

## Diagnostische Genchips

# Eine Option mit großem Potenzial

H. Funke

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Universität Münster  
(Leiter: Prof. Dr. G. Assmann)

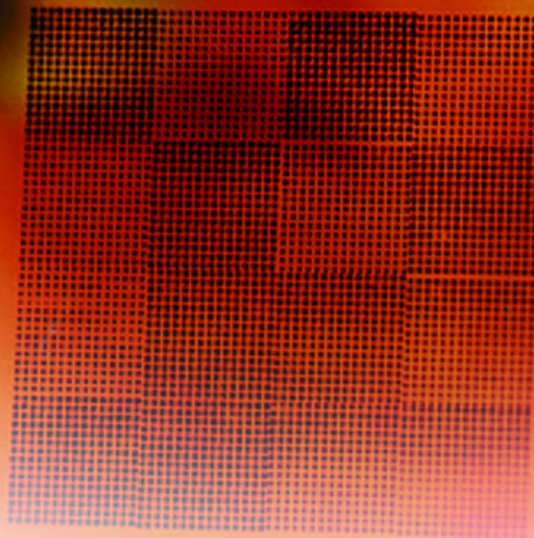


Bild: German Human Genome Project, Scientific Coordinating Committee (SCC), Berlin

*Mit der Entwicklung der Genchips ist die massiv parallele Analyse individuenbezogener genetischer Charakteristika möglich geworden. Dabei erfassen so genannte SNP-Chips (SNP = „single nucleotide polymorphism“) gleichzeitig die Existenz tausender genetischer Varianten. Die Herausforderung an die medizinische Forschung auf diesem Gebiet liegt darin, diese vielen Daten in einer sinnvollen Weise zu interpretieren. Mithilfe von Genexpressionschips lassen sich in der Diagnostik vor allem Istzustände beurteilen. Gegenwärtig werden sie überwiegend zur Verbesserung der Klassifikation von Tumorerkrankungen genutzt. Ihr Potenzial geht jedoch weit darüber hinaus und schließt eine Rolle bei der Früherkennung von Krankheiten ebenso ein wie eine verbesserte Therapiekontrolle. In der komplexen Genese von Volkskrankheiten, die als Ergebnis vielfältiger Interaktionen von Genvarianten miteinander und mit Umwelt- und Lebensführungsfaktoren entstehen, ist das RNA-Expressionsprofil ein Zwischenergebnis dieser Wechselwirkungen. Daher können wahrscheinlich gerade diese Erkrankungen von der kombinierten Anwendung von SNP-Chips und Expressionschips in besonderer Weise profitieren.*

**S**owohl in medizinischen Fachpublikationen als auch in der Laienpresse nehmen Berichte über neue Entwicklungen bei Genchips in letzter Zeit einen großen Raum ein. Das Spektrum der Berichterstattung über diese Technologie reicht dabei von einer Verklärung als neuer Heilsbringer bis hin zur Verurteilung als Werkzeug zur Schaffung des gläsernen Menschen.

### ■ Was sind Genchips?

Charakteristikum der Genchip-technologie ist die massenhafte simultane Durchführung von Hybridisierungsreaktionen an der Oberfläche einer Festphase. Bei diesen Hybridisierungsreaktionen bilden

einzelsträngige, an der Oberfläche der Chips immobilisierte DNA-Moleküle Doppelstränge mit DNA- oder RNA-Molekülen, die in der Flüssigkeit, mit der ein solcher Chip inkubiert wird, vorhanden sind. Voraussetzung dafür ist, dass Bindungspartner zueinander komplementär sind, also eine Watson-Crick-Basenpaarung miteinander eingehen können. Nach Entfernen der flüssigen Phase bleiben die geformten Doppelstränge an der Festphase zurück und können dort nach Art und Menge vermessen werden.

Der technische Fortschritt der Genchips gegenüber den bisher üblichen Blotverfahren (Southern, Northern, Dot) besteht darin, dass auf

einer sehr kleinen Fläche von etwa 1,5 cm<sup>2</sup> bis zu 500 000 verschiedene DNAs räumlich sicher voneinander unterscheidbar aufgebracht werden können. Jede dieser 500 000 Mikroflächen enthält ihrerseits eine hohe Zahl identischer DNA-Moleküle (hoher attomol- bis niedriger femtomol-Bereich). Da bekannt ist, an welcher Stelle auf dem Chip welche, für bestimmte Gene spezifische DNA-Fragmente lokalisiert sind, erlaubt die Analyse der Hybridbildung eine Aussage darüber, welche mRNA-Moleküle in den Testzellen exprimiert werden. Wird die Zahl der an die Festphase gebundenen Moleküle deutlich größer gewählt, als die Zahl der entsprechenden Moleküle in der Hybridisierungslösung, ist darüber hinaus eine quantitative Auswertung möglich.

Die Zahl der gebildeten Hybride wird in der Regel fluorimetrisch erfasst. Dazu werden die in die Hybridisierungsreaktion eingesetzten RNAs oder cDNAs („copy DNA“) in der Regel mit Kopplermolekülen versehen, über welche die Fluoreszenzmarkierung erfolgt. Anschließend werden die Fluoreszenzsignale auf den Chips mit einem konfokalen Hochleistungs-Laserscanner ausgelesen (Abb. 1).

## ■ Welche Arten gibt es?

Heute wird der Begriff Genchip als ein Oberbegriff für jede Art von DNA-Diagnostik benutzt, die an einer Festphase abläuft und eine Vielzahl von Parametern gleichzeitig testet. Der Genchip ist somit die aktuelle technische Plattform für die multiparametrische Gendiagnostik. Man unterscheidet Resequenzierungschips, Polymorphismus-Chips und Genexpressionschips. Einige Autoren zählen auch die Protein-chips in diese Kategorie.

### Resequenzierungschips

Resequenzierungschips prüfen, ob ein Gen mit bekannter Sequenz Abweichungen von der Wildtypsequenz aufweist. Da die Präzision dieses Verfahrens geringer ist, als die herkömmlicher Sequenzierungsmethoden, kommt ihm nur in solchen Fällen eine gewisse Bedeutung zu, in denen durch massenhafte Sequenzierung desselben Gens Polymorphismen aufgespürt werden sollen. Für die Krankenversorgung hat dieses Verfahren momentan keine Bedeutung, weil der Ausschluss einer Mutation nicht mit hinreichender Sicherheit erfolgen kann.

### SNP-Chips

Mit SNP-Chips (SNPs = „single nucleotide polymorphisms“) werden Genpolymorphismen analysiert. Das Detektionsprinzip basiert auf einer allelselektiven Hybridisierung. Die Genabschnitte, die den Polymorphismus enthalten, werden zunächst mithilfe der Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“ = PCR) amplifiziert. Anschließend wird das PCR-Produkt an die Oberfläche eines SNP-Chips hybridisiert. Die Chipoberfläche enthält zwei verschiedene DNA-Sonden – entweder vollständig komplementär zur Wildtypsequenz oder zur mutanten Sequenz. Bindet das PCR-Produkt nur an eine der beiden DNA-Sonden, so liegt der entsprechende Genotyp in homozygoter Form vor. Sind dagegen Bindungen an beiden Sonden zu beobachten, ist der untersuchte Polymorphismus heterozygot.

Für Screeningzwecke geeignete Verfahren erlauben heute die simultane Abfrage von mehreren tausend

Polymorphismen. Eine Anwendung in der klinischen Routinediagnostik setzt voraus, dass die hier eingesetzten Verfahren eine nahezu 100%ige Sensitivität und Spezifität aufweisen. Dies begrenzt die Zahl der mit dieser Technik in einem Analysegang ermittelbaren Polymorphismen derzeit auf etwa 50. Die sequenzielle Anwendung mehrerer solcher Chips, die Entwicklung von Modifikationen des Verfahrens und die Möglichkeit des Einsatzes von Robotik erlauben jedoch die Bestimmung sehr großer Mengen von Polymorphismen in der Patienten-DNA innerhalb sehr kurzer Zeit.

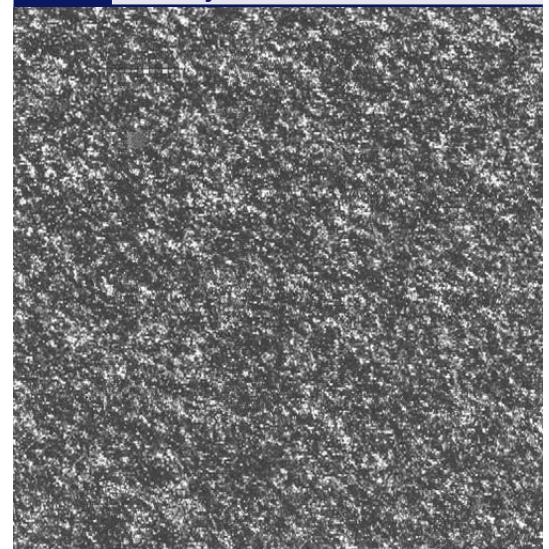
Mit diesem enormen Fortschritt in der technischen Entwicklung von Detektionssystemen für DNA-Polymorphismen konnte die Fortentwicklung auf der medizinisch-interpretatorischen Seite nicht standhalten. Heute gibt es bereits für eine nicht mehr überschaubare Zahl von Polymorphismen Berichte in der medizinischen Fachliteratur, welche die Existenz dieser oder jener Assoziationen von Polymorphismen mit Erkrankungsrisiken reklamieren. Blickt man heute auf die zahllosen Berichte über solche Zusammenhänge aus den 80er und 90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts zurück, so fällt auf, dass nicht mehr als eine Handvoll dieser SNPs heute eine bescheidene Bedeutung in der klinischen Medizin erlangt haben.

Die Gründe für dieses Versagen reichen von mangelndem technischen Vermögen über verschiedene Formen des Selektionsbias bis hin zu den in vielen Studien zu niedrig gewählten Fallzahlen. Wir wissen heute, dass die meisten monogenen Krankheiten durch eine Vielzahl verschiedener Defekte desselben Gens hervorgerufen werden. Es ist eher unwahrscheinlich, dass ein frequenter SNP in einem Kopplungsgleichgewicht mit der Mehrzahl oder zumindest einer großen Zahl dieser krankheitsverursachenden Mutationen steht. Dass SNPs als indirekte Krankheitsmarker eine Rolle spielen, scheidet damit – abgesehen von Einzelfällen – weitgehend aus.

Dennoch kommt den SNPs eine zentrale Rolle bei der individuellen Disposition zu Volkskrankheiten zu.

Geht man von einem Modell aus, bei dem SNPs nicht als indirekte Marker für mono- oder oligogen verursachte Krankheiten fungieren, sondern die SNPs selbst durch eine – wenn auch nur gering gradige – Veränderung der biochemischen Funktion unmittelbar am Krankheitsprozess beteiligt sind, wird deutlich, dass ein Versuch, einzelne Polymorphismen mit einem Erkrankungsrisiko zu assoziieren schon deshalb schwierig ist, weil der von dem SNP ausgehende Einfluss auf die Formierung des klinischen Krankheitsbildes in der Regel sehr klein ist. Selbst in Fällen, in denen ein solcher Einfluss in verschiedensten Populationen reproduzierbar nachgewiesen wird, muss die Frage erlaubt sein,

**Abb. 1** Genchip nach Hybridisierung mit mRNA aus humanen weißen Leukozyten



Der Chip des Typs U95A der Firma Affymetrix besteht aus etwa 480 000 Feldern, auf denen verschiedene Oligonukleotide synthetisiert wurden, die 12 000 Gene repräsentieren. Je 40 Oligonukleotide weisen Sequenzen auf, die für dasselbe Gen spezifisch sind – davon bilden 20 einen perfekten Gegenstrang für die mRNA. Die 20 Übrigen weisen in der zentralen Position eine absichtlich gesetzte Sequenzabweichung auf, die zu einer Misspaarung führt. Diese Misspaarungen werden zur Detektion unspezifisch bindender RNAs genutzt. Je heller ein Fleck ist, desto mehr fluoreszierend markierte (Leukozyten)-RNA ist an die jeweilige Stelle gebunden. Da bekannt ist, welche für welches Gen spezifische Sequenz an jede bestimmte Stelle des Chips gebunden ist, lässt sich aus dem Mittelwert der 20 für jedes Gen einzeln gemessenen Fluoreszenzen das jeweilige Expressionsniveau bestimmen



welche sinnvollen medizinischen Konsequenzen sich aus einem um 50 oder 80% gesteigerten Krankheitsrisiko ziehen lassen. Erst wenn es gelingt, Kombinationen von SNPs zu identifizieren, die eine Verdrei- oder Vierfachung eines Erkrankungsrisikos sicher vorhersagen können – und wenn sich daraus sinnvolle medizinische Konsequenzen ziehen lassen – wird der Siegeszug der SNP-Analytik in der klinischen Medizin nicht mehr zu stoppen sein.

In Deutschland gibt es heute eine Vielzahl von Biotech-Startups, die auf den Einzug der DNA-Analytik in die klinische Medizin gebaut haben. Auch um diesen Firmen eine solide Datenbasis zu verschaffen, ist es sinnvoll, die Möglichkeiten der SNP-gestützten Risikobestimmung für Volkskrankheiten in großen Untersuchungskollektiven nach den Grundsätzen der evidenzbasierten Medizin zu ermitteln.

Eine abschließende Bemerkung zu den SNP-Chips soll ihre Rolle im

Rahmen der Stufendiagnostik bei monogenen Erkrankungen erwähnen. Es gibt einige monogene Erkrankungen, bei denen eine begrenzte Anzahl von Mutationen (bis zu 100) für einen relativ großen Anteil aller Erkrankungen (über 70%) verantwortlich sind. In diesen Fällen (z.B. zystische Fibrose) ist es sinnvoll, im Rahmen einer molekular-genetischen Diagnosestellung vor einer Sequenzierung des sehr großen Gens zunächst mit einem Chip das Vorhandensein der häufigsten Mutationen abzufragen.

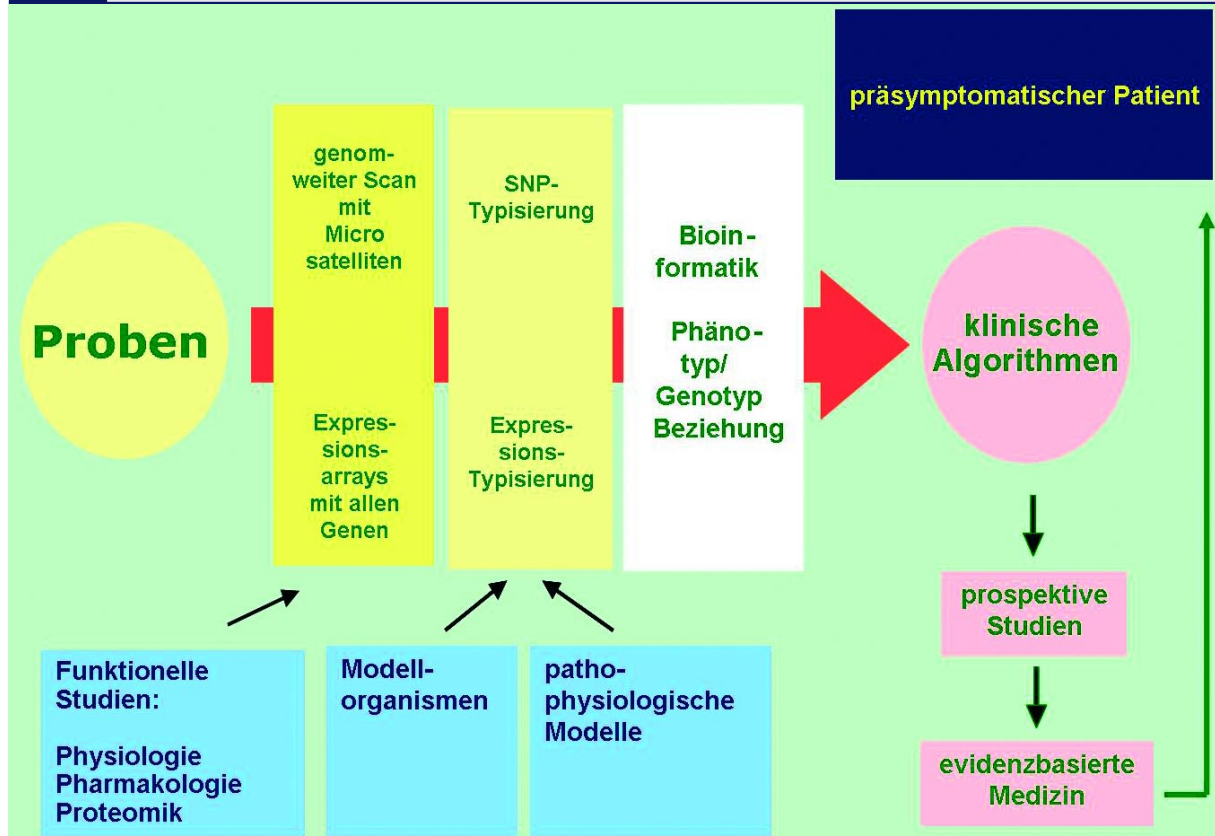
**Genexpressionschips**

Genexpressionschips untersuchen, welche mRNAs („messenger RNA“) in welcher Konzentration in den untersuchten Zellen vorkommen. Üblicherweise wird dabei Gesamt-RNA aus gut charakterisierten Zellkulturen oder Organhomogenisaten gewonnen, anschließend wird die mRNA selektiv mithilfe eines polyT-Primers in cDNA umgeschrie-

ben. Bei dieser als reverse Transkription bezeichneten Reaktion ist ein Teil der verwendeten Nukleotide biotinyliert. Die auf diese Weise markierten cDNA-Moleküle werden in die Hybridisierung eingesetzt. Im Anschluss daran wird die gebundene cDNA mit Streptavidin (SA), das mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert ist, für den Scanner sichtbar gemacht.

Andere Protokolle benutzen in der reversen Transkription unmarkierte Nukleotide und schreiben die cDNA anschließend unter Beteiligung von biotinylierten Ribonukleotiden in cRNA um (In-vitro-Translation). Der Vorteil der direkten Technik ist eine weniger starke Verfälschung des Spektrums exprimierter Gene. Ihre Nachteile sind die Notwendigkeit höherer Mengen an Ausgangsmaterial und die Möglichkeit der Reassozi-ation denaturierter cDNA. Die in der reversen Transkription bzw. der In-vitro-Translation verwendeten biotinylierten Nukleotide können

**Abb. 2** Perspektiven der Genchipanalytik komplexer Erkrankungen



Das Schema stellt einzelne Schritte und ihr Zusammenwirken bei der Entwicklung gendiagnostischer Verfahren für komplexe genetische Erkrankungen dar

durch andere Markermoleküle, z.B. Dinitrophenol(DNP)-Nukleotide, ersetzt werden. Anstelle der Fluoreszenzmarkierung von Straptavidin oder Anti-DNP-Antikörpern können auch andere Konjugate, beispielsweise Meerrettichperoxidase, verwendet werden, die dann eine Detektion der an die Festphase hybridisierten Nucleinsäuren über Chemilumineszenz erlauben. Auch der Einsatz von Radioisotopen ist üblich.

Technisches Ziel der meisten Genexpressionsanalysen ist die Ermittlung von Genen, die unter verschiedenen Bedingungen (stimuliert / unstimuliert, krank / gesund) unterschiedlich stark exprimiert sind. Hierzu müssen mindestens zwei RNA-Präparationen miteinander verglichen werden, wobei Fragen zur Kalibrierung von zentraler Bedeutung sind. Vergleicht man lediglich zwei Zustände, so ist eine parallele Aufarbeitung der Proben unter Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe und deren gleichzeitige Hybridisierung mit einem Chip möglich. Die verschiedenen Fluoreszenzen werden vom Scanner erkannt und erlauben damit direkte Rückschlüsse auf die relative Expression einzelner Gene in beiden Präparationen.

Weil während der Hybridisierung eine Konkurrenz der verschiedenartig markierten, aber ansonsten gleichen Moleküle aus den beiden Präparationen um den an die Festphase gebundenen komplementären DNA-Strang stattfindet, muss bei Serienuntersuchungen eine der beiden Präparationen als Kalibrator eingesetzt werden. Andere Protokolle verzichten auf ein solch aufwändiges Kalibrationsverfahren und verwenden jeweils nur eine RNA-Präparation für eine Hybridisierung. Bei dieser Vorgehensweise ist es wichtig, sowohl die Menge der an die Festphase gebundenen DNA als auch die für die Hybridisierung eingesetzte Menge an Nucleinsäuren möglichst konstant zu halten.

### ■ Fragestellungen an Genchipexperimente

Das Feld für die Anwendung von Genexpressionsexperimenten ist ausgesprochen breit. Kaum ein Gebiet der biomedizinischen For-

schung kommt heute noch ohne diese Technik aus. Die Identifizierung neuer Stoffwechselwege und die Aufdeckung regulatorischer Netzwerke werden durch diese Technik ebenso unterstützt wie toxikologische Prüfungen und die Analyse von Wirkungsspektren neuer Substanzen. In der genetischen Forschung profitieren sowohl familienbezogene als auch populationsgenetische Ansätze von der Genexpressionsanalyse.

In der Diagnostik hat diese Technik bereits heute deutliche Spuren hinterlassen. Dies gilt vor allem für die Tumordiagnostik. Hier werden die Genchips zur Klassifikation und für das Staging von Tumoren eingesetzt. Darüber hinaus lassen sich hiermit etablierte Verfahren der Tumordiagnostik, wie die Loss-of-heterozygosity(LOH)-Analyse und Überexpression (Expressivität) auf verblüffend einfache Weise supplementieren oder ersetzen. Obwohl der Einsatz von Mikroarrays in der mikrobiologischen Diagnostik noch in den Kinderschuhen steckt, kann mit großer Sicherheit vorhergesagt werden, dass gerade dieses Fach in besonderer Weise von der neuen Technik profitieren wird. Von einer exakten Charakterisierung des Bakteriengenoms einschließlich aller Pathogenitätsfaktoren wird nicht nur ein Zeitgewinn sondern auch eine Präzisierung der Diagnostik ausgehen.

Auch die Klinische Chemie wird von der Genexpressionsanalytik profitieren. Es wird erwartet, dass in ähnlicher Weise, wie Plasmaproteinkonzentrationen und Enzymaktivitäten Aufschluss über Erkrankungen von Organen geben, mRNA-Expressionsmuster in Leukozyten als Surrogatmarker für pathologische Prozesse außerhalb dieser Zellen dienen. Aufgrund der physikalischen Interaktion dieser Zellen mit der Gefäßwand sollten vor allem vaskuläre Prozesse in diesen Zellen abgebildet sein. Jedoch scheinen die Möglichkeiten dieser Diagnostik keineswegs auf dieses Organsystem beschränkt zu sein.

### ■ Ausblick

Die Entwicklung der Genchip-technik hat ein Schlaglicht auf die

heutigen Möglichkeiten einer massiv parallelen Erhebung individuenbezogener genetischer und funktioneller Daten geworfen. Daraus werden sich zahlreiche neue Chancen für eine Verbesserung der medizinischen Versorgung ergeben. In weiten Bereichen ist die Anwendung dieser Verfahren unkritisch. Erst wenn die Datenerhebung auf die Präzisierung genetischer Risiken zielt, müssen der individuelle Vorteil und ein damit verknüpfted individuelles Risiko gegeneinander abgewogen werden. Damit dies in einer sinnvollen Weise geschehen kann, lautet die zentrale Forderung an diese neuen Techniken, den Nutzen für den Patienten eindeutig nachzuweisen.

### Diagnostic Genechips – An Option with Great Potential

*The development of genechips highlights today's possibilities for massive data collections about an individual's genetic setting. SNP chips are designed to simultaneously detect thousands of a person's genetic variants. It is a challenge to medical research in this field to develop sensible techniques for their interpretation. Expressions arrays are used to detect actual conditions. At present, their most pronounced use is at present the improvement of cancer classification systems. Their potential, however, reaches far beyond and includes early detection of diseases and control of therapy. Complex disorders, which all common disorders can be categorized to, are the result of complex interactions of numerous gene variants with each other as well as with parameters of the environment and lifestyle. Here, gene expression profiles give the researcher a view of the metabolic situation that results from the action of all these factors. It is thus likely that common disorders are the ones that will profit most from the combined application of these new techniques.*

### Literatur beim Verfasser

#### Anschrift des Verfassers

PD Dr. Harald Funke  
Institut für Klinische Chemie und  
Laboratoriumsmedizin  
Albert-Schweitzer-Str. 33  
48149 Münster