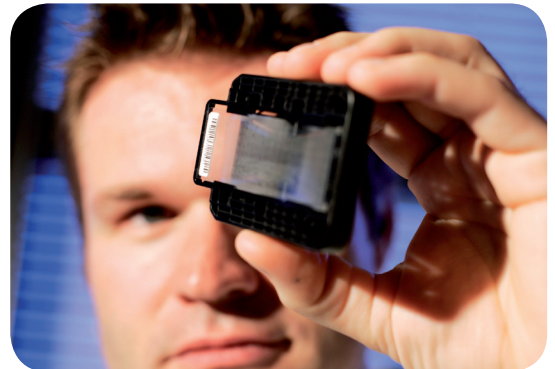


## Mit Fish ´n` Chips:

# GENETISCHE DIAGNOSEVERFAHREN

» Sie sind kaum größer als eine Münze, haben Platz für mehr als eine Millionen Felder und können Zehntausende von Genen zum Leuchten bringen: Biochips. Die mit Gensonden bestückten Plättchen helfen Medizinern, schnell und effektiv zu untersuchen, welche Gene in welchen Geweben und zu welchem Zeitpunkt abgelesen werden. So lassen sich Krankheiten präzise charakterisieren. Die unterschiedlich gefährlichen Verlaufsformen ein und derselben Krankheit können damit genauso auseinandergehalten werden wie zwei verschiedene Erkrankungen mit sehr ähnlichen Symptomen. Dieses Wissen hilft dann, eine auf die jeweilige Krankheit und den Patienten angepasste optimale Therapie zu wählen. Die Chips sind das prominenteste Beispiel für moderne genetische Diagnoseverfahren.



*Ein DNA-Chip besteht aus einer festen Unterlage, beispielsweise einem Glasträger, auf dem sich mehr als eine Millionen Felder befinden können. Auf jedem dieser Felder ist eine bestimmte Gensonde fixiert*

Grundlage des Verfahrens ist die Fähigkeit von Nukleinsäuren, Hybridmoleküle bilden zu können. Künstlich hergestellte DNA-Abschnitte mit bekannter Sequenz dienen dabei als Gensonden. Diese werden auf einer Oberfläche (Matrix) aus Glas oder einer Membran an genau festgelegten Stellen aufgebracht (immobilisiert). Sie arbeiten wie selektive Angelhaken, die nur einen bestimmten Fisch fangen können. Die „Fische“ sind hier sogenannte cDNA-Moleküle. cDNA ist die Abkürzung für „complementary-DNA“, ins Deutsche übersetzt: „komplementäre DNA“. Es handelt sich um einzelsträngige DNA-Kopien aller in der Zelle vorhandenen mRNAs. Diese Kopien werden mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase hergestellt. Diese Polymerase schreibt die Basenfolge der RNA in eine DNA-Sequenz um. Da mRNAs nur von den „aktiven“ Genen angefertigt werden, erhält man so Kopien aller Gene, die in einer bestimmten Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt abgelesen werden. Das Kopieren in cDNA ist dabei notwendig, da die mRNA instabil ist und schnell abgebaut wird. Die cDNA ist dagegen sehr stabil und kann schon während der Herstellung mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert werden.

**GENial:** Rot ist es normal, blau von vielen gewünscht und weiß ist es tödlich: das Blut. Bei weißem Blut, so die Übersetzung des Namens Leukämie, werden krankhaft zu viele weiße Blutkörperchen gebildet. Diese sind Teile der Immunabwehr. Bei einer Leukämie reifen sie nicht mehr richtig heran und können ihre Aufgabe nicht mehr wahrnehmen. Dabei gibt es **DIE Leukämie** an sich nicht, denn die Ursachen und der Verlauf der verschiedenen Blutkrebsformen können sehr unterschiedlich sein. Grundsätzlich lassen sich die myeloische und die lymphatische Leukämie unterscheiden, abhängig davon, aus welcher Zellart sie hervorgehen: Die myeloische Leukämie entsteht aus denjenigen unreifen weißen Blutzellen, die normalerweise im Knochenmark heranreifen. Die Bezeichnung „myeloisch“ ist aus dem Griechischen abgeleitet (myel = Mark). Bei den lymphatischen Leukämien bilden sich die Krebszellen dagegen aus denjenigen unreifen Blutzellen, die sich normalerweise in den Lymphgeweben oder im Thymus zu fertigen weißen Blutkörperchen entwickeln. Beide Leukämieformen lassen sich in eine akute und eine chronische Verlaufsform untergliedern. Akute Leukämien schreiten sehr rasch voran und können unbehandelt schnell zum Tod führen. Chronische Leukämien entwickeln sich schleichend und können lange ohne Symptome bleiben.

Bei 95 Prozent der **chronischen myeloischen Leukämien (CML)** kommt es zu einem gegenseitigen Austausch von Chromosomenbruchstücken (vgl. Modul 1: Chromosomenmutationen, Translokation) zwischen den Chromosomen 9 und 22. Dabei entsteht ein verkürztes Chromosom 22, das **Philadelphia-Chromosom**. Das Bruchstück des Gens c-abl von Chromosom 9 bildet mit dem bcr-Gen von Chromosom 22 ein neues, sogenanntes Fusionsgen, welches für das funktionsfähige Protein bcr/abl codiert.

Das durch das Gen c-abl kodierte Protein ist eine sogenannte Kinase, also ein Enzym, das in Signalwegen Phosphatgruppen auf andere Proteine überträgt. Die abl-Kinase spielt eine wichtige Rolle beim Wachstum einer Zelle: Durch die Übertragung der Phosphatgruppen wird ein Signal ausgelöst, durch das die Nachricht „Wachsen, Überleben, Vermehren“ in den Zellkern transportiert wird. Dort werden dann Gene angeschaltet, die für das Wachstum und die Zellvermehrung notwendig sind. In gesunden Zellen wird die Aktivität des abl-Proteins genau reguliert, damit die Zelle sich wirklich nur dann vermehrt, wenn es notwendig ist. Unter dem Einfluss des fehlerhaft hinzugekommenen bcr-Teils ist das Fusionsprotein bcr/abl permanent aktiv. Die fehlerhafte, daueraktive Kinase regt dann die Zelle zu unkontrolliertem Wachstum an.

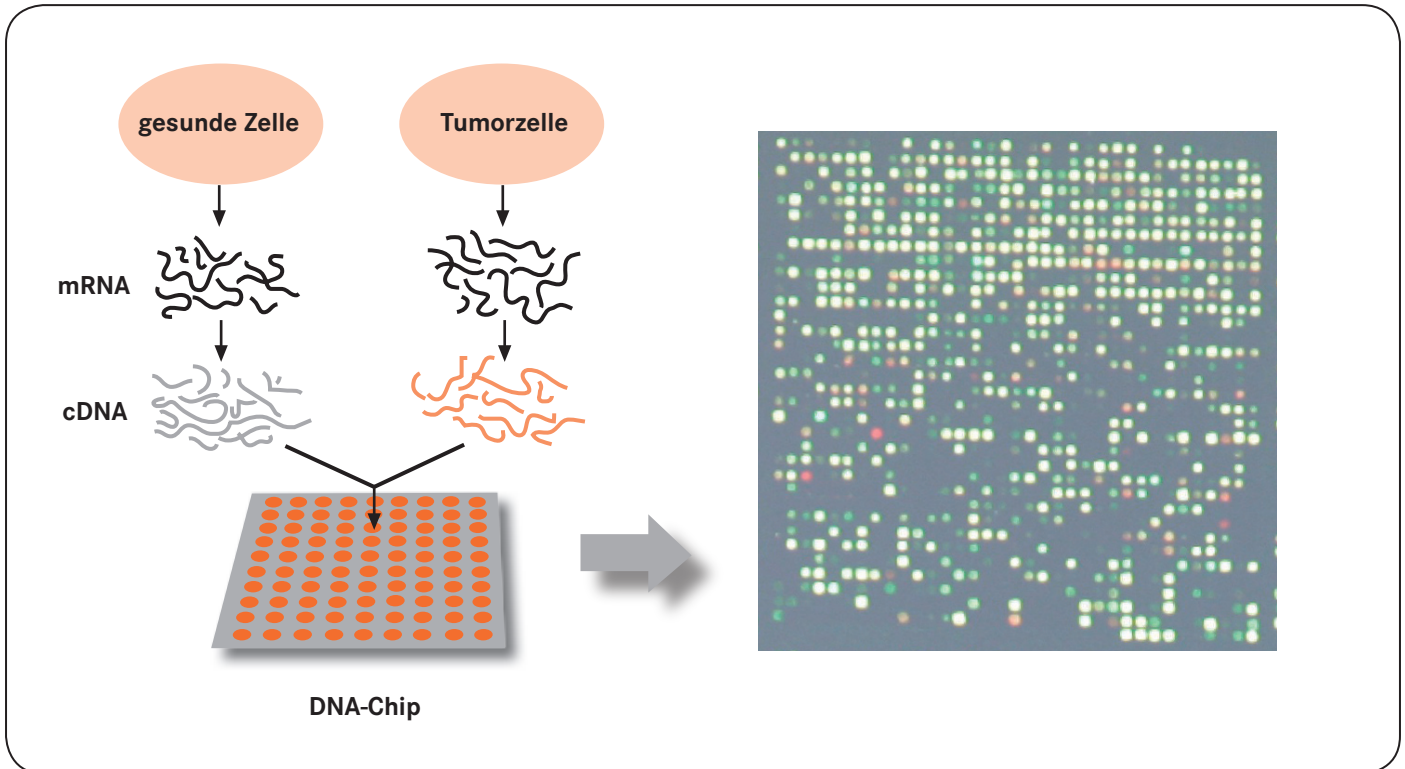


Abbildung 1: Wie ein DNA-Chip funktioniert: Die mRNA-Moleküle der zu untersuchenden Zelltypen werden isoliert und in cDNA übersetzt. Die cDNA-Fragmente werden anschließend mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, beispielsweise die cDNA-Fragmente der Krebszellen rot und die der gesunden Zellen grün. Die beiden Ansätze werden im folgenden Schritt gemischt und als kleine Tröpfchen von einem Pipettierroboter auf jedes Feld des Chips gegeben. Wenn es in dem Gemisch ein cDNA-Fragment gibt, das genau zu der Sonde des jeweiligen Chip-Feldes passt – es also komplementär ist, dann bindet es sich an die Sonde. Aufgrund der Fluoreszenzmarkierung leuchtet das entsprechende Feld dann unter Laserlicht farblich auf. Gene, die spezifisch für Krebszellen sind, würden in diesem Ansatz rot leuchten, während Gene, die nur in gesunden Zellen abgelesen werden, grüne Signale ergeben. Ein Gen wiederum, das in beiden Zellarten aktiv ist, würde aufgrund der Farbüberlappung gelb dargestellt werden. Ein Vergleich dieser Farbsignale deckt die Unterschiede der genetischen Aktivität beider Zelltypen auf.

Trifft nun eine solche cDNA auf dem Biochip auf einen DNA-Abschnitt mit komplementärer Basenfolge, verbindet sie sich mit diesem über Wasserstoffbrücken. Nachdem durch mehrmaliges „Waschen“ der Biochips die ungebundene DNA entfernt wurde, werden die Lichtsignale des Farbstoffs, die das Vorhandensein der gesuchten Gene anzeigen, mithilfe digitaler Bildanalyseverfahren ausgewertet.

Interessiert einen Arzt zum Beispiel, welche Gene nur in einer Tumorzelle – und nicht in einer gesunden Zelle – in Eiweiße übersetzt werden, kann er mithilfe eines Biochips untersuchen, welche mRNA-Moleküle von der Tumorzelle und welche von der gesunden Zelle hergestellt werden (s. Abb. 1) und damit die Aktivität von Genen in den unterschiedlichen Geweben vergleichen. Mithilfe der so gewonnenen Genmuster können Tumoren sehr viel besser untersucht werden als mit den herkömmlichen Verfahren. So kann in vielen Fällen vorhergesagt werden, ob es sich bei einem bestimmten Tumor um ein fortgeschrittenes Stadium mit aggressiven Eigenschaften handelt oder um einen gutartigen, sich vielleicht sogar spontan zurückbildenden Tumor.

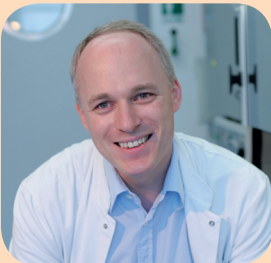
Neben den Biochips hat sich die FisH – die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung – als Verfahren zur Genanalyse etabliert. Eingesetzt wird diese Methode unter anderem in der Krebsdiagnostik. Das Prinzip ist ähnlich wie bei den Biochips: DNA-Sonden, deren Sequenzen bekannt sind, werden eingesetzt, um das passende, komplementäre Gegenstück zu finden. Anders als bei den Biochips sind die DNA-Sonden bei der FisH aber nicht auf einer Matrix fixiert, sondern der Nachweis findet im Gewebe, also direkt am Ort des Geschehens statt (in situ = lat. am Platz).

Um Unterschiede in der Genaktivität von Tumoren und gesunden Zellen erkennen zu können, hat sich eine besondere Form der FisH bewährt: die vergleichende genomische Hybridisierung (comparative genomic hybridization, CGH). Zunächst wird das gesamte Tumorgewebe zerkleinert und die Tumor-DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff – beispielsweise rot – gekoppelt. Die

DNA gesunder Kontrollzellen wird mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff – z. B. grün – markiert. Beide DNA-Ansätze werden schließlich simultan auf normalen Metaphasechromosomen hybridisiert. Durch das Muster der Farben – Rot, Grün oder die Mischfarbe Gelb – wird sichtbar, an welchen Stellen der Chromosomen in den Krebszellen es zu DNA-Verlusten gekommen ist und wo zusätzliche DNA fälschlicherweise eingebaut wurde. Wenn der DNA-Faden der Krebszellen-Chromosomen in einigen Bereichen verdoppelt wurde, gibt es mehr farblich markierte Tumor-DNA, die sich an der entsprechenden Stelle des Testchromosoms ansammelt. Das Chromosom leuchtet dann an dieser Stelle rot, weil die rote Farbe der zahlreichen Tumor-DNA-Kopien die grüne Farbe der wenigen DNA-Kopien des entsprechenden Erbgutbereiches aus den gesunden Zellen überlagert. Gingen in den Krebszellen Chromosomenabschnitte verloren, ist das Farbsignal an der entsprechenden Stelle des Testchromosoms grün, weil es keine rote Tumor-DNA gibt, die dort andocken kann und sich deshalb nur die DNA-Moleküle anlagern, die aus den gesunden Zellen extrahiert wurden.

Mit einem anderen Ansatz verfolgt der im NGFN geförderte Mediziner Nikolas von Bubnoff von der Technischen Universität München das Ziel, den individuellen Charakter von Krebszellen besser erkennen zu können. Der Wissenschaftler hat mit Kollegen eine Methode entwickelt, mit der sich mögliche Resistenzen von Krebszellen gegen bestimmte Medikamente vorhersagen lassen. Bekanntestes Beispiel dieser Medikamentengruppe, der sogenannten Tyrosinkinase-Hemmer, ist der Wirkstoff Imatinib-Mesylat, der seit 2001 unter dem Handelsnamen Glivec® bei chronischer myeloischer Leukämie (CML) eingesetzt wird.

**F r a G E N a n :** Dr. Nikolas von Bubnoff, III. Medizinische Klinik und Poliklinik, Klinikum rechts der Isar, TU München



Nikolas von Bubnoff

**Herr Dr. von Bubnoff, wie kann es passieren, dass Krebsmedikamente ihre Wirksamkeit einbüßen und Krebszellen resistent werden?**

*Imatinib lagert sich an den abl-Teil des Proteins bcr/abl, das für die Leukämie verantwortlich ist. Der Wirkstoff macht das Protein – eine Kinase – aktionsunfähig und die kranken Blutzellen sterben ab. Leider werden bei einem Teil der Patienten die Blutzellen aber unempfindlich gegenüber Imatinib. Die Ursache hierfür sind Fehler bei der Verdopplung der DNA. Diese Mutationen werden in Leukämiezellen nicht korrekt repariert. Hierdurch kann es zu kleinen Strukturveränderungen im bcr/abl-Protein kommen, die dazu führen, dass sich die Bindungsstelle für Imatinib „verformt“. Die Bindung von Imatinib wird dadurch verhindert und das Medikament verliert seine Wirkung. Wir und andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass mehrere dieser Punktmutationen an unterschiedlichen Positionen des abl-Teils von bcr/abl eine Resistenz gegenüber Imatinib verursachen können.*

**Wie funktioniert das von Ihnen entwickelte Verfahren, spezifische „Resistenzprofile“ für therapeutisch eingesetzte Medikamente vorherzusagen?**

Bei dieser Methode geben wir eine kinasehemmende Substanz zu in Nährlösung gezüchteten Zellen, die bcr/abl in ihrem Erbgut tragen. Dadurch stirbt der größte Teil der Blutkrebs-Zellen ab. Nur einzelne Zellen überleben – nämlich solche mit Veränderungen, die eine Resistenz verursachen. Wir wissen aus der Anwendung dieser Methode mit Imatinib, dass die hierbei beobachteten Veränderungen genau denen entsprechen, die auch bei Patienten mit CML und Resistenz gegenüber Imatinib beobachtet werden. Mittlerweile haben wir diese Methode außer bei der CML bei einer Reihe von anderen Erkrankungen erfolgreich angewendet, bei denen ähnliche Mechanismen zur Entstehung und Aufrechterhaltung der Erkrankung beitragen und für die therapeutisch einsetzbare Kinase-Hemmer zur Verfügung stehen. Dazu gehören bestimmte Formen der akuten Leukämie und Lungentumoren.

**AUFGABEN:**

- 1. Erklären Sie das Prinzip eines DNA-Chips. Was sind die wesentlichen Unterschiede zur vergleichenden genomischen Hybridisierung?**
- 2. Erklären Sie, wie sich Resistenzen gegen Medikamente bilden können und wie Wissenschaftler versuchen, diese vorherzusagen.**
- 3. Lesen Sie die Pressemitteilung des NGFN über den genetischen Test zur Aggressivität des Neuroblastoms. Wie wird ermittelt, ob der Krankheitsverlauf eine gute oder eine schlechte Prognose hat? Warum bekommt nicht einfach jeder Patient eine Chemotherapie unabhängig von der Prognose?**

## NGFN e W S : Pressemitteilung des NGFN vom 8. November 2006

### GENETISCHER TEST PRÜFT AGGRESSIVITÄT BEIM NEUROBLASTOM

Zu den Krebsarten, die Kinder besonders häufig treffen, gehören die Neuroblastome. Ein bis drei von 100.000 Mädchen und Jungen erkranken bis zum 14. Lebensjahr an dieser heimtückischen Wucherung des Nervensystems. Wissenschaftler des Nationalen Genomforschungsnetzes (NGFN) haben eine Methode entwickelt, um die Aggressivität des Neuroblastoms schon zum Zeitpunkt der Diagnose beurteilen zu können.

Eine Besonderheit des Neuroblastoms ist, dass sich rund zehn Prozent der Tumoren, selbst wenn sie bereits Metastasen gebildet haben, ohne Behandlung spontan zurückbilden. „Neuroblastome haben einen sehr variablen Krankheitsverlauf. In manchen Fällen verschwindet der Tumor wieder von selbst, andere Patienten sterben trotz intensiver Behandlung“, erläutert Dr. Frank Westermann vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg. „Mithilfe unseres Tests wird es möglich sein, das Risiko des einzelnen Patienten genauer abzuschätzen.“ Damit können die Wissenschaftler nicht nur die Therapie besser individuell abstimmen, sondern auch Patienten mit guter Prognose eine unnötige belastende Chemotherapie ersparen.

In der bislang weltweit größten Neuroblastom-Studie untersuchten Westermann und Dr. Benedikt Brors aus dem Krebsforschungszentrum gemeinsam mit Dr. Matthias Fischer von der Universität zu Köln das Tumormaterial von insgesamt 251 Patienten. Das Forschungsvorhaben wurde vom Nationalen Genomforschungsnetz (NGFN) und von der Deutschen Krebshilfe unterstützt.

Die Wissenschaftler ermittelten 144 Gene, deren Aktivität charakteristisch für den Verlauf der Erkrankung ist. Einige dieser Gene sind bei einem eher bösartigen Neuroblastom aktiv, während andere in relativ gutartigen Tumoren stärker abgelesen werden. Mithilfe eines Gen-Chips können die Wissenschaftler nun Tumorproben auf diese Genaktivitäten untersuchen und anschließend den weiteren Verlauf der Erkrankung abschätzen. Die NGFN-Forscher testeten den Gen-Chip an weiteren 174 Tumorproben. Dabei bestätigte sich die hohe Zuverlässigkeit des genetischen Tests: Die Genauigkeit, mit der der Verlauf der Krankheit vorhergesagt werden kann, lag bei 93 Prozent. Das ist deutlich mehr als bei den bisher angewendeten Methoden zur Klassifizierung von Neuroblastomen. Zudem konnte der Gentest Patienten herausfiltern, die nach der herkömmlichen Kategorisierung nicht behandelt worden wären, deren Krankheit dann aber doch unerwartet bösartig verlief. Eine rechtzeitige Therapie könnte in solchen Fällen lebensverlängernd wirken.

Die hier dargestellten Ergebnisse werden in der aktuellen Ausgabe der Fachzeitschrift *Journal of Clinical Oncology* veröffentlicht.

GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung