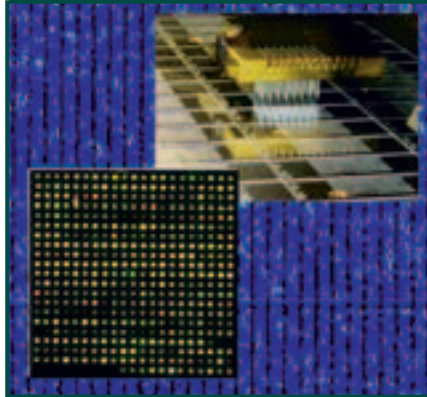


DNA-Microarrays in der Routine

DNA-Microarrays sind ein Synonym für die praktische Umsetzung der Ergebnisse aus genomischer Forschung. Auf einer kleinen Oberfläche werden dabei synthetische DNA-Moleküle in einem geordneten Raster aufgebracht, die jeweils ein Gen, einen Sequenz-Polymorphismus oder ein sonstig funktionell wichtiges Stück DNA repräsentieren.



1 Beispiele für DNA-Microarrays. Als Hintergrund ist Teil eines Chips des Geniom Systems der Firma febit zu sehen, der durch lichtgesteuerte in situ Synthese von Oligonukleotiden benutzer-spezifisch gestaltet werden kann. Im Vordergrund ist das Aufbringen von DNA mittels Robotern und Teil einer Zweifarbenhybridisierung auf einem solchen Microarray gezeigt.

DR. JÖRG D. HOHEISEL*

Aufgrund der sehr geringen Menge können sehr viele verschiedene Moleküle in einem Raster aufgebracht und viele identische Raster hergestellt werden, so dass die Analyse hochparallel ablaufen kann. Darauf werden dann Nukleinsäure-Isolate aus dem zu untersuchenden Zellmaterial hybridisiert. Durch die Miniaturisierung wird dabei relativ wenig Probenmaterial verbraucht, was für klinische Anwendungen wichtig ist. Während der Hybridisierung werden die unterschiedlichen Moleküle der komplexen Probenmischung physikalisch getrennt, da sie nur an die jeweils komplementären Moleküle auf dem Chip binden. Für jede Rasterposition des Microarrays wird dann die Menge an gebundenen Nukleinsäuremolekülen bestimmt, zurzeit meist durch den

Nachweis von Fluoreszenzfarbstoffen, die an das Probenmaterial gebunden wurden. Während sich die Mehrzahl der Anwendungen noch im präklinischen Bereich abspielen, hat die Technologie auf einigen Gebieten einen Stand erreicht, der eine Nutzung im Routinebetrieb möglich macht. Mit fortschreitender Entwicklung – mehr auf der biomedizinischen Seite als ingeneurtechnologisch – werden mehr und mehr Tests eine Qualität erreichen, die für klinische Anwendungen oder beispielsweise für eine Qualitätssicherung im Lebensmittelbereich ausreichen wird. Dennoch wird eine Reihe von Testverfahren wohl ihre erste Bewährungsprobe auf Anwendungsgebieten finden, die nicht ganz so kritisch sind, wie etwa in der Tier- und Pflanzenzucht.

Diagnose

Die Stellung einer Diagnose ist die wohl „einfachste“ Anwendung von Microarrays. Eine Klassifizierung pathogener Organis-

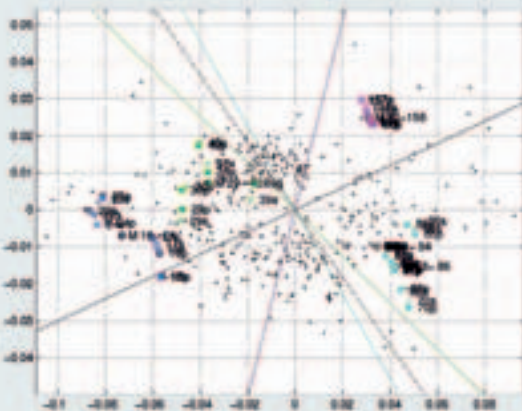
men etwa kann durch den Nachweis bestimmter Sequenzen erfolgen. Im Labor für Funktionelle Genomanalyse am DKFZ wurde beispielsweise ein Chip entwickelt, der eine Typisierung aller sequenzierten menschlichen Papillomaviren erlaubt. Mittels eines gemeinsamen Primerpaars wird ein Fragment jeder in menschlichen Zellen vorhandenen viralen DNA amplifiziert und anschließend auf dem Chip charakterisiert. In einer anderen Anwendung arbeitet ein Microarray der Firma Affymetrix zur Bestimmung aller Mutationen im Tumorsuppressor-Gen p53 mindestens so gut wie der jetzige Goldstandard DNA-Sequenzierung, so dass auch dort die notwendige Genauigkeit gegeben ist. Für alle solch einfachen Testverfahren müssen nur die im jeweiligen Fall relevanten Basenaustausche bekannt sein, um sie mit hoher Qualität nachweisen zu können. Da die Interpretation der Ergebnisse recht einfach zu bewerkstelligen ist, sind viele solcher Anwendungen grundsätzlich bereit zur Umsetzung in der Routine.

Prognose

Eine weitere Stufe der Komplexität ist die Erstellung einer Diagnose von komplexeren Krankheitsverläufen, an die sich üblicherweise eine Prognosestellung anschließt. "Comparative Genomic Hybridisation" (CGH) erlaubt beispielsweise die Detektion von Amplifikationen oder Deletionen in der genomischen DNA, die etwa für bestimmte Krebsformen spezifisch sind. Gleichzeitig wird damit eine Prognose über den Krankheitsverlauf möglich. Gleiches gilt für transkriptionelle Studien. Veränderungen in der Transkriptmenge bestimmter Gene sind häufig ein Merkmal für den molekularen (Sub-) Typ des Tu-

*Dr. J. D. Hoheisel, Deutsches Krebsforschungszentrum, 69120 Heidelberg

2 Unterteilung von Tumoren mittels transkriptioneller Untersuchungen an etwa 3200 Genen, die für die Tumorbildung in Pancreas von Relevanz sind. Die farbigen Quadrate definieren Tumore einzelner Personen. Die Transkript-Profile wurden nach statischen Verfahren analysiert und entsprechend dargestellt. Die räumliche Aufteilung in Patientengruppen verdeutlicht den klaren molekularen Unterschied zwischen verschiedenen Tumorentypen, die unterschiedlich farbig gekennzeichnet sind, bei gleichzeitig einem recht hohen Grad an Homogenität innerhalb der Gruppen.



mors (Abb. 2) wie auch die Konstitution des Patienten. Auch Einzelbasenaustausche können als Kennzeichen dafür dienen, mit welcher Wahrscheinlichkeit und wie eine Krankheit sich entwickeln wird. Letztlich lassen sich selbst chemische Modifikationen wie DNA-Methylierung, die wiederum kritische Marker für funktionell-zelluläre Aspekte sind, als Basenaustausche darstellen und somit diagnostisch nutzen.

Für all diese Analysen fehlt im Augenblick aber häufig noch die statistische Basis; es müssen erst Untersuchungen an größeren, epidemiologisch gut definierten Bevölkerungsgruppen durchgeführt werden, um die breite Relevanz der gewonnenen Aussagen zu manifestieren.

Therapie

Es besteht kein Zweifel, dass die funktionelle Genomforschung allgemein und Microarrays im Speziellen einen wichtigen Beitrag zur Identifizierung neuer Wirkorte und damit Wirkstoffe leistet und die Fokussierung auf solche mit besserer Erfolgsaussicht beschleunigt. Der Flaschenhals liegt im Moment aber mehr bei der Interpretierbarkeit der generierten Datenmengen, und auch im grundsätzlichen Design der Studien. Trotzdem ist in der letzten, wirtschaftlich schwierigen Zeit einige Kritik an der Leistungsfähigkeit der Analysen aufgekommen. Diese liegt aber hauptsächlich in den überzogenen Erwartungen begründet, die nicht zuletzt durch den Biotech-"Boom" und somit aus kommerziellen Gründen geweckt wurden. Es ist unbestreitbar, dass die Genomforschung und dabei speziell auch die Transkript Profilierung von Zellen und Geweben eine Fülle neuer Wirkorte identifiziert hat, selbst in Bereichen, in denen während der letzten Jahrzehnte keinerlei Neuentwicklung stattfand. Ein häufiger Kritikpunkt ist die bisher scheinbar so geringe Ausbeute an neuen Wirkstoffen, die sich daraus ergeben haben. Dies liegt aber nur daran, dass Genomforschung den Prozess der Wirkstoffentwicklung nicht unmittelbar beschleunigt. Es werden nur parallel wesentlich mehr interessante Wirkorte identifiziert, so dass parallel an verschiedenen Wirkmechanismen gearbeitet werden

kann, mit verbesserten Chancen auf Erfolg. Tatsächlich ist die Zahl an "validierten Targets" augenblicklich so groß, dass eine quasi Sättigung des Marktes entstanden ist. Die zeitliche Spanne zwischen Entdeckung eines interessanten Wirkmechanismus und Produkteinführung jedoch ist im Einzelfall nicht wesentlich verkürzt. Ein anderer Kritikpunkt ist der enorme Kostenanstieg in der Entwicklung von Pharmaka trotz der Anwendung von genomanalytischen Verfahren. Auch dies ist aber wiederum ein Fehlschluss; nur ein sehr kleiner Teil des gesamten Kostenanstiegs wird durch die Einführung der neuen Verfahren verursacht.

Markt

Nichtsdestotrotz ist der Kostenfaktor ein kritischer Punkt für die Etablierung von Microarrays als Mittel der Routine-Anwendung. Noch sind die Kosten zu hoch, um in vielen Fällen den noch relativ geringen tatsächlichen Gewinn an Information kaufmännisch rechtfertigen zu können. Dieses Argument schlägt um so mehr zu Buche, als die Genomforschung mit dem Anspruch ins Rennen gegangen ist, Analysen aller Art wesentlich billiger zu machen. Noch ist das Microarray-Geschäft aber hauptsächlich auf die Forschung ausgerichtet, und damit im oberen Preissegment angesiedelt. Mit der Konsolidierung des Marktes und dem Einstieg von Firmen, die ursprünglich aus anderen Geschäftsfeldern kommen aber neue Vermarktungsstrategien und Zielgruppen einbringen, werden Microarray-Analysen wesentlich billiger werden und dann in einer breiten Anwendung ihr volles Potential entfalten können. Gleichzeitig müssen die Tests vereinfacht werden, so dass nur noch die wirklich wesentlichen Moleküle auf dem jeweiligen Chip vorliegen. Aufgrund der Komplexität des menschlichen Körpers und anderer biologischer Systeme, wird in den meisten Fällen ein Zurückgehen auf einen Marker

nicht möglich sein, so dass Microarrays – oder ähnlich geartete Verfahren – auch dann zwingend notwendig sein werden.

Ein nicht unwichtiger Faktor, der augenblicklich nur schwer abschätzbar ist, liegt in der Akzeptanz der Microarrays in der Routinediagnostik, ein Problem auch wegen der rasanten Entwicklung des Feldes. Für einige Anwendungen gibt es Verfahren, die zum Teil mit recht großem finanziellen Aufwand etabliert wurden. Dort müssen sich die vorhandenen Mittel erst amortisieren bevor neu investiert wird. Aber auch dort, wo keine Alternative besteht, ist die tatsächliche Akzeptanz nur zögerlich. Mehrere Firmen, die Microarrays für Nichtforschungszwecke anbieten, haben in der letzten Zeit diese Erfahrung gemacht. Gute Qualität sichert noch nicht eine gute Markteinführung.

... und Zukunft

Die Entwicklung der Microarrays ist bei weitem noch nicht abgeschlossen. Speziell markierungsfreie Nachweisverfahren werden entwickelt. Aber auch bereits etablierte Methoden können noch wesentlich verbessert werden. Die Nachweisgrenze ist z.B. noch recht schlecht und muss für einige Analysen sicherlich noch weit verbessert werden, hin bis zum Nachweis von Einzeleignissen. Auch sind transkriptionelle Studien beispielsweise zurzeit bestenfalls semi-quantitativ. Eine wirklich quantitative Bestimmung der RNA-Mengen ist für viele Anwendungen aber wünschenswert oder gar Voraussetzung, und grundsätzlich auch durchaus möglich. In einer weiteren Analogie zur Entwicklung von Computern wird bei Microarray-Systemen ein Gerät beim Kauf bereits „veraltet“ sein, weil die Entwicklung rasant weiter geht. Dennoch gibt es wie im Bereich Computertechnologie auf Dauer keine wirkliche Alternative. LP

Weitere Informationen:
www.laborpraxis.de
InfoClick 111967
 • Die Arbeitsgruppe Funktionelle Genomanalyse am Deutschen Krebsforschungszentrum
 Fax: +49 (0 62 21) 42 - 46 87