entweder die Base Adenin (Variante A) oder Cytosin (Variante C) befindet. Wer die C-Variante auf einem seiner beiden Chromosomen Nummer 10 mit sich herumträgt, neigt auffällig zu „Selbsttranszendenz“ und tendenziell zu „Mystizismus und transpersonaler Identifikation“ in entsprechenden Persönlichkeitsfragen. Dies ergab eine Studie der Frage-

bögen von 226 Personen, deren DNA zudem untersucht wurde. Dabei gehe es nicht um die Genetik einer Religion, sondern vielmehr um Persönlichkeitsvarianten wie beispielsweise Neugier oder Extraversion.

Spitzer serviert in seiner Sammlung, wie bereits in den vorangegangenen sechs Veröffentlichungen, anspruchsvolle wissenschaftliche Kost zu aktuellen Forschungsergebnissen in allgemein verständlicher Form. Dabei geht es ihm immer um das große Ganze – nämlich unsere Gesellschaft. Beiträge wie *Aarons DNA* oder *Macht Fernsehen dick?* bieten interessanten Diskussionsstoff und machen neugierig.

Ein kurzweiliger Lesestoff für alle, die sich Gedanken um Gott und die Welt machen.

Gott-Gen und Großmutterneuron

Autor Manfred Spitzer
Verlag Schattauer GmbH
ISBN 978-3-7945-2498-3

Science Digest

ADHS bremst das Gehirn

Bei Kindern mit einer Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitätsstörung (ADHS) entwickelt sich das Gehirn normal, aber zeitverzögert: Viele Hirnregionen reifen im Schnitt drei Jahre später als bei Kindern ohne die Verhaltensauffälligkeiten, haben Forscher nachgewiesen. Besonders betroffen sind die Regionen, die für die Kontrolle der Aufmerksamkeit, die Steuerung von Bewegungen und die Bewertung von Sinneseindrücken zuständig sind. Dass die Entwicklung lediglich verschoben, aber nicht verändert ist, erklärt nach Ansicht der Forscher, warum sich die Probleme der betroffenen Kinder später auszuwachsen scheinen. Bei insgesamt 446 Kindern und Jugendlichen untersuchten die Wissenschaftler mit der Magnetresonanztomographie, wie dick die Großhirnrinde an insgesamt 40 000 Punkten war. Jedes Kind wurde mindestens zweimal im Abstand von etwa drei Jahren gescannt. Im Fokus stand dabei die Frage, wann die Großhirnrinde die maximale Dicke erreichte, ein Zeitpunkt, ab dem überflüssige Nervenverbindungen im Zuge einer Optimierung des Gehirns wieder abgebaut werden. Die Probanden, deren Alter zwischen dem von Vorschulkindern und jungen Erwachsenen lag, bildeten dabei zwei Gruppen: eine mit diagnostiziertem ADHS und eine gesunde Vergleichsgruppe. Bei allen Kindern verlief die Reifung des Gehirns im gleichen Muster, sozusagen von hinten nach vorne, ergab die Auswertung. Allerdings erreichten die untersuchten Punkte in den Gehirnen der ADHS-Kinder im Vergleich zur Kontrollgruppe ihre maximale Ausdehnung im Durchschnitt drei Jahre, in manchen Fällen sogar fünf Jahre später. Eine Ausnahme bildete das motorische Zentrum: Es war die einzige Hirnregion, die bei der ADHS-Gruppe früher reifte. Besonders ausgeprägt war die Verzögerung bei Arealen im vorderen Bereich des Gehirns. Sie sind allgemein zuständig für die höheren Funktionen wie etwa das abstrakte Denken, die Fähigkeit, unpassende Reaktionen unterdrücken zu können oder die Kontrolle der Aufmerksamkeit – genau den Fähigkeiten also, die bei Kindern mit ADHS häufig beeinträchtigt sind. Besonders interessant sei zudem gewesen, dass sich zwar das Bewegungszentrum sehr schnell entwickelte, die für die Kontrolle von Bewegungen zuständige Region aber eine deutlich verzögerte Reifung zeigte,

berichten die Forscher. Sie wollen nun die genauen genetischen und neurophysiologischen Ursachen der Entwicklungsverzögerung untersuchen. ADHS kommt bei schätzungsweise drei bis zehn Prozent aller Kinder vor und ist gekennzeichnet durch Konzentrationsstörungen, Störungen der Wahrnehmung und Informationsverarbeitung sowie unterschiedliche weitere Verhaltensauffälligkeiten.

Quelle: PNAS, DOI:

10.1073/pnas.0707741104; BdW 13.11.2007

Wenn Eizellen zu viele Chromosomen haben

Viele Erkrankungen und Fehlentwicklungen des Menschen haben ihre Wurzeln in dessen evolutionärer Geschichte. Die meisten Tiere und Pflanzen setzen bei der Fortpflanzung auf eine bewährte Strategie: Sie kombinieren ihr Erbgut neu und halten dabei dessen Gesamtmenge konstant. Dieses Ziel lässt sich auf verschiedenen Wegen erreichen. Einer davon (Automixis) war bislang nur bei Insekten bekannt, doch Wissenschaftler haben ihn jetzt erstmals auch bei Wirbeltieren nachgewiesen. Damit können sie unter anderem eine häufige Ursache für Defekte bei menschlichen Embryonen erklären. Das Erbgut eines Menschen ist auf 46 Chromosomen verteilt. 23 davon stammen von seiner Mutter, 23 vom Vater. Wenn sich bei Frauen die Eizellen bilden und beim Mann die Spermien, dann tauschen die Chromosomen zuerst untereinander Material aus. Danach verteilen sie sich so, dass am Ende jede Eizelle und jedes Spermium genau 23 Chromosomen enthält. Vereinigen sich Ei und Spermium bei der Befruchtung miteinander, ergibt sich wiederum die doppelte und damit komplette genetische Ausstattung. Passieren aber bei der Reifung der Ei- oder Spermienzellen Fehler, kann es zu Abweichungen von diesen Zahlen kommen. Was für Menschen problematisch ist, stecken andere Lebewesen locker weg. Frösche, Lurche und Fische etwa können mit abweichenden Chromosomenzahlen gut leben. Das trifft auch auf den Amazonenkärpfling zu, einen Süßwasserbewohner aus Mexiko: Von ihm gibt es in der Natur Exemplare mit doppeltem, aber auch mit dreifachem Chromosomensatz. Bei den Amazonenkärpflingen wiederum gibt es nur Weibchen. Ihre

GrundlaGEN:

Die Huntington-Krankheit

Die Huntington-Krankheit, erstmals 1872 von dem amerikanischen Arzt George Huntington beschrieben, ist eine Krankheit, die derzeit noch als unheilbar gilt und immer zum vorzeitigen Tod führt. Sie bricht häufig im Alter zwischen 30 und 60 Jahren aus. Auffällige Symptome sind ruckartige Bewegungen von Händen, Füßen und Rumpf sowie unwillkürliches Grimassenschneiden. Die Erkrankung hat auch Einfluss auf die Gedächtnisleistung und psychische Verfassung der Betroffenen. Wichtige Körperfunktionen wie das Schlucken sind schließlich unmöglich. Die Ursache ist ein genetischer Defekt, der das nach der Krankheit benannte Protein Huntingtin in seiner Struktur verändert. Es verklumpt, lagert sich in den Zellen ab, behindert dadurch die Stoffwechselfvorgänge und zerstört schließlich die Nervenzellen.

Hilfe von den TeeplantaGEN ?

Grüner Tee ist gesund! Das wissen wir schon lange. Wissenschaftler des NGFN fanden heraus, dass er vielleicht sogar Huntingtonpatienten helfen könnte. Die Substanz Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG), die aus dem grünen Tee gewonnen wird, bremst die Verklumpung des Huntingtin-Eiweißes und belegt somit wissenschaftlich die heilende Wirkung des grünen Tees. EGCG und andere Inhaltsstoffe des grünen Tees wurden in klinischen Studien bereits für Krankheiten, beispielsweise für Krebs, getestet und haben sich als verträglich für den Menschen herausgestellt. Die Substanz könnte somit Grundlage für ein Medikament gegen die Huntington-Krankheit und ähnliche Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson, deren vergleichbare Ursachen ein falsch gefaltetes Protein ist, sein.

Eizellen können sich direkt zu einem Fisch entwickeln, ganz ohne zusätzliches Erbmaterial aus einem Spermium. Denn bei dem mexikanischen Fisch ist die Jungfernzeugung die Regel. Davon sprechen Biologen, wenn ein Weibchen auch ohne Befruchtung Junge bekommen kann. Damit sich aus den Eizellen Embryonen entwickeln können, müssen zwar noch Spermien ins Spiel kommen. Diese „stehlen“ die Amazonenkärpflinge von Männchen einer nahe verwandten Art, indem sie diese zur Kopulation verführen. Die Spermien aber geben dem Ei nur einen rein mechanischen Anstoß zur Weiterentwicklung; das männliche Erbgut findet keinen Eingang in den Embryo. Die dabei entstehenden Töchter haben all ihre Chromosomen von der Mutter, mit der sie folglich genetisch identisch sind. Der Amazonenkärpfling ist im Verlauf der Evolution entstanden, als sich zwei andere Kärpflingsarten kreuzten. Dieses Ereignis spielten die Wissenschaftler im Labor nach. Die Kreuzung ergab Fische mit doppeltem Chromosomenbestand. Unter deren Nachkommen wiederum fanden sich aber auch Tiere mit dreifachem Chromosomensatz. Bei den untersuchten Fischen trat die sogenannte Automixis auf, die bislang nur von Insekten bekannt war. Dabei wird die Zahl der Chromosomen nicht in allen entstehenden Eizellen halbiert. Es gibt darum sowohl Eizellen mit einfachem als auch mit doppeltem Chromosomensatz, die dann untereinander wieder verschmelzen. So stehen am Ende des Prozesses auch Eizellen mit dreifachem Chromosomensatz. Weil die Automixis nun erstmals auch bei Wirbeltieren nachgewiesen wurde, ziehen die Wissenschaftler zwei Schlussfolgerungen. Zum Einen vermuten sie, dass dieser Mechanismus auch bei höheren Tieren einschließlich des Menschen dafür sorgt, dass Embryonen mit dreifachem Chromosomensatz entstehen können. Zum Anderen erklärt sich damit auch das spontane Auftreten von Jungfernzeugungen bei manchen Wirbeltieren. Solche Fortpflanzungen ohne Beteiligung von Männchen sind zum Beispiel von Hammerhaien und Waranen bekannt, die lange Zeit isoliert in Zoos gehalten wurden. Durch Automixis können auch bei Wirbeltieren Eizellen mit doppeltem Chromosomensatz entstehen, die sich dann von alleine zu Embryonen weiterentwickeln.

Quelle: Current Biology, DOI:

10.1016/j.cub.2007.09.064, 01.11.2007; IdW 09.11.2007

Essen gegen die Uhr

Fettes Essen bringt die innere Uhr aus dem Takt, haben Forscher in einer Studie an Mäusen gezeigt: Ähnlich wie ein Mensch, der mitten in der

Nacht den Kühlschrank plündert, konsumieren fettreich ernährte Tiere ungewöhnlich viel Futter während der Phasen, in denen sie normalerweise ruhen oder schlafen. Gleichzeitig bringt das fettreiche Futter das Timing bei verschiedenen Stoffwechselwegen durcheinander und dämpft zudem die ansonsten gleichmäßig mit der Tageszeit an- und absteigende Stoffwechselaktivität. Sollte sich dieser Effekt auch beim Menschen nachweisen lassen, könnten sich neue Ansätze für die Behandlung von krankhaftem Übergewicht und seinen Folgen ergeben, hoffen die Forscher.

Schon früher hatte der Leiter der Studie gezeigt, dass Mäuse mit einer defekten inneren Uhr viel unkontrollierter fressen und auch stärker zu Übergewicht neigen als ihre normalen Artgenossen. Anscheinend gibt es jedoch auch den umgekehrten Effekt, legt nun die neue Studie nahe. Darin hatten die Forscher ihre Mäuse in zwei Gruppen eingeteilt, von denen die eine weiterhin ihr normales Futter bekam, während die andere auf eine fettreiche Diät gesetzt wurde. Um äußere Einflüsse auf den Tagesrhythmus der Tiere auszuschließen, wurden die Mäuse Tag und Nacht in einem verdunkelten Käfig gehalten und beobachtet. Bereits nach einer Woche waren die ersten Effekte messbar, berichten die Forscher: Das fettreiche Futter führte zu einer Verlängerung des Tageszyklus, und zwar schon bevor eine Gewichtszunahme bei den Mäusen eintrat. Gleichzeitig veränderte sich das Verhalten der Tiere – sie hielten ihre Ruhe- und Aktivitätsphasen nicht mehr so strikt ein wie ihre normal ernährten Artgenossen. Auch bestimmte Stoffwechsellmarker gerieten aus der Balance, darunter das Sattormon Leptin, der Blutzuckerspiegel, die Insulinmenge im Körper und die Konzentration an Fettsäuren im Blut. Zudem veränderte sich die Aktivität mehrerer Gene, die für die Steuerung der inneren Uhr verantwortlich sind. In gewisser Hinsicht geraten die Mäuse durch das fettreiche Futter in einen Teufelskreis: Durch die zusätzlichen Kalorien verstellt sich die innere Uhr und bringt die Tiere dazu, zu ungewöhnlichen Zeiten und damit mehr zu fressen als sonst. Das wiederum verstärkt den Einfluss auf die innere Uhr, der wiederum das Fressverhalten weiter verändert. Die innere Taktung und der Stoffwechsel haben sich zusammen entwickelt, so der Forscher. Wenn die empfindliche Balance zwischen ihnen gestört wird, kommt es zu nachteiligen Auswirkungen. Von einer genaueren Untersuchung erhofft sich das Team nun Erkenntnisse über die Entstehung von Übergewicht, Diabetes und Schlafstörungen.

Quelle: Cell Metabolism, Bd. 6, S. 414;

BdW 07.11.2007

Wann Stillen schlau macht

Stillen fördert möglicherweise nur bei Kindern mit einer bestimmten genetischen Ausstattung die Intelligenz. Bei Kindern mit einer Genvariante namens FADS2 ist der Intelligenzquotient (IQ) im Schnitt um knapp sieben Punkte höher, wenn sie gestillt werden, berichten britische Wissenschaftler. Bei Kindern ohne diese Genvariante hat das Stillen hingegen keinen Einfluss auf den IQ, zeigen zwei Studien mit mehr als 3 000 Kindern. Die Forscher wurden auf das Gen FADS2 aufmerksam, weil es den Bauplan für ein Enzym trägt, das hilft, Fettsäuren in zwei bestimmte mehrfach ungesättigte Fettsäuren umzuwandeln. Diese Fettsäuren sammeln sich schon während der ersten Monate nach der Geburt im Gehirn an. Es ist zwar letzten Endes noch nicht belegt, ob eine Ergänzung dieser Fettsäuren auf die Hirnleistung von Menschen einen Einfluss hat. Laboruntersuchungen, bei denen Nagetieren und Primaten mit zusätzlichen Fettsäuren gefüttert wurden, führten aber zu einer erhöhten Konzentration dieser Fettsäuren im Gehirn und zu einem gesteigerten Geschick in Tests, die Lernen, Gedächtnis und Problemlösungsvermögen untersuchten. Neunzig Prozent der Kinder, die in den beiden Studien mitgewirkt hatten, hatten mindestens eine Kopie der sogenannten C-Version des Gens FADS2, und erreichten einen höheren IQ, wenn sie gestillt wurden. Bei den verbleibenden zehn Prozent mit der G-Version des Gens zeigte sich durchs Stillen hingegen kein IQ-Vorteil. An früheren Studien über Stillen und IQ gab es Kritik, da beispielsweise der sozioökonomische Status oder der IQ der Mutter oder weitere Faktoren außer Acht gelassen wurden. Ihre Studien würden nun aber diese Kritik umgehen, da sie einen physiologischen Mechanismus für den IQ-Unterschied aufzeigen. Die Ergebnisse unterstützen die Idee, dass Inhaltsstoffe der Muttermilch zur Entwicklung der Intelligenz beitragen.

Quelle: PNAS, DOI:

10.1073/pnas.0704292104; BdW 06.11.2007

Schnüffel-Barcode im Urin

Mäuse erkennen ihre Artgenossen an bestimmten Duftstoffen im Urin. Sie orientieren sich dabei an hochspezialisierten Eiweißmolekülen, die für jede Maus einzigartig sind. Dadurch können sie zwischen verwandten und nicht verwandten Artgenossen unterscheiden.

Bisherige Studien hatten die sogenannten MCH-Proteine und damit eine ganz andere Gruppe von Eiweißstoffen für die Dufterkennung verantwortlich gemacht: Ihr Bauplan ist auf einem Set von Genen gespeichert, das Funktionen des

Immunsystems steuert und gleichzeitig auch den Körpergeruch beeinflusst. Dass diese Annahme falsch ist, konnten Forscher in ihrer neuen Studie zeigen: Ließen die Biologen weibliche Mäusen an Duftproben schnuppern, die zwei unterschiedliche Varianten der Immuneiwieße enthielten, konnten die Mäuseweibchen die beiden Marker nicht unterscheiden. Gaben die Wissenschaftler den Tieren stattdessen jedoch Proben aus Mäuse-Urin zu Schnuppern, erkannten die Weibchen die verschiedenen Männchen zuverlässig. Die Proben unterschieden sich dabei durch eine bestimmte Gruppe von Eiweißmolekülen. Diese Urin-Proteine scheinen somit eine Art chemischer Barcode zu sein, durch den jedes einzelne Tier eindeutig zu erkennen ist. Frühere Studien hatten im Labor gezüchtete Mäuse verwendet, die sich ausschließlich in ihren Immun-Genen unterscheiden und ansonsten genetisch identisch sind. Jetzt untersuchten die Forscher dagegen wilde Mäuse, die eine Reihe unterschiedlicher Gene besitzen. Die bisherigen Studien hätten den Unterschied bei den Urin-Molekülen also gar nicht entdecken können. Mit Hilfe der Urin-Moleküle können die Tiere zwischen verwandten und nicht verwandten Artgenossen unterscheiden und somit Verwandte als ungeeignete Geschlechtspartner identifizieren. Dies ermöglicht es, Inzucht innerhalb der Art zu verhindern.

Quelle: *Current Biology*, Bd. 17, S. 1771; BdW 06.11.2007

Was Schmerzmittel ausbremst

Wissenschaftler haben entdeckt, was hinter dem häufig auftretenden Gewöhnungseffekt bei Morphin und ähnlichen Schmerzmitteln steckt: Die Wirkstoffe verursachen die Bildung einer aggressiven Substanz, die Nervenzellen im Rückenmark angreift und zerstört sowie Entzündungen hervorruft. Das führt wiederum dazu, dass mit der Zeit immer mehr Morphin eingenommen werden muss, um den gleichen schmerzstillenden Effekt zu erreichen wie zuvor. Verhindert werden könnte diese Gewöhnung demnach, indem die Produktion des verantwortlichen Stoffs blockiert wird, beispielsweise durch parallel eingenommene Zusatzstoffe, erklären die Forscher. Auf diese Weise könnten die Schmerzmittel – vor allem, wenn sie bei chronischen Schmerzen eingesetzt werden –, niedriger dosiert und länger ohne Nebenwirkungen eingenommen werden. Die Forscher untersuchten die biochemischen Abläufe im Stoffwechsel von Mäusen während einer Schmerztherapie. Dabei stießen sie auf die sehr reaktive Schlüsselsubstanz namens Peroxynitrit. Diese ließ sich direkt mit dem Morphingewöh-

nungseffekt in Verbindung bringen. Der Stoff entsteht im Rückenmark und schädigt dort verschiedene Proteine sowie das Erbgut der Nervenzellen. Zudem sorgt es für eine verstärkte Freisetzung entzündungsfördernder Botenstoffe. Die Forscher suchten daher nach anderen Substanzen, um das Peroxynitrit zu zerstören oder seine Bildung zu verhindern. Eine katalytisch aktive Substanz aus der Klasse der Porphyrine unterband die Wirkung des Peroxynitrits im Stoffwechsel der Mäuse, fanden sie heraus. Die Forscher sehen in ihrer Behandlungsstrategie einen wichtigen Ansatz, auch beim Menschen die Entwicklung von Toleranzen gegen Schmerzmedikamente zu unterdrücken oder hinauszuzögern. Zukünftige Untersuchungen müssten die geeigneten Zusatzstoffe ausfindig machen, die im menschlichen Stoffwechsel das Peroxynitrit ausschalten. Morphin und ähnliche Medikamente aus der Gruppe der Opiate zählen zu den stärksten Schmerzmitteln. Bei längerer Einnahmezeit und höherer Dosierung gewöhnt sich der Körper an die Mittel, so dass die Dosis stetig erhöht werden muss. Die Gefahr der Sucht steigt, ebenso wie die Schwere der Nebenwirkungen, zu denen unter anderem Verstopfung, Atemschwierigkeiten und Übelkeit gehören können. Mit den Zusatzstoffen, die eine Toleranzentwicklung durchbrechen, könnten die Schmerzmittel hingegen in niedriger Dosierung lange und effizient angewandt werden, hoffen die Forscher.

Quelle: *Journal of Clinical Investigation*, Band 117, Seite 3530; BdW 05.11.2007

Gedächtnisstütze aus der Petrischale

Stammzellen können helfen, das Gedächtnis nach einer Gehirnverletzung wieder herzustellen. Das haben Forscher bei Versuchen mit Mäusen gezeigt. Dabei verfügten Tiere mit Hirnschäden, die ihr Gedächtnis beeinträchtigten, bereits drei Monate nach einer Stammzellbehandlung wieder über das gleiche Erinnerungsvermögen wie gesunde Mäuse. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass Stammzellen einen Gedächtnisverlust rückgängig machen können. Verantwortlich für den Effekt sind wahrscheinlich Proteine, die von den neuen Zellen produziert werden. Die Wissenschaftler untersuchten an gesunden Mäusen und an Mäusen mit Schäden am Hippocampus – dem Bereich im Gehirn, der für die Bildung von Erinnerungen zuständig ist –, wie gut Mäuse ihre Umgebung wiedererkennen können. Gesunden Mäusen gelang dies in siebzig Prozent der Fälle, Mäusen mit geschädigtem Gedächtnis nur in vierzig Prozent. Bei den geschädigten Mäusen führte eine Injektion von 200 000 neuronalen Stamm-

zellen dazu, dass die Mäuse schon nach drei Monaten bei der Ortswiedererkennung so gut waren wie ihre gesunden Artgenossen. Unbehandelte Mäuse mit Schäden am Hippocampus hatten nach wie vor ein beeinträchtigtes Gedächtnis. Um die Stammzellen im Mäusehirn verfolgen zu können, hatten die Wissenschaftler diese so verändert, dass sie bei Bestrahlung mit UV-Licht grün erschienen. Die injizierten Stammzellen hatten sich bei den Mäusen im Hippocampus angesammelt. Es hatten sich jedoch nur circa vier Prozent der Zellen zu Nervenzellen weiterentwickelt. Ein einfaches Ersetzen der abgestorbenen Gehirnzellen kann demnach nicht die Ursache für die Verbesserung des Gedächtnisses sein, folgern die Forscher. Die Wissenschaftler vermuten, dass die Stammzellen anfällige und geschädigte Nervenzellen unterstützen, indem sie sie durch die Herstellung nützlicher Proteine, sogenannter Neurotrophine, am Leben und funktionsfähig erhalten. Wenn zusätzliche Neurotrophine tatsächlich der Grund für die Verbesserung des Gedächtnis sein sollten, wäre das ein Ansatzpunkt für neue Medikamente, die die Freisetzung oder Bildung der Proteine unterstützen. Ein Großteil der Stammzellenforschung konzentriert sich darauf, herauszufinden, wie man Stammzellen in andere Zellen, wie Nervenzellen, umwandeln kann. Aber das ist vielleicht gar nicht immer notwendig.

Quelle: *Journal of Neuroscience*, Band 27, Nummer 44; BdW 31.10.2007

Die Reise der HI-Viren

Das Aidsvirus gelangte um 1969 von Afrika über Haiti in die USA, haben amerikanische Forscher mit Hilfe einer Genanalyse nachgewiesen. Demnach geht das am weitesten verbreitete HI-Virus, HIV-1 Gruppe M Subtyp B, in den USA auf nur einen einzigen Vorfahren zurück, der gegen Ende der sechziger Jahre von Haiti aus in die USA kam. Damit gab es das Virus in den USA schon circa zwölf Jahre, bevor die Krankheit Aids dort erstmals beschrieben wurde. Die Wissenschaftler ziehen ihre Schlussfolgerungen aus einer Untersuchung von Blutproben von einigen der ersten Aids-Fälle in den USA, bei denen es sich um Einwanderer aus Haiti handelte. Mit den Daten rekonstruierten sie anschließend Stammbäume für das Virus. Der untersuchte HIV-Stamm war die erste entdeckte Virusvariante und ist der vorherrschende Stamm in Nordamerika und Europa. Das Virus sei schon um 1966 von Afrika nach Haiti gekommen. Die Wissenschaftler hatten Gensequenzen aus Blutproben der ersten Aids-Patienten der USA mit 117 anderen weltweit an Subtyp B erkrankten verglichen. Die statistische Auswer-

tung zeigte eine nahezu hundertprozentige Wahrscheinlichkeit, dass das Virus von Afrika aus über Haiti in die USA gekommen sei. Von dort aus verbreitete es sich explosionsartig auf der ganzen Welt. Da das Virus in Haiti schon früher vorkam als in Nordamerika und Europa, hatte es dort mehr Zeit zum Mutieren. Das erklärt, warum die HIV-Viren auf Haiti vielfältiger sind als in anderen Ländern außerhalb Afrikas. Eine detailliertere Kenntnis des genetischen Aufbaus der verschiedenen HIV-Stämme könnte helfen, einen Impfstoff zu entwickeln. Die größte Schwierigkeit bei der Entwicklung eines Impfschutzes ist jedoch die enorme genetische Flexibilität des Virus.

Quelle: PNAS, DOI:

10.1073/pnas.0705329104; BdW 30.10.2007

Wann Schweiß in die Nase sticht

Ob ein Mensch Schweißgeruch schon in geringer Intensität riechen kann oder nicht, wird hauptsächlich von seinen Genen bestimmt. Dabei prägt besonders ein Erbgutabschnitt, der in einer funktionsfähigen und einer defekten Variante vorkommen kann, die Empfindlichkeit der Nase gegenüber Schweiß, haben Forscher aus den USA und Israel gezeigt. Wer beispielsweise von beiden Eltern funktionsunfähige Kopien des Gens mitbekommen hat, nimmt Schweißgeruch erst wahr, wenn er sehr intensiv ist. Wer in seinem Erbgut hingegen mindestens eine funktionierende Genkopie besitzt, reagiert meist bereits auf Duftspuren. Allerdings ist das Gen namens OR11H7P nicht der einzige Verantwortliche: Auch eine allgemeine genetische Veranlagung sowie Umweltfaktoren beeinflussen die Empfindlichkeit des Geruchssinns. OR11H7P gehört zu einer Familie von mehr als 1 000 Genen, auf denen die Baupläne für sogenannte olfaktorische Rezeptoren gespeichert sind. Dabei handelt es sich um Proteine an den Oberflächen von Sinneszellen in der Nase, die Duftstoffe erkennen und einen Geruchseindruck hervorrufen können. Beim Menschen sind allerdings nur etwa 350 dieser Erbgutabschnitte aktiv, die restlichen sind so verändert, dass sie als inaktiv gelten. Diese Entdeckung, für die 2004 der Nobelpreis für Medizin verliehen wurde, zeigt zwar grundsätzlich, wie der Geruchssinn funktioniert, einige Zusammenhänge lassen sich damit aber nicht erklären. Dazu gehört beispielsweise die Frage, warum einige Menschen extrem empfindliche Nasen haben und andere nicht. Um das zu klären, ließen Forscher 377 Freiwillige an vier verschiedenen Düften – Banane, Eukalyptus, Pfefferminz und Schweiß – schnüffeln und verglichen die Empfindlichkeit der einzelnen Probanden mit ihrer genetischen Veranlagung.

Besonders interessierte die Forscher dabei eine Gruppe von Genen, die sowohl in einer aktiven als auch in einer inaktiven Form vorkommen. Zumindest beim Schweißgeruch gab es einen klaren Zusammenhang, zeigte die Auswertung: Die Probanden, bei denen der Schwellenwert für die Wahrnehmung sehr niedrig war, besaßen mindestens eine funktionsfähige Kopie des Gens OR11H7P. Außerdem entdeckten die Wissenschaftler einen weiteren, bislang allerdings nicht identifizierbaren genetischen Faktor, der die Geruchsempfindlichkeit insgesamt verbesserte. Die Studie habe zwei Dinge gezeigt, schreiben die Forscher. Zum einen lässt sie darauf schließen, dass OR11H7P tatsächlich eine wichtige Rolle bei der Wahrnehmung von Schweißgeruch spielt. Zum anderen demonstriert sie jedoch auch, dass der Geruchssinn extrem komplex ist und neben der genetischen Veranlagung wohl noch eine Reihe weiterer Faktoren die Empfindlichkeit der Nase prägen.

Quelle: PLoS Biology, Bd. 5, Artikel e284; BdW 30.10.2007

Neue Zweifel an Prionhypothese

Prionen sind möglicherweise doch nicht die Erreger von Krankheiten wie BSE oder Creutzfeldt-Jakob. Das schließt ein britisch-amerikanisches Forscherteam aus einer Studie an Mäusen, die mit einer BSE-ähnlichen Krankheit infiziert wurden. Trotz eindeutiger Krankheitszeichen fanden sich in den Gehirnen der Tiere nur geringe Spuren der ungewöhnlich gefalteten Prionproteine, die als alleiniger Auslöser von Prionenerkrankungen gelten. Dennoch war das Hirngewebe in der Lage, weitere Mäuse zu infizieren. Die sonst häufig beobachteten Prionansammlungen im Gehirn erkrankter Tiere wären demnach eher eine Begleiterscheinung der Krankheit als ihr Auslöser. Bei BSE und anderen Prionenerkrankungen bilden sich Löcher in den Gehirnen der betroffenen Tiere, in denen sich typischerweise Ansammlungen des Prionproteins PrP-Sc finden, einer falsch gefalteten Variante eines körpereigenen Eiweißes. Zur Erklärung dieser Symptome wird meist die 1982 von dem US-Biochemiker Stanley Prusiner aufgestellte und 1997 mit dem Nobelpreis ausgezeichnete Prionhypothese herangezogen: Sie besagt, dass nicht Viren, Bakterien oder Pilze die Krankheiten auslösen, sondern dass die Eiweißpartikel selbst die Erreger sind. Allerdings ist diese Hypothese nach Ansicht der vieler Wissenschaftler trotz überzeugender Hinweise bis heute nicht zweifelsfrei bewiesen. Auch die neuen Ergebnisse werfen Zweifel an der These auf. Die Wissenschaftler hatten Mäuse mit der Hamster- und der Menschen-

variante einer Prionenerkrankung infiziert, die daraufhin die typischen Krankheitsanzeichen entwickelten und schließlich starben. In ihren Gehirnen fand sich jedoch kein oder eine so geringe Menge an PrP-Sc, dass dieses Eiweiß unmöglich der alleinige Auslöser der Krankheit gewesen sein könne, erklären die Forscher. Wurde das Hirngewebe zudem gesunden Mäusen injiziert, entwickelten diese ebenfalls trotz des mangelnden PrP-Scs die Krankheit. Das eigentlich infektiöse Agens müsse demnach etwas anderes sein, so ihre Schlussfolgerung. Infrage käme dabei beispielsweise eine dritte Variante des Prionproteins, die bisher noch nicht identifiziert werden konnte. Doch auch unbekannte Viren sind als Erreger denkbar, eine Idee, die bereits von mehreren Forschergruppen verfolgt wird. Die Ergebnisse könnten zudem Konsequenzen für die Zuverlässigkeit der gängigen BSE-Tests haben, die auf dem Aufspüren von Prionansammlungen in den Hirnen geschlachteter Rinder basieren, schreibt das Wissenschaftsmagazin „New Scientist“ – schließlich würden diese Tests in Fällen von Prionenerkrankungen ohne große Mengen Prionprotein im Gehirn nicht anschlagen. Trotzdem sollten die Tests nicht grundsätzlich infrage gestellt werden, da sie die überwiegende Mehrheit der Fälle korrekt identifizierten, betonen die Forscher.

Quelle: New Scientist, 27.10.2007, Seite 10; Journal of Biological Chemistry, DOI: 10.1074/jbc.M704329200; BdW 25.10.2007

Haarnadel gegen HIV

Nach einer HIV-Infektion schleust das Virus sein Erbmaterial in das der Wirtszelle ein. Diese stellt Kopien her, liest die Viren-RNA ab und stellt nach diesem Bauplan Virenproteine her. Komplette Viren werden freigesetzt und befallen die nächsten Zellen. Wissenschaftler haben jetzt einen potenziellen Ausgangspunkt für einen neuen Wirkstoff entwickelt, der in diesen todbringenden Zyklus eingreifen soll. Dabei handelt es sich um ein haarnadelförmiges Molekül, das die räumliche Struktur eines wichtigen viralen Proteins nachahmt und so das Ausschleusen der Virus-RNA aus dem Zellkern stoppen soll. Ein wichtiger Schritt im Lebenszyklus von HIV – und neuer interessanter Ansatzpunkt für eine Therapie: Die im Kern der Wirtszelle nachgebaute Viren-RNA wird als langer Strang durch die Poren der Kernmembran in das Zytoplasma der Zelle hinaus transportiert, um dort in Proteine übersetzt oder in eine Virenhülle verpackt zu werden. Dieses Ausschleusen ist ein aktiver Vorgang, der durch ein bestimmtes, Rev genanntes Virenprotein vermittelt wird. Viele Einheiten von Rev müssen dazu an eine Bindestelle

auf der Viren-RNA binden, die Rev Responsive Element (RRE) genannt wird. Die Suche nach effektivem RRE-bindenden Inhibitor blieb bisher allerdings erfolglos. Es ist eine kleine argininreiche Domäne aus 17 Aminosäuren, die das Rev-Protein seine Bindestelle, eine Furche auf der RNA, erkennen lässt. An die RNA gebunden, weist diese Domäne eine helikale Form auf. Dieses Proteinstückchen wollten die Forscher nachbauen, um die Bindung von Rev an RRE zu stören. Sie stellten ein Peptidmimetikum her, ein Molekül, das die Struktur des gewünschten Peptids nachahmt. Wie die Gruppe bereits zuvor zeigen konnte, lassen sich alpha-helikale Peptide durch eine sogenannte beta-Haarnadelschleife gut nachahmen. An das robuste Gerüst der „Haarnadel“ werden Seitengruppen so angeknüpft, dass sie die für eine molekulare Erkennung wichtigen Atomgruppierungen räumlich genauso präsentieren wie das beim Vorbild, dem helikalen Peptid, der Fall ist. In mehreren Screeningstufen wurde, ausgehend von einer kleinen Familie zyklischer Haarnadel-Peptidmimetika, nach und nach eine Struktur entwickelt, die fest und recht spezifisch an RRE bindet und in der Lage ist, das Rev-Protein aus Rev-RRE-Komplexen zu verdrängen. Haarnadel-Peptidmimetika sind eine viel versprechende neue Wirkstoffklasse, man hofft dass sich auf dieser Basis ein Wirkstoff entwickeln lässt, der sich für die HIV-Therapie eignet.

Quelle: *Angewandte Chemie*, doi: 10.1002/ange.200702801; IdW 29.10.2007

Gewichtige Daten

Etwa 60 Prozent aller Menschen weltweit haben ein zu hohes Körpergewicht, knapp 30 Prozent sind sogar krankhaft fettleibig. Das hat ein internationales Forscherteam in einer Untersuchung von fast 200 000 Männern und Frauen aus 63 Ländern herausgefunden. Untersucht wurden dabei Personen aus zufällig ausgewählten städtischen und ländlichen Gebieten von ihrem jeweiligen Hausarzt. Für die Studie nahmen die Wissenschaftler Daten wie Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht und Bauchumfang auf und untersuchten, ob die untersuchten Personen unter Herzkrankheiten oder Diabetes litten. Aus Größe und Gewicht berechneten sie zudem den Body Mass Index (BMI), indem sie das Gewicht durch die Körpergröße zum Quadrat teilten. Als normalgewichtig gelten Menschen mit einem BMI zwischen 19 und 25. Der Bauchumfang wurde zwischen dem unteren Rippenbogen und der Oberkante des Hüftknochens gemessen und lässt auf den Anteil des sogenannten viszeralen Fettgewebes am Gesamtkörpergewicht schließen – jenes Fettge-

webes also, das sich als Fettdepots im Bauchraum und an inneren Organen festsetzt. Es gilt als Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Diabetes. Insgesamt wurden 69 409 Männer und 98 750 Frauen im Alter zwischen 18 und 80 Jahren aus 63 Ländern von fünf Kontinenten untersucht. Bei den Männern hatten 40 Prozent einen BMI zwischen 25 und 30 Kilogramm pro Quadratmeter, gelten also als übergewichtig. 24 Prozent hatten einen BMI von über 30 und sind somit stark übergewichtig beziehungsweise fettleibig. 56 Prozent der Männer hatten einen Bauchumfang von mehr als 94 Zentimetern und damit zu viel viszerales Fett und ein erhöhtes Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Diabetes. 16 Prozent der Studienteilnehmer hatten Herzkrankheiten und 13 Prozent litten unter Diabetes. Bei den Frauen waren nach dem errechneten BMI 30 Prozent übergewichtig und 27 Prozent fettleibig. 71 Prozent hatten einen Bauchumfang von über 80 Zentimetern und somit zu viel Fettgewebe im Unterleib. Bei 13 Prozent der Studienteilnehmerinnen wurden Herzerkrankungen festgestellt und 11 Prozent hatten Diabetes. Die Forscher rufen alle Regierungen dazu auf, mehr Vorsorgemaßnahmen zu ergreifen, die Bevölkerung stärker für körperlichen Aktivitäten und Bewegung zu begeistern und sie zu einer gesünderen Ernährung anzuhalten. Sie befürchten, dass ansonsten Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Diabetes noch mehr zunehmen werden.

Quelle: *Circulation*, Bd. 116, Ausgabe 17; BdW 23.10.2007

Kein Zucker fürs Gehirn

Im Gehirn arbeiten gleich mehrere Kontrollsysteme unter der Aufsicht von Wächterproteinen daran, das Anhäufen von Zuckervorräten in den Nervenzellen zu verhindern. Das haben spanische Wissenschaftler entdeckt. Diese mehrfache Absicherung ist überlebenswichtig für die Gehirnzellen: Während Zucker in seiner Speicherform, dem Glykogen, für die meisten Körperzellen nämlich eine willkommene Energiereserve ist, ist er für Gehirnzellen tödlich. Aus diesem Grund muss die Zelle ständig dafür sorgen, dass die Maschinerie für die Herstellung des Kohlenhydratspeichers ausgeschaltet bleibt und nicht versehentlich aktiviert wird. Auf die aufwendige Steuerung der Glykogenproduktion stießen die Forscher, als sie eine seltene Erbkrankheit namens Lafora-Syndrom in einem Mausmodell untersuchten. Bei dieser Krankheit sammeln sich kleine Glykogenklümpchen in den Gehirnzellen an und setzen diese nach und nach außer Gefecht. Die Folgen für den Organismus sind verheerend: Zuerst leiden die

Betroffenen unter epileptischen Anfällen, später dann an Bewegungsstörungen und fortschreitender Demenz. Die Krankheit ist tödlich, eine Heilung gibt es nicht. Zwar ist schon länger bekannt, dass ein Defekt in einem von zwei Genen die Erkrankung auslöst, jedoch nicht, welche Konsequenzen innerhalb der Zelle diese Defekte haben. Einen Teil dieser Frage konnten die Spanier jetzt aufklären: Die beiden Eiweiße, deren Baupläne auf den betreffenden Genen gespeichert sind, sind sozusagen die Aufseher über die anderen Sicherungsmaßnahmen, die das Anlaufen der Glykogenproduktion verhindern. Sie arbeiten so eng zusammen, dass ein Defekt in einem dieser Proteine das andere mit außer Gefecht setzt und sich dadurch die strikte Kontrolle lockert. Als Folge davon werden verschiedene Reaktionen angestoßen, an deren Ende die Bildung der Glykogenkörnchen und schließlich der Tod der Nervenzelle steht. Rätselhaft bleibe allerdings, warum es die Glykogen-Maschinerie in den Nervenzellen überhaupt noch gibt, erklären die Wissenschaftler. Bei den tödlichen Konsequenzen einer Fehlfunktion hätte sie ihrer Ansicht nach eigentlich im Lauf der Evolution verschwinden müssen. Sie vermuten jedoch, dass es möglicherweise noch eine bislang unbekannt zweite Funktion der beteiligten Proteine geben könnte, oder dass die Struktur der zuständigen Gene eine Ausmerzung nicht erlaubt. Die neuen Erkenntnisse könnten nun jedoch nicht nur helfen, eine Therapie für das Lafora-Syndrom zu entwickeln, sondern auch andere Krankheiten mit Störungen im Glykogenstoffwechsel besser zu verstehen.

Quelle: *Nature Neuroscience*, DOI: 10.1038/nn1998; BdW 22.10.2007

Influenza mag es kalt und trocken

Grippeviren verbreiten sich in trockener kalter Winterluft besser als unter warmen und feuchten Bedingungen. Das haben Forscher mithilfe von Meerschweinchen gezeigt, die sie unter unterschiedlichen Bedingungen mit Influenza-A-Viren infiziert hatten – dem Virus also, das auch beim Menschen die echte Grippe hervorruft. Der Einfluss von Temperatur und Luftfeuchtigkeit ist damit zumindest ein Teil der Erklärung für das jahreszeitenabhängige Muster, in dem Grippewellen fast immer auftreten, so die Forscher. Wie genau der Effekt zustande kommt, können sie allerdings noch nicht sagen. Sowohl auf der Nord- als auch auf der Südhalbkugel der Erde treten Infektionen mit dem Influenza-Virus vom Herbst bis in den späten Winter häufiger auf als zu allen anderen Jahreszeiten. Warum das so ist, ist bislang nicht

eindeutig geklärt. Diskutiert werden unter anderem Faktoren wie Veränderungen des Immunsystems, die in der dunklen Jahreszeit beispielsweise durch das Schlafhormon Melatonin oder einen Mangel an Vitamin D verursacht werden. Auch Verhaltensmuster kämen als Ursache infrage, da sich Menschen im Winter beispielsweise häufiger in engem Kontakt mit anderen in geschlossenen Räumen aufhalten. Ebenfalls als mögliche Einflussgrößen galten bereits seit längerem Umweltfaktoren wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit. Diese beiden Größen spielen tatsächlich eine wesentliche Rolle für die Verbreitung der Tröpfcheninfektion, konnten die Wissenschaftler nun zeigen: Meerschweinchen steckten sich bei 5 Grad Celsius eher bei ihren infizierten Artgenossen an als bei 20 oder 30 Grad. Auch eine niedrige Luftfeuchtigkeit von 20 Prozent begünstigte die Ausbreitung der Viren, während es bei Luftfeuchtigkeiten von über 80 Prozent überhaupt keine Ansteckungen mehr gab. Für diesen Effekt gibt es mehrere mögliche Erklärungen, schreiben die Forscher. So trocknet trockene Luft die Schleimhäute der Atemwege aus und verursacht dabei möglicherweise kleine Schäden, die den Viren das Eindringen erleichtern. Es gebe jedoch auch Hinweise darauf, dass sich die Viren bei hoher Feuchtigkeit schneller zersetzen. Zudem bleiben die Tröpfchen, mit denen die Erreger transportiert werden, in trockener Luft feiner verteilt als in feuchter. Die Kälte könnte außerdem dazu führen, dass sich der Nasenschleim verdickt und die Schleimhäute nicht mehr so effizient schützen kann. Das Immunsystem der Tiere war durch die niedrige Temperatur jedenfalls nicht beeinträchtigt, erklären die Wissenschaftler. Sie wollen nun mit Hilfe eines Datenvergleichs überprüfen, ob sich der Verlauf von Grippewellen beim Menschen anhand von Wetterdaten verfolgen lässt.

Quelle: *PLoS Pathogens*, Bd. 3, Nr. 10, Artikel e151; *BdW* 19.10.2007

Was Neandertaler und *Homo sapiens* gemeinsam haben

Der Neandertaler besaß wahrscheinlich die gleiche Fähigkeit, eine Sprache zu entwickeln, wie der moderne Mensch: Bei beiden ist das einzige bislang bekannte für die Sprache zuständige Gen, ein Erbgutabschnitt namens FOXP2, identisch. Das schließt ein europäisches Forscherteam aus einem Genvergleich von Neandertaler und Homo

sapiens. Bislang waren die Forscher davon ausgegangen, dass nur der Mensch diese besondere Form von FOXP2 besitzt. Die neuen Ergebnisse zeigten nun jedoch, dass das Sprachgen wohl schon beim gemeinsamen Vorfahren von Neandertaler und Mensch, dem Homo heidelbergensis, vor rund 300 000 bis 400 000 Jahren vorkam. Dass Neandertaler und Mensch das Sprachgen später durch Geschlechtsverkehr ausgetauscht hätten, sei hingegen sehr unwahrscheinlich, erklären die Forscher. FOXP2 ist das einzige bislang beim Menschen bekannte Gen, das direkt die Sprachfähigkeit beeinflusst. Bei einem Defekt führt es zu Sprachstörungen bei den Betroffenen. Zwar kommt das Gen unter anderem auch beim Schimpansen und der Maus vor. Diese Genvarianten unterscheiden sich jedoch an zwei beziehungsweise drei charakteristischen Stellen von der des Menschen. Bislang dachte man, dass dieses Gen für den Menschen einzigartig ist. Überraschenderweise zeigte der Vergleich der Erbgutabschnitte jedoch, dass das FOXP2-Gen bei Neandertaler und Mensch identisch ist. Was FOXP2 angeht, spricht nichts dagegen, dass der Neandertaler sprechen konnte, lautet das Fazit dieser Studie. Höchstwahrscheinlich gebe es aber noch viele andere Gene, die mit der Sprache zu tun haben, beim Menschen aber noch nicht bekannt sind. Die Wissenschaftler hoffen nun mit der kompletten Sequenzierung des Neandertaler-Erbguts weiteres Licht auf die Sprachfähigkeit und auch andere Eigenschaften des Neandertalers werfen zu können. In einem Folgeprojekt wollen die Forscher bis Ende nächsten Jahres 65 Prozent des Neandertaler-Genoms entschlüsselt haben. Bislang haben die Forscher von den insgesamt analysierten 3,5 Milliarden Erbgutbuchstaben, den Basenpaaren, rund 100 000 bestimmt. Durch frühere Studien an der sogenannten mitochondrialen DNA von Neandertaler und Mensch hatten die Forscher bereits gezeigt, dass beide Arten sich mit ziemlicher Sicherheit nicht vermischt haben. Für die aktuelle Untersuchung nahmen sie die Y-Chromosomen ins Visier. Beim Neandertaler sah man nur die schimpansenähnlichen Merkmale. Sex zwischen Neandertaler und Mensch, der zu gemeinsamen Nachkommen führte, schließen die Forscher auf Grund ihrer Studien aus.

Quelle: *Current Biology*, DOI:10.1016/j.cub.2007.10.008; *BdW* 19.10.2007

Transportmechanismus von Schlüsselproteinen in der Immunantwort aufgeklärt

Forscher konnten erstmals zeigen, wie der Transport von Schlüsselproteinen der Immunantwort an ihren Wirkort an der Zelloberfläche reguliert wird. Um eine Virusinfektion erfolgreich zu bekämpfen, muss das menschliche Immunsystem infizierte Zellen aufspüren. Im Allgemeinen vermehren sich Viren aber im Zellinneren und sind so vor den im Blut zirkulierenden Antikörpern und den Immunzellen, den Lymphozyten, verborgen. Das Aufspüren der verborgenen Viren ist die Aufgabe von Transportproteinen, sogenannten MHC (Major Histocompatibility Complex oder Haupthistokompatibilitätskomplex)-Klasse-I-Molekülen: Sie bringen Proteinfragmente (Peptide) aus dem Zellinneren an die Oberfläche, wo sie dann von den Lymphozyten als Virenbestandteile erkannt werden können; die virusinfizierte Zelle wird dann beseitigt. Bislang ungelöst war die Frage, wie der Transport der MHC-Klasse-I-Moleküle an die Zelloberfläche reguliert wird und wie der Transport ausgelöst wird, wenn die Transportmoleküle „Abfall-Peptide“ aufgenommen haben. Die Wissenschaftler konnten nun zeigen, dass die MHC-Klasse-I-Moleküle durch einen Mechanismus reguliert werden, wie er auch z. B. den Transport von Hormonen oder Zelloberflächenrezeptoren aus dem Zellinneren steuert: Die MHC-Klasse-I-Moleküle verlassen in Transportbläschen, den Vesikeln, den Ort ihrer Entstehung innerhalb der Zelle, das Endoplasmatische Retikulum (ER). Unabhängig von ihrem Beladungszustand mit Peptiden werden sie zunächst an eine Zwischenstation, den Golgi-Apparat, transportiert, wo sie einer „Qualitätskontrolle“ unterworfen werden. Fehlt ein gebundenes Peptidfragment und dem MHC-Klasse-I-Molekül daher die strukturelle Festigkeit, so werden sie wieder zurück ins ER geschickt und bei der nächsten Runde aufs Neue überprüft. Erst mit fest gebundenem Peptid können sie den Weg an die Zelloberfläche antreten. Die gängige Lehrmeinung war bisher, dass MHC-Klasse-I-Moleküle das ER gar nicht verlassen können, bis sie Peptide gebunden haben, weshalb die Kontrolle ihres Beladungszustandes bislang völlig unverstanden war. Für ihre Untersuchungen verwendeten die Wissenschaftler Zellkulturen von menschlichen und Hamster-Lymphozyten. Neben der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung einzelner

Zellen zur Verteilung unbeladener MHC-Klasse-I-Moleküle setzten die Forscher eine neuartige Methode zur *in-vitro*-Isolierung von intrazellulären Transportvesikeln ein, die sie auf den Peptid-Beladungszustand der darin enthaltenen MHC-Klasse-I-Moleküle überprüften.

Quelle: *J. Biol. Chem.*,
DOI:10.1074/jbc.M701721200; *IdW*
18.10.2007

Wie man Viren fängt

In Zukunft könnten winzige Fallen helfen, Virusinfektionen wie HIV in Schach zu halten. Die Idee dahinter: Da Viren zur Vermehrung die Vervielfältigungsmaschinerie von Körperzellen brauchen, wäre ihr Siegeszug gestoppt, wenn sie statt in normale Zellen in zellartige Gebilde gelockt würden, in denen es genau diese Maschinerie nicht gibt. Als derartige Sackgassen kämen etwa rote Blutkörperchen infrage, die von Natur aus keinen Zellkern besitzen, oder auch künstlich erzeugte Nanokügelchen mit maßgeschneiderten Oberflächen. Derzeit arbeiten mehrere Arbeitsgruppen an solchen Virusfallen. Der Knackpunkt einer jeden potenziellen Falle ist ihre Oberfläche: Damit ein Virus mithilfe bestimmter Schlüsselproteine daran andocken und anschließend eindringen kann, muss sie mit dem passenden Schloss ausgestattet sein. Rote Blutkörperchen mit solchen Erkennungsstellen zu versehen, ist bei Mäusen bereits gelungen. Ein Forscherteam hat die Tiere dazu genetisch so verändert, dass ihre roten Blutzellen einen ganz bestimmten Rezeptor namens CAR auf der Oberfläche trugen. Dieses Schlossprotein kommt zwar auf vielen Körperzellen vor, normalerweise jedoch nicht auf roten Blutkörperchen. Es scheint wichtig für die embryonale Entwicklung zu sein, dient aber auch Erkältungsviren als Erkennungs- und Eintrittsstelle in die Zellen. Die Strategie zahlte sich aus: Im Labor reduzierten die Virusfallen die Menge solcher Erkältungserreger innerhalb von zehn Minuten

um 90 Prozent, und auch in lebenden Mäusen hatten die veränderten Zellen nach 72 Stunden 90 Prozent der Erreger abgefangen. Allerdings sei es schwierig, einen solchen Ansatz auf den Menschen zu übertragen, schränken die Wissenschaftler ein. Für vielversprechender halten sie synthetische Fallen, vor allem Nanopartikel, die mit den gleichen Rezeptoren ausgestattet sind. Hier müsse jedoch zuerst sichergestellt werden, dass die winzigen Kügelchen keine unerwünschten Nebenwirkungen verursachen. Eine weitere Variante verfolgt ein anderes Forscherteam: Anstatt alle roten Blutkörperchen zu verändern, entnehmen die Forscher nur einige, modifizieren deren Oberfläche und spritzen sie zurück in den Körper. Auf diese Weise hoffen sie unter anderem, die Virenanzahl bei HIV-Infektionen reduzieren zu können. Praktische Anwendungen werden allerdings noch Jahre auf sich warten lassen. Auch ist nicht zu erwarten, dass die Fallen alleine ausreichen werden, um aggressive Infektionen vollständig zu heilen. Sie können jedoch die Virusmenge stark reduzieren, so dass das Immunsystem mit dem Rest alleine fertig wird, so die Hoffnung. Die größte Stärke dieses Ansatzes liege jedoch darin, dass eine Resistenzbildung praktisch undenkbar ist: Sobald die Viren nämlich lernen, den auf die Falle gesetzten Rezeptor zu vermeiden, können sie auch die Körperzellen nicht mehr infizieren.

Quelle: *New Scientist*, 20. Oktober, Seite 43;
BdW 18.10.2007

Auf dem Weg zur Malaria-Impfung

Ein Impfstoff gegen die Tropenkrankheit Malaria hat in einer klinischen Studie eine wichtige Hürde genommen: Die Substanz namens RTS,S zeigte bei afrikanischen Kindern keine Nebenwirkungen und rief eine deutliche Immunantwort hervor. Letzteres ist ein Zeichen, dass sich das Immunsystem gegen den Krankheitserreger, den Parasiten *Plasmodium falciparum*, gewappnet hat. Das zuständige internationale Mediziner-

team strebt nun in einer weiteren klinischen Studie an, die Wirksamkeit der Impfung zweifelsfrei zu belegen. Bislang gibt es keine Impfung gegen die Malaria, mit der sich jedes Jahr mehrere hundert Millionen Menschen infizieren. Die aktuelle Studie wurde von der Bill-und-Melinda-Gates-Stiftung unterstützt. Impfstoffentwickler ist der Pharmakonzern GlaxoSmithKline, der bis zum Jahr 2011 einen Impfstoff auf den Markt bringen will. Die Forscher impften in ihrer Studie 214 Kleinkinder in Mosambik mehrmals in den ersten 18 Lebenswochen. Ein Teil der Kinder erhielt den Malaria-Testimpfstoff, ein anderer Teil einen Standardimpfstoff gegen die Gelbsuchtvariante Hepatitis-B. Alle Probanden erhielten Routineimpfungen für Kleinkinder etwa gegen Diphtherie, Tetanus oder Polio. Im Beobachtungszeitraum von sechs Monaten konnten die Forscher keine Nebenwirkungen des Malaria-Impfstoffs entdecken. Damit bescheinigen sie der Impfung eine gute Verträglichkeit. Blutproben zeigten zudem, dass sich Antikörper gegen den Parasiten gebildet hatten. Im Studienverlauf erkrankten 68 Kleinkinder an Malaria: 22 Kinder trotz Malariaimpfung, 46 Kinder in der Kontrollgruppe ohne Malariaimpfung. In einer vorläufigen Berechnung bestimmen die Forscher daraus die Wirksamkeit des Impfstoffs auf 65 Prozent im Studienzeitraum. In einer sogenannten klinischen Studie der Phase III wollen die Forscher nun die Wirksamkeit der Impfung für eine Zulassung belegen. Dazu soll der Stoff gegen Ende des Jahres 2008 in mehreren afrikanischen Ländern an Testpersonen ausgegeben werden. Die Anophelesmücke überträgt den Parasiten durch Mückenstiche von bereits infizierten Menschen auf gesunde. Kleine Kinder haben dabei ein besonders hohes Risiko, an Malaria zu erkranken. Nach Angaben des Impfstoffherstellers GlaxoSmithKline sind bereits 300 Millionen US-Dollar in die Entwicklung von RTS,S geflossen.

Quelle: *Lancet*, DOI: 10.1016/S0140-6736(07)61542-6; *BdW* 18.10.2007

gefördert durch:



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

NGFN

Nationales
Genomforschungsnetz

Impressum

GenomXPress Sonderausgabe · Dezember 2007

Herausgeber

Das Projektkomitee des
Nationalen Genomforschungsnetzes (NGFN)

Redaktion

Dr. Susanne Dell · Helga Frankenstein
Dr. Olaf Krüger · Britta Paul · Andrea Suhr
Projektmanagement NGFN
Heinrich-Konen-Straße 1 · 53227 Bonn
Tel 0228-3821-0

Redaktionelle Unterstützung

Der Inhalt von namentlich gezeichneten Artikeln
liegt in Verantwortung des jeweiligen Autors.

ISSN 1617-562X

Dieser Newsletter wird aus Mitteln des BMBF gefördert.
Layout & Satz: Dirk Biermann, biermann@potsdam.de
Druck: GS Druck und Medien GmbH Potsdam

