

Biochips – Diagnostik in der Streichholzschachtel

Paul Cullen^{1,2} und Stefan Lorkowski¹

Zahlreiche molekularbiologische und biochemische Methoden können durch derzeit verfügbare mikro- und nanotechnologische Verfahren miniaturisiert werden. Bereits heute ist es zum Beispiel möglich, mit Biochips im Briefmarkenformat die Expression mehrerer tausend Gene gleichzeitig zu messen oder bestimmte Gene zu sequenzieren. Derzeit entwickelte Biochips ermöglichen jedoch nicht nur die Expressions- und Sequenzanalyse von Nukleinsäuren, sondern auch zahlreiche andere Analyseverfahren wie die Bestimmung von Enzymaktivitäten oder Proteinspiegeln. Das Ziel der heutigen Chipentwicklung sind so genannte Lab-on-a-chip-Systeme, die derzeitige Laborgroßgeräte durch Systeme etwa in der Größe eines Notebook-Computers ersetzen sollen. In naher Zukunft werden solche Systeme Routineanalysen in vielen Bereichen der medizinischen Diagnostik kostensparend und mit hohem Probendurchsatz erlauben.

Miniaturisierung und kein Ende

Wenn man bedenkt, welche technische Leistung in einem modernen Notebook-Computer oder einer Digitalkamera steckt, so kann man sich vorstellen, wie weit man mit der Verkleinerung von Apparaturen und Geräten bereits gekommen ist. Dennoch stehen wir erst am Anfang dieser Entwicklung.

Bisher ist es gelungen, Schaltkreise, Komponenten und ähnliches im Mikroformat (Größenordnung 10^{-6} m) herzustellen. Dank moderner Technik wird es jedoch bald möglich sein, Bauteile herzustellen, die nochmals um einen Faktor 10^{-3} kleiner sind. Hier redet man vom Nanobereich (10^{-9} m) und von der Nanotechnologie. Mit Hilfe dieser Technologie wird man in wenigen Jahren in der Lage sein, einzelne Atome und Moleküle zu manipulieren (10 Wasserstoffatome nebeneinander haben eine Größe von 1 nm), und so Geräte in einem Maßstab herzustellen, der unsere heutige Vorstellungskraft sprengt.

Diese Revolution wird auch vor dem medizinischen Laboratorium keinen Halt machen, da die Miniaturisierung auch hier viele Vorteile aufweist. Diese erstrecken sich von verringerten Gerätekosten und einem verringerten Verbrauch an Reagenzien über eine vereinfachte Automatisierung bis hin zu einer größeren Fähigkeit, die Messung dort durchzuführen, wo das Ergebnis auch benötigt wird (sog. *point of care testing* = POCT). Andere Vorteile sind oft schnellere Reaktionszeiten und damit schnellere Ergebnisse und nicht zuletzt die Fähigkeit, eine Vielzahl von Analysen in einem kleinen Raum durchzuführen.

Bereits heute kann man erste Umrisse dieser neuen Technologie erkennen. Hierbei geht es zum Beispiel um miniaturisierte Testverfahren zur Messung von Glukose oder Myoglobin, oder auch um Genchips, die in der Lage sind, Tausende von DNA-Molekülen gleichzeitig zu erfassen. Insgesamt stammen viele der heute verfügbaren Mikrotest-

verfahren aus dem Bereich der Gentechnik und der Molekularbiologie. Deshalb werden wir im ersten Teil dieses Artikels gesondert auf diese Technologie eingehen. Im zweiten Teil des Artikels werden wir dann kurz auf andere, nicht auf Nukleinsäuren basierenden Messtechniken im Medizinlabor zu sprechen kommen, die auch in den kommenden Jahren stark miniaturisiert werden.

Miniaturisierung in der Molekularbiologie – das Genom auf der Briefmarke

Genchips – die Zukunft der genetischen Analytik

Die gesamte kodierende Information des menschlichen Genoms umfasst nach heutigen Erwartungen etwa 100 000 Gene, die aus rund 300 Millionen Nukleotiden bestehen. Diese gewaltige Zahl an chemischen Informationsbausteinen stellt jedoch nur etwa ein Zehntel des gesamten humanen Erbguts dar. Bereits im Jahr 2000 wurde durch die Mitarbeiter des Human-genom-Projekts sowie der Fa. Celera Genomics das menschliche Genom komplett entschlüsselt und die Reihenfolge der rund drei Milliarden Nukleotide aufgeklärt.

In menschlichen Zellen sind zu einem definierten Zeitpunkt etwa 12 000 bis 15 000 der 100 000 Gene aktiv, in den Zellen des Gehirns möglicherweise doppelt so viel. Die Funktion einer Zelle, äußere Faktoren, die auf eine Zelle einwirken, Defekte im Erbgut und auch Erkrankungen bestimmen, welche Gene in einer Zelle aktiv sind, also in welchem

¹ Institut für Arterioskleroseforschung an der Universität Münster

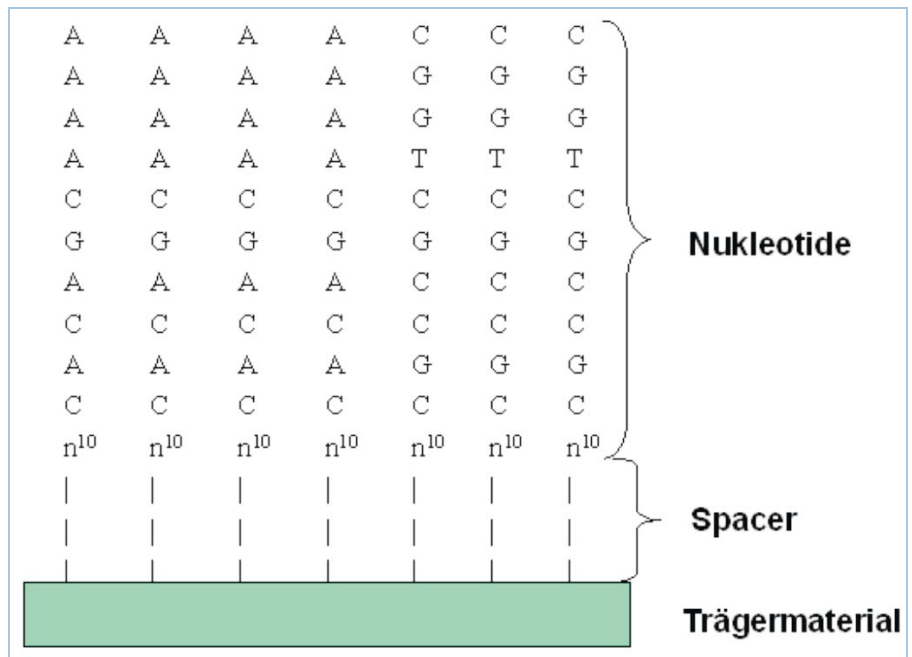
² OGHAM Diagnostics, Münster

Maße sie angeschaltet oder „exprimiert“ werden. Daraus resultiert ein so genanntes *Genexpressionsmuster*, eine Art Fingerabdruck der Aktivität dieser Zelle.

Die Kenntnis dieses Fingerabdrucks liefert wertvolle Informationen über den Zustand der Zelle, zum Beispiel, ob eine maligne Entartung oder andere krankhafte Veränderung stattgefunden haben. Vielleicht die vielversprechendste Möglichkeit, solche *Genexpressionsmuster* zu bestimmen, stellen DNA-Hybridisierungschips (Genchips oder DNA-Chips) dar, die mit einem relativ geringen Arbeits- und Zeitaufwand die Expression aller derzeit bekannten Gene messen können. Neben den Mikroprozessoren in Computern könnten diese DNA-Chips zu einer der wichtigsten medizinischen Neuerungen des letzten Jahrhunderts werden, da sie innerhalb der nächsten Jahre die gleichzeitige Messung der Expression aller menschlichen Gene erlauben werden. Ein Genchip der amerikanischen Firma Affymetrix als Beispiel für einen DNA-Chip für Expressionsanalyse ist in Abbildung 1 dargestellt.

Neben der Messung der Expression liegt das zweite große Einsatzgebiet der Genchiptechnologie in der Analyse

● **Abb. 1:** Expressionschip der amerikanischen Firma Affymetrix. Ein solcher Chip samt Gehäuse hat etwa die Größe einer Streichholzschachtel.



● **Abb. 2:** Schematischer Ausschnitt eines Genchips in hoher Auflösung.

von *Gensequenzen*. So wird es möglich sein, mit solchen Chips mehrere Hundert Sequenzabweichungen in Genen (Polymorphismen oder Mutationen) sehr schnell und zeitgleich zu erfassen. Auch eine komplette Sequenzierung von Genen ist mittels Genchips möglich.

Was ist ein Genchip?

Genchips stellen ein Zusammenwirken der *Biotechnologie* und der *Halbleitertechnik* dar. Ihr Prinzip ist ganz einfach: Kurze Abschnitte von DNA werden endständig auf einen Chip aufgebracht, vergleichbar mit Borsten auf einer Bürste. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, um die DNA-Moleküle auf einen Chip zu platzieren. Die amerikanische Firma Affymetrix verwendet dafür eine fotolithografische Technik, die direkt aus der Computerindustrie stammt. Dabei wird durch ultraviolettes Licht die Oberfläche des Chips aktiviert und die DNA anschließend Baustein für Baustein an den aktivierten Stellen aufgebracht. Andere Unternehmen, wie zum Beispiel unsere Firma, die OGHAM GmbH in Münster, benutzen eine Methode, bei der die bereits fertigen DNA-Moleküle

mit einer Art Tintenstrahldrucker auf den Chip aufgebracht („gespottet“) werden. Die Firma ClonDiag aus Jena wiederum setzt eine nasschemische Technik ein, die aus der Offset-Technik der Druckindustrie abgeleitet wurde [4]. Abbildung 2 zeigt einen schematischen Ausschnitt eines Genchips in hoher Auflösung.

Wie funktioniert ein Genchip?

Die vier Bausteine der DNA, die Nukleotide Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T) haben die Eigenschaft, mit sich selbst in spezifischer Weise Bindungen einzugehen, dabei bindet C immer an G und A immer an T. Eine Sequenz wie TATAGCCG würde demnach fest an die dazu komplementäre Sequenz ATATCGGC binden, und nur an diese Sequenz. Die hohe Spezifität dieser Bindung, die man als Hybridisierung bezeichnet, bildet die Grundlage für das Funktionieren eines Genchips.

Um die Genexpression einer Zelle mittels Genchips zu ermitteln, wird zunächst die *messenger-RNA* (mRNA) aus der Zelle isoliert, vermehrt und in der

Regel mittels eines Fluoreszenzfarbstoffs markiert. Die markierte mRNA wird dann mit einem Genchip hybridisiert, der die Komplementärsequenzen zu den Genen enthält, die gemessen werden sollen. Die Analyse eines solchen Genchips ist nicht einfach und bedarf einer großen Rechenleistung. Dennoch ist es möglich, anhand der Stärke des Hybridisierungssignals zuverlässige Rückschlüsse über die Stärke der Expression einzelner Gene in der Zelle zu ziehen. Derzeit gehören derartige Genexpressionsanalysen in den Bereich der Forschung. Aber in wenigen Jahren werden die ersten Tests erscheinen, die diese Technologie für die Diagnostik im medizinischen Labor einsetzen.

Die zweite große Anwendung der Genchips – die Bestimmung einer DNA-Sequenz oder die Feststellung einer Mutation in der DNA – basiert ebenfalls auf dem Prinzip der DNA-Hybridisierung. Wenn sich im einfachsten Fall ein einziges falsches Nukleotid, beispiels-

weise statt des Nukleotides C ein G in einem Gen befindet, kann es bereits zur Krankheitsentstehung kommen, da durch die Mutation die Funktion der Proteine beeinträchtigt werden oder verloren gehen kann. Durch einen Genchip kann eine derartig winzige Veränderung im Erbgut (eine so genannte Punktmutation) zuverlässig erfasst werden.

In der Praxis geht man so vor, dass aus einer Blutprobe die DNA des Patienten isoliert und in kleine Bruchstücke zerlegt wird. Die DNA-Fragmente werden mit einem Farbstoff markiert und mit der DNA auf dem Chip hybridisiert. Da bekannt ist, wo sich die Komplementärsequenzen der mutierten DNA auf dem Chip befinden, wird durch eine Farbmarkierung in dieser Position auf dem Chip signalisiert, dass eine Mutation bei dem Patienten vorliegt. Gleichzeitig enthält der Chip an einer anderen Stelle die entsprechende komplementäre Sequenz des intakten Gens (Wildtyp-

Sequenz). Gibt die DNA des Probanden an dieser Stelle ein Farbsignal, so liegt keine Mutation im betreffenden Genort vor. Das gleichzeitige Vorhandensein von mutierter (kranker) und intakter (gesunder) Sequenz auf dem Chip hat zwei große Vorteile: Zum einen kann die Genauigkeit (Spezifität) der DNA-Bindung an den Chip überprüft werden, zum anderen können Merkmalsträger, so genannte Heterozygote, identifiziert werden. Bei ihnen findet sich ein Farbsignal sowohl an der Stelle der fehlerhaften oder mutierten Sequenz als auch an der Position der Wildtyp-Sequenz, da sie von beiden Sequenzen jeweils eine Kopie besitzen. Dieser Mechanismus wird in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

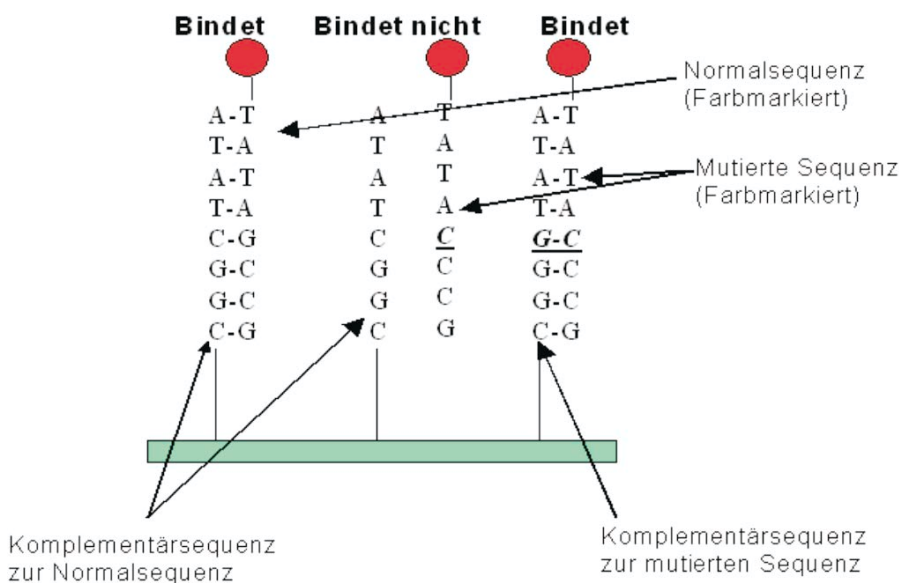
Detektionsverfahren

Wie oben erwähnt, werden für die Detektion der Signale auf Genchips in der Regel Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Jedoch können auch hier verschiedene andere Detektionsverfahren eingesetzt werden, die mittels Radioaktivität, Massenspektrometrie, Zweipolimpedanz oder der neuen Methode der Atomic-Force-Spektroskopie funktionieren.

Mikrochiptechnologie – Einsatzgebiete ohne Grenzen?

Die Tendenz zur Miniaturisierung beschränkt sich nicht ausschließlich auf Hybridisierungsverfahren zur Expressions- und Sequenzanalytik von Nukleinsäuren. Derzeit wird eine Vielzahl weiterer analytischer und diagnostischer Verfahren im Mikrochipformat entwickelt und erprobt. Im Vordergrund stehen dabei zunächst getrennte Verfahren zur Probenauf- und -verarbeitung sowie der abschließenden Detektion. In einem zweiten Schritt werden diese Einzelverfahren miteinander zu einem Chipsystem kombiniert, das eine automatisierte Verarbeitung der Proben vom ersten bis zum letzten Schritt ermöglicht.

● **Abb. 3:** Prinzip der Hybridisierung auf einem Genchip. Die Komplementärsequenz zur normalen Gensequenz bindet die markierte normale DNA-Sequenz des Patienten (links), nicht aber die mutierte Sequenz des Patienten (Mitte). Dafür bindet die Komplementärsequenz zur mutierten Sequenz an die mutierte Sequenz des Patienten (rechts), nicht aber die Normalsequenz (nicht abgebildet).



Mikrofluidik

Analog der Entwicklung in der Mikroelektronik hat es in den letzten Jahren beeindruckende Entwicklungen im Bereich der so genannten *Mikrofluidik* gegeben. Hierbei handelt es sich um die Herstellung von Geräten, die in der Lage sind, Flüssigkeiten im Nano- oder sogar Femtoliterbereich zu verwalten, das heißt zu pumpen, zu mischen, zu heizen oder zu kühlen und so weiter. Viele diese Geräte arbeiten nach dem Prinzip des *elektrokinetischen Transports*, wobei eine Lösung durch die Bewegung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld transportiert wird. Die ersten kommerziellen Geräte, die nach diesem Prinzip arbeiten, sind bereits verfügbar.

Kapillarelektrophorese

Unter den bislang umgesetzten Verfahren ist der *Kapillarelektrophorese* eine zentrale Bedeutung beizumessen. Sie wird seit einigen Jahren als chipbasierte Technik entwickelt [3] und kann erfolg-

reich mit anderen Verfahren kombiniert werden.

Die Umsetzung der *Hochleistungsflüssigkeitschromatographie* (HPLC) zu einem miniaturisierten Chipsystem war lange Zeit nicht möglich, da keine geeigneten Mikropumpen, -ventile und ausreichend sensitive Detektionssysteme existierten. Mit der Möglichkeit, die Proben mit Hilfe elektrischer Felder in den Chip zu injizieren und durch die Trennkanäle zu leiten, stand der Entwicklung dieser Technik nichts mehr im Wege.

Die Umsetzung der Kapillarelektrophorese in das Chipformat bringt mehrere Vorteile mit sich: Verschiedene Analyseaufgaben können in einem Gerät integriert werden. Die Probentrennung erfolgt schneller, da kürzere Trennstrecken (1 bis 5 cm) und die Verwendung höherer elektrischer Felder (bis zu 2500 V/cm) einen schnelleren Durchfluss der Probe durch das Trennmedium erlauben. Die planare Anordnung des Mikrokanalnetzwerkes er-

möglicht eine Fabrikation mit geringen Totvolumina. Die geringe Größe der Chips, kombiniert mit den Möglichkeiten, viele Proben zu verarbeiten und das Trennverfahren mit der Probenaufarbeitung und -detektion zu kombinieren, verleihen der Chipelektrophorese ein großes Potential für die Routine-diagnostik.

Polymerasekettenreaktion

Sogar Methoden wie die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction* = PCR) können von der Chiptechnologie profitieren und erfolgreich auf Chip-systeme adaptiert werden [1, 2, 6]. Derartige *PCR-Chips* bestehen aus Mikroreaktionskammern, die durch Silikonformen auf einer Glasfläche gebildet werden. Die so gebildeten Reaktionskammern haben ein Volumen von weniger als zehn Mikrolitern. Der Vorteil eines solchen Systems ist das vergleichsweise günstige Verhältnis zwischen hoher Oberfläche und kleinem Volumen. Dies ermöglicht wesentlich

kürzere Reaktionszeiten mit einem Volumen von wenigen Nano- oder Femtolitern Reagenz.

Sensor-Arrays

Eines der wichtigsten Einsatzgebiete der Miniaturisierung ist die Herstellung von so genannten *Sensor-Arrays*. Hierbei handelt es sich um Sensoren für Glukose, Harnstoff, Kreatinin und andere Analyten im Kleinformat, die es möglich machen, das *ganze Spektrum der klinisch-chemischen Routineanalytik* mit viel *geringeren Proben- und Reagenzienvolumina* als bisher durchzuführen. Mit solchen Sensor-Systemen wird es auch möglich sein, miniaturisierte Immunoassays mit einem viel geringeren Verbrauch an Reagenzien und einer weit höheren Sensitivität als mit heute verfügbaren Methoden durchzuführen.

„FACS on a chip“

Ende 1999 wurde das erste Einweg-Fluoreszenz-aktivierte Zellsortiergerät (FACS) im Mikroformat von Quake und seinen Kollegen entwickelt [5]. Es ist wahrscheinlich, dass sich in den nächsten Jahren solche Einweg-Kartuschen in vielen Bereichen der zellulären Analytik durchsetzen werden. Hier sind insbesondere Applikationen in der Immunologie und der Krebsdiagnostik von Bedeutung.

Vorteile der Miniaturisierung

Die Entwicklung hin zur Miniaturisierung weist mehrere Vorteile auf. Immer *kleinere Probenaufarbeitungs-, Reaktions- und Detektionssysteme* mit gleichbleibender oder *verbesserter Qualität* der Ergebnisse ermöglichen den *Einsatz reduzierter Proben- und Reagenzolumina*. Damit ist gleichzeitig ein größerer Durchsatz an Proben sowie eine Vereinfachung der Messung durch eine verstärkte Automatisierung möglich. All diese Prozesse führen zu einer erhöhten Reproduzierbarkeit von Ergeb-

nissen und einer *Kostenreduktion*, die vor allem in der klinischen Diagnostik mit ihren langen Messreihen zum Tragen kommt.

Ein Blick in die Zukunft

Der Trend zur Miniaturisierung und der damit verbundene erhöhte Probenumsatz wird sich in den nächsten Jahren in vielen Bereichen verstärkt fortsetzen und wahrscheinlich eine zur Mikroprozessorentwicklung analoge Bedeutung gewinnen. Das *Endziel* dieses Prozesses ist die Herstellung so genannter *Nanochips*, Geräte mit Bausteinen in der Größenordnung weniger Nanometer (z. B. mit DNA als Informationsspeicher oder Proteinen als Pumpen oder Motoren), sein. Konkret realisierbar werden in absehbarer Zeit so genannte *Lab-on-a-chip-Systeme* sein, die vollständige diagnostische Verfahren mit Aufarbeitung, Verarbeitung und Messung von Proben auf einem winzigen Chip beinhalten. Es ist sogar vorstellbar, dass so genannte *Plug-and-play-Versionen* dieser Chips zur Verfügung stehen werden. Hier ist gedacht, dass im Labor ein generischer „Kontroller“ stehen wird, der prinzipiell alle Chips aufnehmen kann. Die Spezifität der Analyse wird dann durch den Chip und nicht mehr durch das gesamte Gerät bestimmt. Durch solche modularen Systeme wird ein viel größerer Grad an Flexibilität als bisher im diagnostischen Labor erreichbar sein.

Die Bedeutung solcher Systeme für die medizinische Laboratoriumsdiagnostik ist derzeit recht schwer abzuschätzen. Wie bei Technologiefolgeabschätzungen im Allgemeinen reichen die Prognosen von düsteren Untergangsvisionen bis hin zu utopischen Wunschträumen. Wir selber sind Optimisten und der Meinung, dass es dem Menschen gelingen wird, Herr des Geschehens zu bleiben. Allerdings wird die zunehmende Automatisierung der Befunderstellung den Schwerpunkt der

Arbeit der MTA der Zukunft immer mehr von *manuellen zu wissensorientierten Tätigkeiten* verlagern. Diese Veränderungen werden einerseits zu einer Aufwertung des Berufsbildes, andererseits zu größeren Anforderungen an die MTA-Ausbildung führen. ●

Literatur beim Verfasser

Adresse des Verfassers:

PD Dr. Paul Cullen

OGHAM GmbH, Mendelstrasse 11

D-48149 Münster

Email: ogham@ogham.de

Kurz und bündig ●

▶ *Die Miniaturisierung im medizinischen Labor steckt noch in den Kinderschuhen. In den nächsten Jahren werden die Großgeräte aller Wahrscheinlichkeit nach aus dem medizinischen Labor verschwinden.*

▶ *Derzeit ist die Miniaturisierung bei der molekularbiologischen Diagnostik am weitesten fortgeschritten, wird aber bald alle Bereiche der Routineanalytik erfassen.*

▶ *Es werden modulare Chipsysteme entwickelt, die von universellen Lesegeräten nach dem „Plug-and-play-Prinzip“ funktionieren werden.*

▶ *Die zunehmende Automatisierung wird den MTA-Beruf nicht absondern aufwerten, da eine Verlagerung von manuellen zu wissensorientierten Tätigkeiten hin zu erwarten ist.*