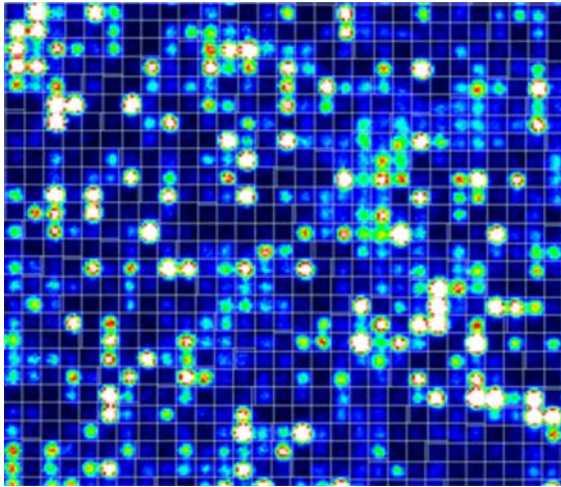


**PD Dr. Ludger Klein-Hitpass (Biochip-Labor, IFZ Essen)**

### **Genchips in der molekularbiologische Diagnostik von Tumoren und erblichen Syndromen**

Unter den molekularbiologischen Technologien, die zur Erforschung der molekularen Ursachen von Krebserkrankungen und der Entwicklung neuer Krebstherapien eingesetzt werden, spielen sogenannte Genchip-Technologien mittlerweile eine immer wichtigere Rolle. Diese Technologien, die auch im Biochip-Labor am Institut für Zellbiologie angewendet werden, erlauben u. a. die gleichzeitige Bestimmung der Aktivität der ca. 30000 Gene des Menschen in einer Tumorprobe. Im Vergleich mit gesundem Gewebe lässt sich aus diesen Analysen ein für die Tumorerkrankung kennzeichnendes Genprofil ableiten. Je mehr Genveränderungen bekannt sind, die zur Entstehung einer Krebserkrankung beitragen, desto gezielter können neue Diagnose- und maßgeschneiderte Therapiemethoden entwickelt werden. Im Vordergrund steht hier die Suche nach Genen, die das unkontrollierte Wachstum von Tumorzellen, Metastasierung und Therapieansprechen beeinflussen. Um zu aussagekräftigen Ergebnissen zu kommen und vergleichen Forscher hier natürlich möglichst viele Proben einer Tumorart, um so an der Krebsentstehung beteiligte Schlüssel-Faktoren zu identifizieren. Um die Kosten für den Einsatz in der Routinediagnostik zu reduzieren, versucht man dann billigere maßgeschneiderte Genchips zu entwickeln, die nur noch Sonden für wenige Dutzend relevante Gene enthalten. Ein mit dieser Strategie in den Niederlanden entwickelter Genchip (MammaPrint®) ist bereits 2007 von der zuständigen US-Behörde (FDA) für die Diagnostik von Brusttumoren zugelassen worden. Dieser Genchip misst die Aktivität von nur 70 relevanten Genen in dem durch einen chirurgischen Eingriff entfernten Brusttumor oder einer Biopsie und benutzt dann eine spezielle Formel, um die Wahrscheinlichkeit des Wiederauftretens des Krebses an anderer Stelle zu berechnen. Sollte es möglich sein, im Vorfeld Tumoren mit einem erhöhten Metastasierungsrisiko an Hand eines bestimmten Genmusters zu erkennen, könnte Patienten, deren Tumore nicht mit diesem Risiko behaftet sind, überflüssige belastende Chemotherapie-Behandlungen erspart bleiben. Ganz ähnlich wird auch versucht, mit Hilfe von Genchips festzustellen, ob ein Tumor auf eine Chemotherapie ansprechen wird oder nicht. Auch das Therapieschema, also die Kombination der verschiedenen Zytostatika, wird dabei getestet. So konnten zum Beispiel Wissenschaftler des Deutschen Krebsforschungszentrums und der Universitäts-Frauenklinik Heidelberg mit dieser Methode einen ersten Erfolg verzeichnen: Sie identifizierten ein spezifisches Genaktivitätsprofil, das solche Brusttumoren charakterisiert, die auf ein ganz bestimmtes Therapieschema mit vollständiger Rückbildung ansprechen. Eine Pressemitteilung des Deutschen

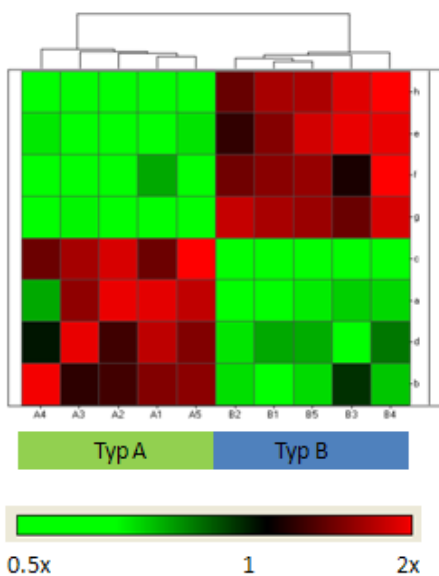
Krebsforschungszentrum zu diesem Thema lesen Sie unter folgendem Link [www.dkfz.de/de/presse/pressemitteilungen/2006/](http://www.dkfz.de/de/presse/pressemitteilungen/2006/).



**Abb. 1** Fluoreszenzsignale eines Genchips nach Analyse im Laserscanner. Die Signaletärke steigt von blau über grün, rot und weiss an. Es wird nur ein kleiner Ausschnitt des Gesamtchips gezeigt. Das Gitter markiert die Bereiche, die mit den verschiedenen DNS-Sonden bestückt sind.

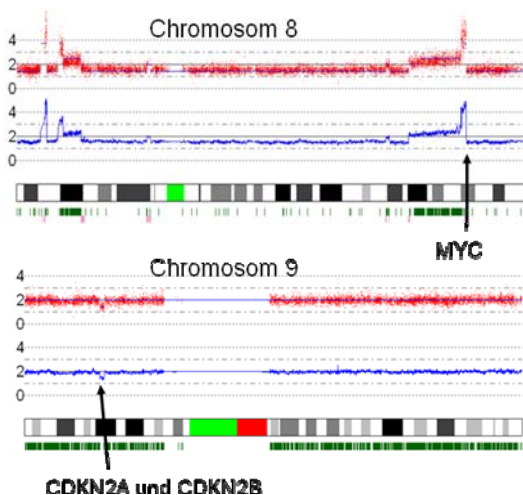
Für die oben genannten Ansätze wird aus den Tumorproben die Boten-RNS (mRNS) isoliert, mit Hilfe von Enzymen vervielfältigt und mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die markierte RNS wird dann auf den Chip gegeben, der mit komplementären DNS-Molekülen bestückt ist, die aus den Genabschnitten der Chromosomen abgeleitet sind. Während einer meist 16-stündigen Inkubationsphase binden die markierten RNS-Moleküle an komplementäre DNS-Moleküle (Schlüssel/Schloss-Prinzip). Nach dem Wegwaschen ungebundener Moleküle können die Genchips dann in einem Laserscanner ausgewertet werden

(Abb.1). Die Höhe des Fluoreszenzsignals ist dann ein Mass für die in der Probe vorliegende Menge der spezifischen mRNS-Moleküle. Sammelt man so Daten von vielen Tumorproben, kann man versuchen, mit Hilfe statistischer Verfahren Gene zu identifizieren, die eine Unterscheidung von verschiedenen Tumortypen erlauben (Abb. 2).



**Abb. 2** Unterscheidung von Tumortypen durch Analyse der Gen-Aktivität mittels Genchip. Vier verschiedene Gene (e, f, g, h) zeigen überdurchschnittliche Aktivität (rot) in Tumortyp B, während die Gene a-d in Tumortyp B unterdurchschnittlich aktiv (grün) sind. Die individuelle Genaktivität bezogen auf den Durchschnitt ist gemäß der unten angegebenen Farbskala in Form einer sogenannten „Heatmap“ dargestellt.

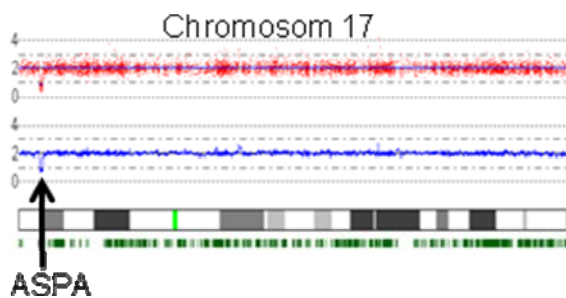
Ein weiteres wichtiges Anwendungsgebiet für Genchips ist die Untersuchung von chromosomalen Veränderungen, die in Tumoren und anderen genetischen Erkrankungen auftreten. Bei Tumoren stellen der Verlust von chromosomalen Abschnitten mit Tumorsuppressor-Genen und die Amplifikation von Abschnitten mit sogenannten Onkogenen wichtige Schritte dar, die zum Entstehen einer Tumorzelle beitragen. Um solche Gene zu identifizieren, die meist an der Steuerung von Zellwachstum, invasivem Wachstum und Metastasierungsverhalten beteiligt sind, wird bei diesem Ansatz die DNS der Tumoren isoliert, in kleine Stücke geschnitten, vervielfältigt, mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und auf spezielle Genchips gegeben, die in diesem Fall DNS-Sonden enthalten, die in relativ gleichmäßigen Abständen auf den Chromosomen liegende Abschnitte der Zellkern-DNS repräsentieren. Bei der Auswertung werden die erhaltenen Fluoreszenzsignale der Tumor-DNS Proben dann gegen die entsprechenden Signale von Normal-DNS Proben verglichen. Mit den modernsten Genchips, die bis zu 2,7 Millionen verschiedene Stellen im Genom untersuchen, können so der Verlust oder Zugewinn von DNS-Abschnitten nachgewiesen werden, die bei anderen Techniken – einschließlich der zytogenetischen Untersuchung mittels Lichtmikroskop - unentdeckt bleiben. Auch hier versucht man durch Untersuchung einer Vielzahl von Tumoren Gene zu identifizieren, die bei bestimmten Tumortypen gehäuft auftreten und Prognose bzw. Therapieansprechen beeinflussen. Abb. 3 zeigt zwei Beispiele, in denen B-Zell-Lymphome mit Hilfe von Genechips untersucht wurden, die eine Amplifikation des Onkogens MYC bzw. den Verlust der Tumorsuppressorgene CDKN2A und B aufweisen.



**Abb. 3 Molekulare Diagnostik von B-Zell-Lymphomen auf Genchips. Oben ist die DNS eines Tumors dargestellt, die u.a. eine Amplifikation des MYC-Gens auf Chromosom 8q24.12 aufweist, unten ist das Chromosom 9 einer Probe gezeigt, bei der je eine Kopie der CDKN2A und B Gene fehlt.**

Auf der jeweils oberen Skala sind die Gen-Dosiswerte dargestellt, die aus den einzelnen DNS-Sonden des Chips berechnet wurden (rote Punkte), die mittlere Skala zeigt eine daraus abgeleitete, geglättete Gen-Dosis-Kurve (blau). Unten den geglätteten Kurven ist jeweils das Idiogramm des Chromosoms mit den Banden dargestellt.

Auch bei der Diagnostik erblicher Erkrankungen erweist sich die Genchip-Analyse der DNS mittlerweile eine äußerst wertvolle Technik. Abb. 4 zeigt die Analyse der DNS eines Patienten, bei dem vermutet wurde, dass er das Canavan-Syndrom aufweist. Die Canavan-Krankheit ist eine autosomal rezessiv vererbte Stoffwechselkrankheit, die zu einem Abbau der Myelinschicht führt, die die Nerven im Gehirn umgibt. Verantwortlich für die Erkrankung sind meist Mutationen, selten Deletion, im ASPA-Gen auf Chromosom 17. Nur in sehr wenigen Fällen wurde der komplette Verlust der von Mutter und Vater ererbten ASPA-Gene beobachtet. Wie in Abb. 4 gezeigt, weist die in einer Kooperation mit der Humangenetik Kiel im Essener Biochip-Labor untersuchte DNS-Probe eines Kindes mit Canavan, dessen Eltern blutsverwandt waren, eine etwa 439 kb grosse Deletion auf Chromosom 17p13.3 auf, die das ASPA vollständig umfasst. In Übereinstimmung mit dem bekannten rezessiven Erbgang der Erkrankung zeigte die Analyse der DNS der beiden nicht erkrankten Eltern, dass sowohl in der Mutter als auch beim Vater nur jeweils ein – von einem gemeinsamen Vorfahren ererbtes – Chromosom die Deletion des ASPA-Gens aufweist.



**Abb. 4 Genchip-Analyse der DNS eines Patienten mit Canavan-Syndrom (Caliebe A, Vater I, Plendl H, Gesk S, Siebert R, Cremer FW, Klein-Hitpass L; Mol Gen et Metab. 2010 Feb;99(2):184-5)**

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass molekulare Untersuchungen mittels Genchips in den letzten Jahren zu einem immer wichtigeren Bestandteil der Erforschung von Krebserkrankungen und erblichen Syndromen geworden sind. Sie liefern u.a. wichtige Hinweise auf genetische Ursachen von Tumoren und für die Wahl des optimalen Behandlungsschemas eines Krebspatienten. Auch während oder nach Abschluss einer Krebstherapie kommen moderne Verfahren der Molekularbiologie zum Einsatz, um etwa den Verlauf der Erkrankung zu beurteilen oder um ein erneutes Auftreten des Tumors rechtzeitig aufzuspüren.