Gene, Chips und Bits

Die nächste Generation der Labordiagnostik

Die Geschichte der Neuzeit, insbesondere seit der industriellen Revolution, ist geprägt von technischen Entwicklungen, die nicht nur eine Verbesserung des bis dahin Gewesenen, sondern eine völlig neue Sichtweise der Dinge bedeutet. In solchen Fällen reden wir vom Paradigmenwechsel, d. h. ein bis dahin existierendes Denkmuster wird nicht verändert, sondern ersetzt.

So verläuft die technische Entwicklung nicht gradlinig und kontinuierlich, sondern in Stufen, die jeweils von einer solchen Erneuerung ausgelöst wird *(Abbildung 1)*. Beispiele solcher Paradigmenwechsel sind die Entwicklung der Dampflokomotive, die die Arbeitskraft der Menschen in bis dahin ungeahnte Weise vermehrte, und die Entstehung des Telefons und des Radios, die die Kommunikation revolutionierten und die geographische Entfernung verschwinden ließen. Und, allem Missbrauch und aller Zukunftsängste zum Trotz, haben solche technischen Verbesserungen die Lebensqualität und den Wohlstand der Menschen gemehrt.

Schauen wir uns solche Entwicklungen an, so können wir zwei wichtige Merkmale ausmachen. Erstens sind derartigen technischen Entwicklungen fast immer wichtige Entdeckungen in der Grundlagenforschung vorausgegangen. Um bei unseren Beispielen zu bleiben, war die Dampflokomotive nur deshalb möglich, weil *Robert Boyle* bereits im 18. Jahrhundert die Gasgesetze kodifiziert hat, während die Entwicklungen in der Telekommunikation auf der Pionierarbeit von *Robert Maxwell* auf dem Gebiet der Elektromagnetik aufbauten. Zweitens stellen wir fest, dass die Intervalle zwischen solchen Paradigmenwechsel immer kürzer werden, während die Verbreitung des neuen Wissens immer schneller erfolgt.

Darüber hinaus ist zu erkennen, dass längere Zeitspannen von Branchen der Wissenschaft dominiert zu sein scheinen.

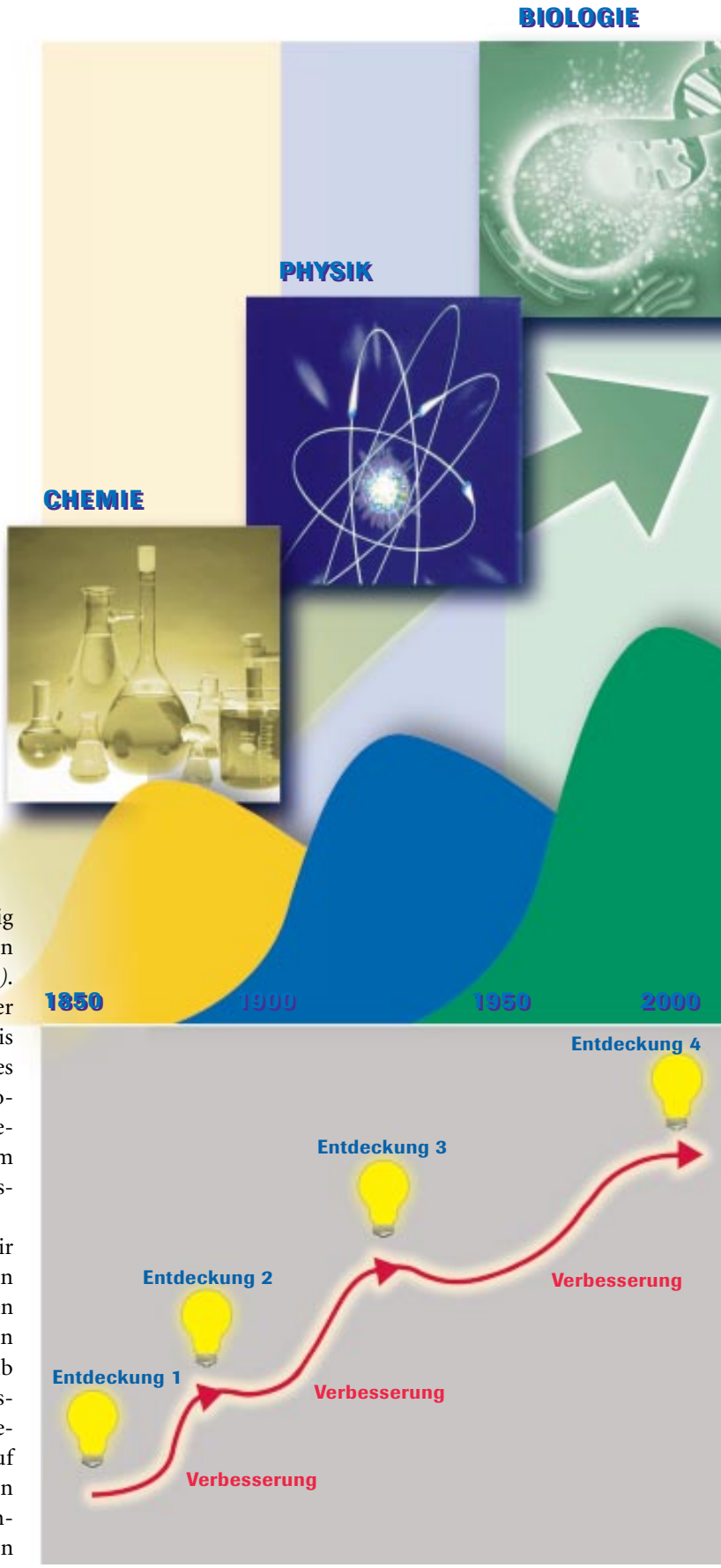


Abbildung 1: Die technische Entwicklung verläuft nicht gradlinig und kontinuierlich, sondern in Schüben, die jeweils von einer Entdeckung ausgelöst werden.

So können wir im technischen Entwicklungsrhythmus unseres Jahrhunderts drei große Zeitalter identifizieren. Im späten neunzehnten und frühen zwanzigsten Jahrhundert herrschte das Zeitalter der Chemie. Mitte des Jahrhunderts wurde dieses abgelöst vom Zeitalter der Physik. Nun erleben wir das Zeitalter der Biologie, dessen Weckruf die Identifizierung der Struktur der *Desoxyribonukleinsäure (DNA)* durch *Francis Crick* und *James Watson* im Jahre 1953 war *(Abbildung 2)*.

Selbstverständlich wurde auch die Diagnostik im medizinischen Laboratorium als wissenschaftliches Fach von diesen Entwicklungen und Zeitströmen in engster Weise beeinflusst. So basierte in diesem Jahrhundert die Labordiagnostik

Abbildung 3: *Kary Mullis* (geb. 1944), Entwickler der PCR-Technik

Einflüsse auf die Labormedizin

zunächst auf der Chemie und danach auf der Biochemie. In den Siebzigerjahren kamen die immunologischen Tests hinzu, die die Labordiagnostik heute noch weitestgehend beherrschen. Aber seit einigen Jahren können wir erkennen, dass die Zukunft der Labordiagnostik der DNA gehört. Dies ist auch daran erkennbar, dass der Markt für DNA-Diagnostik sehr schnell wächst, während der Umsatz in den anderen Sektoren des Diagnostika-Marktes insgesamt stagniert.

Der erste große Schub nach vorn in der DNA-basierten Diagnostik wurde durch die Entdeckung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durch *Kary Mullis (Abbildung 3)* ausgelöst, der dafür mit dem Nobelpreis für Chemie 1993 ausgezeichnet wurde. Bereits heute gibt es eine Vielzahl von Labortests, die auf dieser Technik beruhen. Dies ist jedoch erst der Anfang. Heute stehen wir vor einer Explosion in der DNA-basierten Diagnostik, die durchaus mit dem rasanten Wachstum in der Informationstechnologie Schritt halten wird.

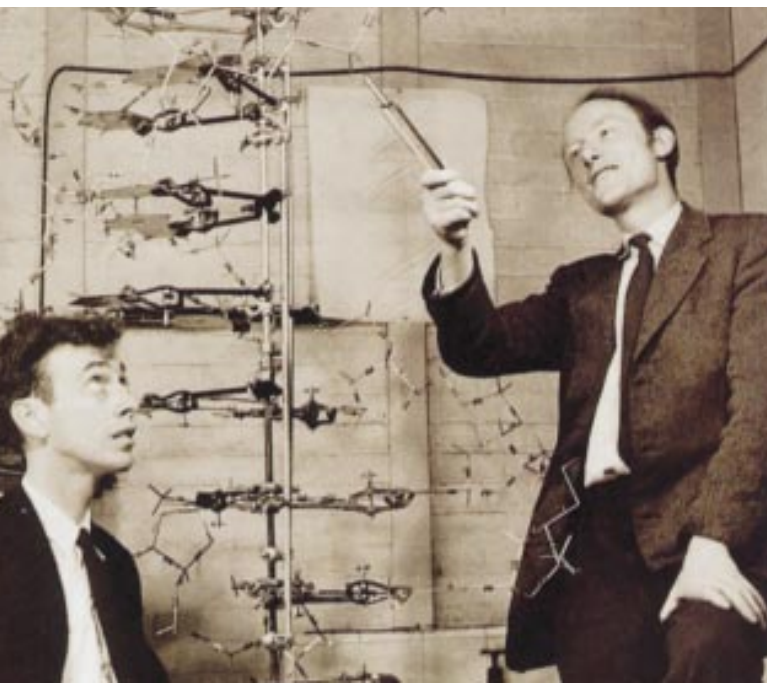


Abbildung 2: *Francis Crick* (re., geb. 1916) und *James Watson* (geb. 1928), die die Struktur der DNA aufgeklärt haben, und die dafür im Jahre 1962 zusammen mit *Maurice Wilkens* (geb. 1916), den Nobelpreis für Medizin erhielten. Das Bild zeigt das Modell der DNA, das sie in den Jahren 1952–1953 konstruiert haben.

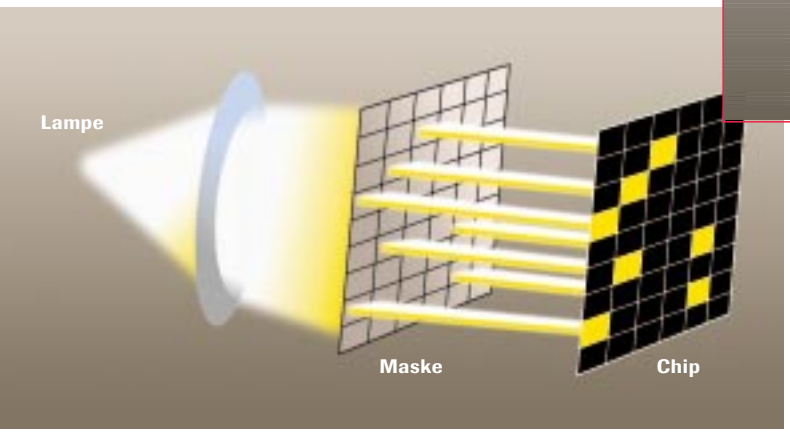
Wie der Titel dieses Artikels schon sagt, wird die Zukunft der Labordiagnostik durch Gene, Chips und Bits bestimmt sein.

Obwohl das *Humane Genomprojekt* in den allgemeinen Medien im Vergleich zu vor fünf Jahren kaum noch erwähnt wird, wird dieses Projekt von staatlichen Stellen und auch von mindestens einer privaten Initiative mit großer Energie vorangetrieben. Wir können davon ausgehen, dass die Sequenz des gesamten menschlichen Genoms (genau genommen, die Gensequenz von *James Watson*) innerhalb der nächsten fünf Jahren bekannt wird. Die epochale Bedeutung dieses Schrittes sollte nicht unterschätzt werden. Er ist durchaus mit der ersten Landung eines Menschens auf dem Mond oder mit der Entdeckung Australiens zu vergleichen. Das was hier erschlossen wird, ist wie ein bisher kaum bekannter Kontinent, der in uns selbst liegt. Nach bekannt werden der gesamten Genomsequenz wird die Identifizierung aller menschlichen Gene voraussichtlich sehr schnell erfolgen.

Die Identifizierung aller Gene beim Menschen ist jedoch nur der Anfang. Mit dieser „Rohinformation“ werden wir wenig anfangen können. Denn das Wissen der Gensequenzen allein wird uns in der Diagnostik und Therapie nicht viel weiter bringen. Vielmehr sind die Gene die Bausteine, die erst durch ihre Regulation und Interaktion mit anderen Genen zum

Herausforderung Genregulation

Leben erweckt werden. Man kann sich vorstellen, dass die Gene wie Musiknoten sind. Allein für sich ist die C-Dur-Tonart wenig interessant – wird sie jedoch am Anfang einer Partitur genutzt, wie der fünften Sinfonie von *Ludwig van Beethoven*, ist das etwas anderes. Aber hier wird auch das Problem sichtbar, das auf uns zukommt: Wir werden uns von unserer heutigen



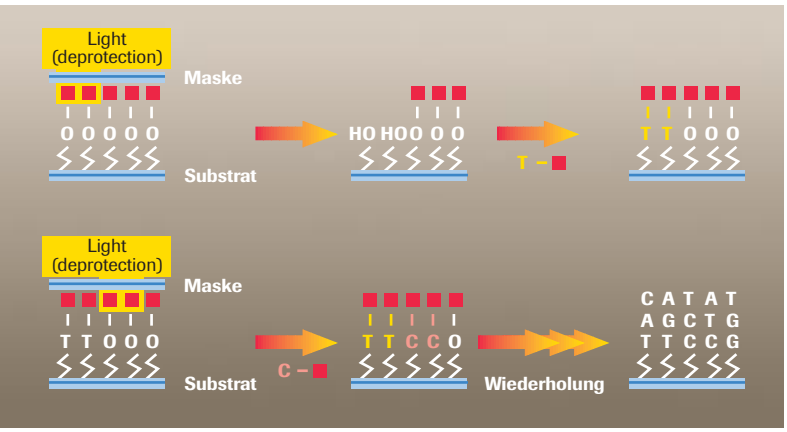


Abbildung 4: Genchip (oben) und Photolithographische Methode zur Herstellung von DNA-Chips. Im mittleren Bild wird gezeigt, wie UV-Licht benutzt wird, um die Chipoberfläche zu aktivieren. Mittels einer Maske wird erreicht, dass nur bestimmte Stellen aktiviert werden. Das untere Bild zeigt, wie durch sukzessive Verwendung verschiedener Masken bekannte Oligonukleotidsequenzen auf den Chip aufgebracht werden.

vergleichsweise statischen Sicht der Dinge verabschieden und uns viel mehr mit der Komplexität solcher Regulationsmechanismen und Interaktionen beschäftigen müssen.

Wie können wir dies tun? Die Antwort, Sie haben es geahnt, liebe Leserinnen und Leser, sind die Chips und die Bits.

Fangen wir mit den Bits an. Hiermit meine ich die moderne Datenverarbeitung, die es uns erst erlauben wird, die Menge an Daten, die uns die zukünftige Gendiagnostik liefern wird, sinnvoll zu verwalten. Die EDV-unterstützte Verwaltung, Bearbeitung und Auswertung solcher komplexen Daten wird als Bioinformatik bezeichnet. Man kann davon ausgehen, dass die Bioinformatik auch im medizinischen Laboratorium in Zukunft eine wichtige Rolle spielen wird. Es ist übrigens kein Zufall, dass die Entwicklung der Gentechnik und der Computertechnik sich auf parallel verlaufenden, exponentiell ansteigenden Kurven bewegen: erst die Entwicklung leistungsstarker Rechner hat die moderne Molekularbiologie möglich gemacht. Ohne sie hätte man zum Beispiel die enormen Sequenzdatenbanken, die bereits heute existieren, nie sinnvoll verwalten können.

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 Mikrochip aufgebracht, vergleichbar mit Borsten auf einer Bürste. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie DNA-Moleküle auf einen Chip aufgebracht werden können. Die amerikanische Firma *Affymetrix* verwendet dafür eine photolithographische Technik, die direkt aus der Computerindustrie stammt. Diese Technik wird in *Abbildung 4* erläutert. Dabei wird durch ultraviolettes Licht die Oberfläche des Chips aktiviert und die DNA anschließend Baustein für Baustein aufgebracht. Andere Unternehmen benutzen eine Methode, bei der die bereits fertigen DNA-Moleküle mit einer Art Tintenstrahldrucker auf den Chip aufgebracht („gespottet“) werden, während wiederum andere eine nasschemische Technik einsetzen, die aus der Offsetdruck-Technik abgeleitet wurde. *Abbildung 5* zeigt einen schematischen Ausschnitt eines Genchips in hoher Auflösung.

Die DNA enthält nur 4 Bausteine, die Nukleotide Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymidin (T). Jeweils drei Nukleotide kodieren für eine Aminosäure, TTT kodiert beispielsweise für die Aminosäure Phenylalanin. DNA hat die Eigenschaft, mit sich selbst in spezifischer Weise Bindungen einzugehen, dabei bindet C immer an G und A immer

Wie funktioniert ein Genchip?

an T. Eine Sequenz wie TATAGCCG würde demnach fest („mit hoher Affinität“) an die komplementäre Sequenz ATATCGGC, *und nur an diese Sequenz*, binden. Diese hochspezifische Bindung, die man als *Hybridisierung* bezeichnet, bildet die Grundlage für das Funktionieren eines Genchips. Die Mehrzahl der angeborenen Stoffwechselerkrankungen wird durch Fehler im genetischen Code verursacht. Wenn sich also im einfachsten Fall ein einziges falsches Nukleotid, beispielsweise statt des Nukleotides C ein G, in einem Gen befindet, kann das veränderte Genprodukt bereits zur Entstehung einer Krankheit führen. Mit einem Genchip kann eine derartig winzige Veränderung im Erbgut (eine sogenannte Punktmutation) zuverlässig erfasst werden.

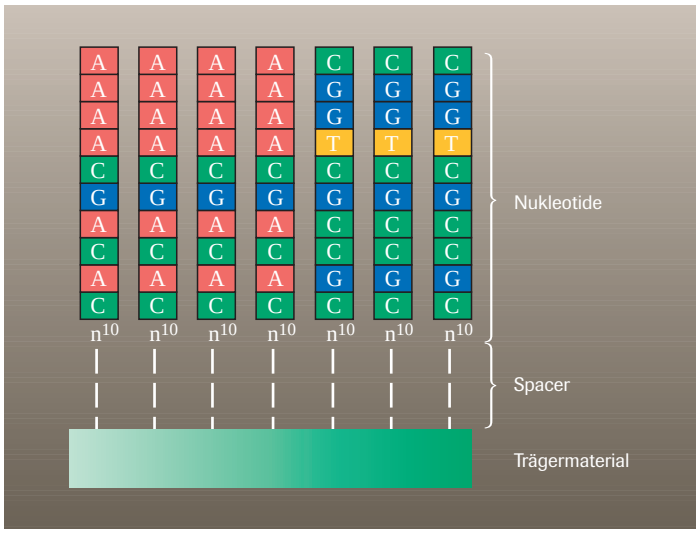


Abbildung 5: Schematischer Ausschnitt eines Genchips in hoher Auflösung.

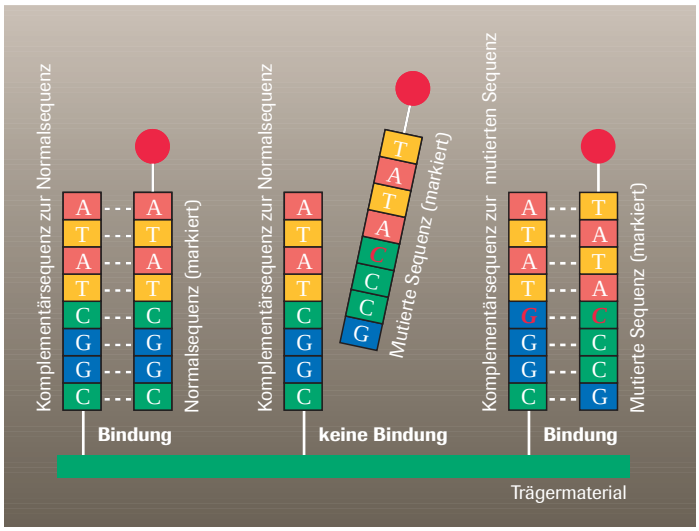


Abbildung 6: Prinzip der Hybridisierung auf einem Genchip. Die Komplementärsequenz zur normalen Gensequenz bindet die markierte normale DNA-Sequenz des Patienten (links), nicht aber die mutierte Sequenz des Patienten (Mitte). Dafür bindet die Komplementärsequenz zur mutierten Sequenz an die mutierte Sequenz des Patienten (rechts), nicht aber die Normalsequenz (nicht gezeigt).

Wie funktioniert das? Wenn die normale DNA-Sequenz im betreffenden Abschnitt eines bestimmten Gens TATAGCCG lautet, kann durch eine Punktmutation die Sequenz TATA<u>C</u>CCG entstehen. Wird auf dem Genchip die komplementäre DNA-Sequenz ATATCGGC aufgebracht, so wird nur die gesunde Sequenz TATAGCCG binden, nicht aber die mutierte Sequenz TATA<u>C</u>CCG *(Abbildung 6)*. Bei bekannten Mutationen lassen sich komplementäre DNA-Sequenzen auf den Chip aufbringen, an die dann nur die mutierte DNA-Sequenz bindet.

In der Praxis geht man so vor, dass aus einer Blutprobe die DNA des Patienten isoliert und in kleine Bruchstücke zerlegt wird. Die DNA-Bruchstücke werden mit einem Farbstoff markiert und mit der DNA auf dem Chip zusammengebracht. 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 hat zwei große Vorteile: Zum einen kann die Spezifität der DNA-Bindung an den Chip überprüft werden, zum anderen können Merkmalsträger, sog. Heterozygote, identifiziert werden. Bei ihnen findet sich ein Farbsignal sowohl an der Stelle der mutierten Sequenz als auch an der Position der Wildtyp-Sequenz, da sie von beiden Sequenzen jeweils eine Kopie besitzen.

Durch DNA-Chips können also Sequenzinformation sehr schnell und spezifisch erfasst werden.

Ein weiterer Einsatzbereich für Genchips, der meines Erachtens in Zukunft eine noch größere Bedeutung einnehmen wird als die Sequenzanalyse, liegt in der Möglichkeit, durch Genchips die Expression von mehreren tausend Genen gleichzeitig zu erfassen. Das menschliche Genom enthält etwa 100 000 Gene, von denen etwa 15 000 in einem beliebigen Zelltyp exprimiert werden. Durch Genchips ist es theoretisch möglich, alle 100 000 Gene auf einen Chip zu bringen. Wird dann die mRNA (Boten-RNA) aus einer Zelle extrahiert,

Erfassung von Genexpressionsmustern

zu cDNA (copy-DNA) umgeschrieben, markiert, und mit dem Chip hybridisiert, so wird er nur dort binden, wo die Komplementärsequenzen sich auf dem Chip befinden. Mehr noch, bei geeigneten Versuchsbedingungen hängt die Intensität des Signals von der Menge der sich in der Zelle befindenden mRNA ab. So wird es möglich sein, mittels DNA-Chips das Genexpressionsmuster einer Zelle mit einem Chip vollständig zu erfassen und mit dem Expressionsmuster anderer Zellen zu vergleichen. Diese Technik wird für die medizinischen Diagnostik und auch für die Therapieüberwachung in der Zukunft von sehr großer Bedeutung sein.

Die Genchiptechnologie und die Computertechnik werden die Labordiagnostik revolutionieren. Diese Entwicklung wird uns vor neue Herausforderungen stellen, insbesondere im Hinblick auf die sinnvolle Verwaltung und Auswertung der zu erwartenden Datenflut.

Priv.-Doz. Dr. Paul Cullen und Stefan Lorkowski
Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Institut für Arterioskleroseforschung, Universität Münster