

Sind die Methoden schon praxisreif?

Anwendung von DNA-Chips in der gastrointestinalen Onkologie

M. Buchholz, W. Böck, Th.M. Gress

Abteilung Innere Medizin I, Universität Ulm
(Klinikdirektor: Prof. Dr. G. Adler)

Das humane Genom besitzt nach derzeitigem Kenntnisstand zwischen 30 000–40 000 Gene und somit weniger als ursprünglich angenommen (2, 5). Seine Komplexität resultiert jedoch nicht allein aus der Zahl der Gene, sondern aus der Kombination verschiedenster Regulations- und Kontrollmechanismen, die auf der Ebene der Transkription, der mRNA-Prozessierung, der Translation und der Proteinprozessierung ansetzen. Um diese Komplexität bei der Steuerung physiologischer oder pathophysiologischer Prozesse in Geweben oder Zellen adäquat zu erfassen, bedarf es biotechnologischer Hochdurchsatzmethoden wie der DNA-Chip/Array-Technologie.

So erlaubt es diese Technologie, die Aktivität einer Vielzahl von Genen simultan in einem einzelnen Untersuchungsschritt zu bestimmen. Nicht nur für die Grundlagenforschung, sondern auch für die molekulare und klinische Medizin – insbesondere auf dem Gebiet der Onkologie –, werden diese Analysen wertvolle Erkenntnisse liefern.

■ Technologischer Hintergrund

Das Prinzip der DNA-Chip/Array-Analyse beruht ähnlich wie das der „Northern-“ oder „Southern-Blot“-

Die klinische Anwendung der DNA-Chip/Array-Technologie verspricht für die Zukunft wesentliche Fortschritte in der exakten Diagnose und individualisierten Behandlung von Tumorerkrankungen. DNA-Chip/Array-Analysen können wertvolle Informationen über Herkunft, proliferatives und metastatisches Potenzial sowie die Therapierbarkeit eines Tumors beisteuern. In der onkologischen Grundlagenforschung ist sie bereits heute kaum mehr wegzudenken. Auch wenn DNA-Chips/Arrays bis auf wenige Ausnahmen noch ein gutes Stück von der Anwendung der klinischen Routine entfernt sind, ist zu erwarten, dass diese Technologie in der nahen Zukunft zum diagnostischen Standardrepertoire des klinischen Onkologen gehören wird.

Analysen auf der Eigenschaft von Nukleinsäuren, mit Komplementärsträngen passender Sequenz sehr spezifisch stabile Doppelstränge auszubilden. Für die Herstellung der Arrays werden mithilfe von Robotersystemen kurze Sequenzabschnitte für jedes zu untersuchende Gen in hoher Dichte und nach präzisen Mustern auf festen Oberflächen immobilisiert. Als Trägermaterialien dienen in der Regel speziell beschichtete Glasobjektträger („DNA-Chips“ im engeren Sinne) oder Nylonmembranen, seltener Kunststoffoberflächen.

Die Genfragmente werden entweder in Mikrotiterplatten vorgelegt und von Präzisions-Robotern auf das Trägermaterial übertragen („Spotting“; Abb. 1) oder in Form von kurzen Oligonukleotiden auf chemischem Wege direkt auf dem Träger synthetisiert. Das Ergebnis sind regelmäßige Anordnungen (so

genannte „Arrays“) von immobilisierten ungepaarten Genfragmenten, die im Falle von Glas-Chips eine Dichte von bis zu 10 000 Genen pro cm² erreichen können.

Für die als Expressionsprofil-Analyse bezeichnete Untersuchung von Zellen oder Geweben wird der gesamte mRNA-Bestand der Probe präpariert, mit Fluoreszenzfarbstoffen oder radioaktiven Isotopen markiert und in einem als Hybridisierung bezeichneten Prozess mit dem Array inkubiert. Bei der Hybridisierung bilden die markierten Nukleinsäuremoleküle mit ihren auf dem Array immobilisierten Gegenstücken stabile Doppelstränge aus. Sie können mithilfe eines Fluoreszenz- oder Radioaktivitäts-Scanners detektiert werden.

Im Ergebnis erhält man für jedes auf dem Array repräsentierte Gen ein Signal, dessen Intensität proportional zu der in der analysierten

Probe vorhandenen mRNA-Menge für dieses Gen ist. Die Expressionsprofil-Analyse liefert also ein Maß für die transkriptionelle Aktivität der auf dem Array repräsentierten Gene und damit in erster Näherung ein Maß für die biologische Aktivität der zugehörigen Proteine.

Suche nach Zielgenen

Eine konzeptionell sehr nahe liegende Einsatzmöglichkeit für die Array-Technologie in der Onkologie besteht in der Suche nach einzelnen Zielgenen für neue Ansätze in der Diagnostik und Therapie von Tumoren. Aus der Vielzahl von Genen, die in Expressionsprofil-Analysen parallel untersucht werden können, las-

sen sich mit einfachen statistischen Verfahren sehr schnell Gene identifizieren, die überwiegend oder sogar ausschließlich in Tumorgeweben, nicht aber in Normalgeweben aktiviert sind.

Aus diagnostischen Gesichtspunkten sind zum Beispiel onkofötale Gene von besonderem Interesse. Ein Beispiel ist das in unserer eigenen Arbeitsgruppe mithilfe von Expressionsprofil-Analysen isolierte *KOC*-Gen, das für ein neuartiges RNA-bindendes Protein kodiert (4). In ersten klinischen Studien mit Material aus Feinnadelpunktionen und Sekreten konnten wir zeigen, dass PCR-basierte (PCR = „polymerase chain reaction“) diagnostische

Tests zum Nachweis der Aktivität dieses Gens mit einer Spezifität von etwa 91% und einer Sensitivität von ungefähr 97% maligne Zellen im Punktionsmaterial detektieren. Besonders bei zytologisch nicht eindeutigen Befunden kann dies die Diagnosestellung entscheidend verbessern.

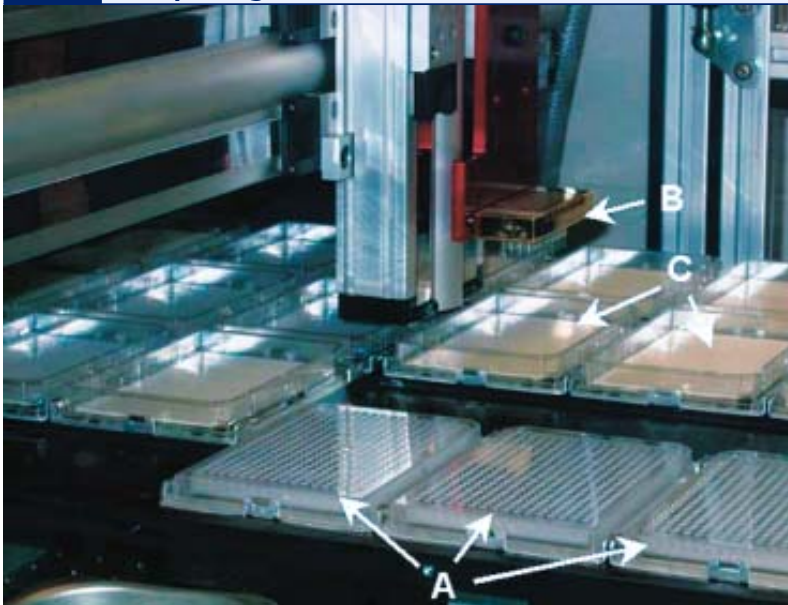
Therapeutische Zielgene müssen zusätzlich zur tumorspezifischen Expression Angriffspunkte für potenzielle Interventionsstrategien bieten. Anhand von Expressionsprofil-Analysen des Pankreaskarzinoms konnten wir kürzlich belegen, dass das Gen für das „Tight-Junction“-Protein Claudin-4 im Pankreaskarzinom stark überexprimiert wird. Im normalen Pankreas ist eine Aktivität dagegen nicht nachweisbar. Das normalerweise im Darmepithel lokalisierte Claudin-4-Protein dient neben seiner physiologischen Funktion auch als Rezeptor für das zytotoxische Clostridium-perfringens-Enterotoxin (CPE), dem Auslöser von Reisediarrhöen.

Im Tierversuch mit subkutan implantierten Claudin-4-exprimierenden Pankreastumoren in immundefizienten Mäusen war zu beobachten, dass die intratumorale CPE-Injektion zur effizienten Lyse der Tumorzellen und zu einer deutlichen Verkleinerung der Tumore führt. Claudin-4-negatives Gewebe dagegen wird nicht geschädigt (Abb. 2; (3)). Damit ist Claudin-4 eines der ersten therapeutischen Zielgene, das über Expressionsprofil-Analysen identifiziert wurde.

Eine Vielzahl wertvoller Informationen

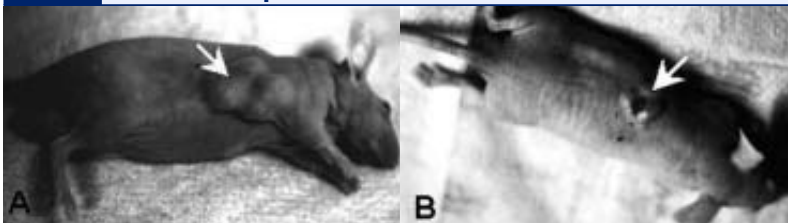
Die Möglichkeiten der Array-Technologie gehen jedoch weit über die Anwendung als bloßes Kandidatengenen-Screening hinaus. In der Analyse der enormen Datenmengen, die in Array-Experimenten typischerweise erzeugt werden, können auch komplexe Zusammenhänge sichtbar gemacht werden. Mit konventionellen Verfahren lässt sich diese Aufgabe allerdings nicht bewältigen, so dass in zunehmenden Maße Verfahren zur Mustererkennung und Datenklassifikation aus der Informatik zum Einsatz kommen.

Abb. 1 Herstellung von Nylonmembran-Arrays im „Spotting“-Verfahren



Genfragmente in Mikrotiterplatten (a), Roboter-Druckkopf mit Präzisionsnadeln zur Übertragung der Genfragmente (b), puffervertränkte Nylonmembranen zur Immobilisierung der Genfragmente (c) (zentrale Chip-Facility des Universitätsklinikums Ulm)

Abb. 2 Subkutan implantierte Pankreastumore



Zu sehen sind die Pankreastumore nach der Injektion von normaler Saline (a) und *C. perfringens*-Enterotoxin (b). CPE führt zur Tumorzelllyse und zu einer deutlichen Verkleinerung des Tumors (Pfeile)

Im Bereich der Onkologie eignen sich solche komplexen bioinformatischen Verfahren zur Expressionsprofil-Analyse vor allem in der molekularen Klassifizierung von Tumoren. Aus der Analyse von Biopsaten oder chirurgischen Resektaten werden typische Genexpressionsmuster extrahiert, anhand derer sich die Proben bekannten Subtypen von Tumoren zuordnen lassen („class prediction“). Zusätzlich können diese Muster in Verbindung mit klinischen Patientendaten zur Entdeckung neuer, bislang diagnostisch nicht differenzierbarer Tumor-Subtypen mit prognostisch oder therapeutisch relevanten Eigenschaften führen („class discovery“).

Klassifizierung von Tumoren

Der routinemäßige Einsatz von genomweiten DNA-Chips/Mikroarrays ist jedoch – sowohl analytisch als auch finanziell – sehr aufwändig. Daher ist man bestrebt, durch eine Vorauswahl relevanter Gene spezialisierte „Diagnose-Chips“ zu entwickeln, die in der Analyse klinischer Tumorbiopsate die Aufgaben der „class prediction“ und „class discovery“ erfüllen können. Abhängig von der Auswahl der auf dem Array repräsentierten Gene lässt sich auf diese Weise prinzipiell bestimmen, von welchem Gewebe oder Zelltyp ein Tumor abstammt. So können Primärtumore von Metastasen unterschieden bzw. die ungefähre Lokalisation eines noch nicht identi-

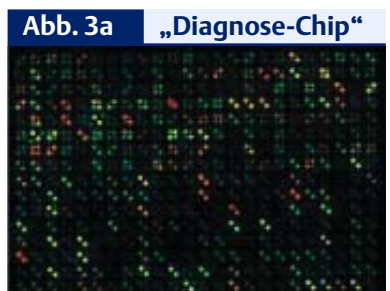


Abb. 3a „Diagnose-Chip“
Überblenddarstellung von Beispielhybridisierungen mit chronischer Pankreatitis- und Pankreaskarzinom-Proben auf dem „Diagnose-Chip“. Gene, die in der chronischen Pankreatitis stärker exprimiert sind, erscheinen grün, karzinomspezifische Gene rot und gleichmäßig exprimierte Gene gelb

zierten Primärtumors vorhergesagt werden.

Relevanz gewinnt diese Fragestellung vor allem vor dem Hintergrund, dass mit herkömmlichen diagnostischen Methoden 15–20% aller Raumforderungen in der Leber (das entspricht etwa 3% der insgesamt diagnostizierten Karzinome) als „cancers of unknown primary“ (CUP-Syndrom) klassifiziert werden, die mangels spezifischer Behandlungsstrategien mit einer sehr ungünstigen Prognose einhergehen.

Auch die differenzialdiagnostisch oftmals schwierige Abgrenzung von malignen gegenüber benignen oder entzündlichen Prozessen lässt sich mit einer geeigneten Genauswahl bewerkstelligen. In diesem Zusammenhang konnten wir in ersten klinischen Studien mit einem in unserer eigenen Arbeitsgruppe entwickelten 500-Genes-Array zur differenziellen Diagnose von Tumoren des Gastrointestinaltrakts nachweisen, dass dieser Array zuverlässig zwischen malignen und entzündlichen Raumforderungen im Pankreas differenziert (Abb. 3a und b).

Individualisierung von Therapieoptionen

Über die rein diagnostische Anwendung hinaus liegt jedoch ein großes Potenzial dieser Technologie in der Konzipierung spezifischer, auf jeden Patienten individuell abgestimmter Therapien. Mit den Methoden der Array-Technologie lässt sich in einem einzelnen Detektionsschritt simultan eine Vielzahl verschiedener prognostischer Marker erfassen, die Informationen über den zu erwartenden Verlauf der Erkrankung liefern können.

Zum Beispiel weist eine Überexpression von Wachstumsfaktoren oder ihren Rezeptoren bzw. die Ausbildung von so genannten „autocrine loops“ auf ein ausgeprägtes proliferatives Potenzial des Tumors hin, während eine Deregulation von Matrix-Metalloproteinasen und ihren Inhibitoren Rückschlüsse auf die Neigung zur Metastasierung zulassen. Gleichzeitig lässt sich das stetig zunehmende Wissen über die an der Resistenzbildung gegen be-

stimmte Chemotherapeutika beteiligten Gene dazu nutzen, um im Zusammenspiel mit weiteren klinischen Parametern bereits im Vorfeld einer Therapie die jeweils Erfolg versprechendste Kombination verschiedener therapeutischer Verfahren und Nachsorgemaßnahmen zu ermitteln.

Geringe Mengen von Biopsiematerial reichen aus

Die größte Herausforderung für die routinemäßige klinische Anwendung der Array-Technologie liegt in der häufig sehr begrenzten Menge des zur Verfügung stehenden Unter-

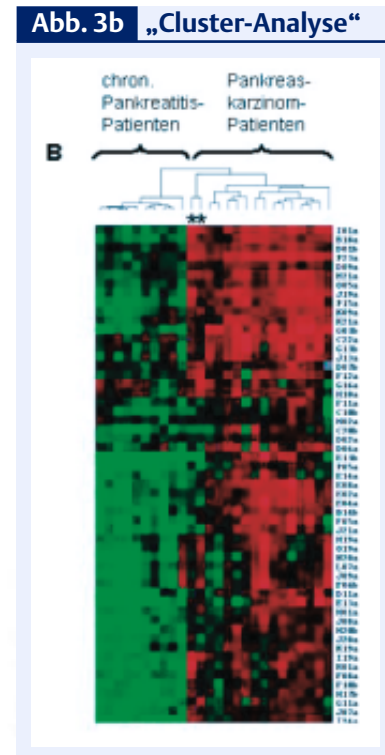


Abb. 3b „Cluster-Analyse“
Ausschnitt aus der „Cluster-Analyse“ einer Serie von Expressionsprofil-Analysen von Pankreasgeweben mit dem „Diagnose-Chip“. Die farbigen Zellen repräsentieren die Expressionsstärke der Gene (Kennzeichnung nach Position auf dem Array, z.B. „l01a“) in den verschiedenen Geweben. Grün bedeutet niedrige, rot hohe und schwarz mittlere Expressionsstärke. Pankreaskarzinom- und Pankreatitis-Proben lassen sich eindeutig voneinander differenzieren. Die mit Sternchen gekennzeichneten Proben stammen aus Feinnadelbiopsien von Pankreaskarzinomen

Dieses Dokument wurde zum persönlichen Gebrauch heruntergeladen. Vervielfältigung nur mit Zustimmung des Verlages.

suchungsmaterials. Für die Studien mit unserem oben beschriebenen Diagnose-Chip setzen wir ein so genanntes lineares Amplifikations-Verfahren ein. Dieses erlaubt es uns, aus geringen Materialmengen – wie sie zum Beispiel aus Feinnadelpunktionen gewonnen werden – zuverlässige Expressionsprofile zu erstellen. Unsere Ergebnisse zeigen am Beispiel des Pankreaskarzinoms, dass sonografisch oder endosonografisch gesteuerte Feinnadelbiopsien mit anschließender Expressionsprofil-

Analyse eine präzise Diagnose solcher Tumore erlauben (Abb. 3a und b).

Ein besonders interessanter Ansatz besteht in der Isolierung zirkulierender Tumorzellen aus peripherem Blut. Dies ist eine äußerst attraktive Möglichkeit, aus einfach zu gewinnenden Blutproben wertvolle Informationen über das Vorhandensein und die Eigenschaften eines Tumors zu generieren. Jüngst publizierte Ergebnisse von Klein und Mitarbeitern (1) zeigen, dass es mithilfe spezieller Amplifikationsverfahren möglich ist, sogar aus einzelnen disseminierten Tumorzellen aus peripherem Blut und/oder Knochenmark sowohl Genom- als auch Expressionsprofil-Analysen durchzuführen – die bis zu einem gewissen Grad Rückschlüsse auf den zugrunde liegenden Tumor zulassen.

Insgesamt hat die DNA-Chip/Mikroarray-Technologie also ein enormes Potenzial für die Entwicklung neuer diagnostischer, prognostischer und therapeutischer Verfahren in der Onkologie. Aus der onkologischen Grundlagenforschung ist sie bereits heute kaum mehr wegzudenken. Auch wenn DNA-Arrays bis auf wenige Ausnahmen noch ein gutes Stück von der Anwendung der klinischen Routine entfernt sind, ist zu erwarten, dass diese Technologie in der nahen Zukunft zum diagnostischen Standardrepertoire des Onkologen gehören wird.

Are the Methods Ripe for Implementation in Practice? – Use of DNA Chips in Gastrointestinal Oncology

The clinical application of DNA chip/array technology holds out promise of considerable advances in the accurate diagnosis and individualized treatment of tumour disease. DNA chip/array analysis can contribute useful information about the origin, proliferative and metastatic potential, and treatability of a tumour. In the field of basic oncological research, it already plays an essential role. Despite the fact that, with a few exceptions, DNA chip/arrays still have a good way to go before they can be applied in the clinical routine setting,

it is to be expected that this technology will become an integral element of the standardized repertoire of clinical oncologists in the near future.

Key Words

DNA chip/array technology – individualised treatment – diagnosis

Literatur

1. Klein CA, Seidl S, Petat-Dutter K et al. Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nat Biotechnol* 2002; 20 (4): 387–392
2. International Human Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860–921
3. Michl P, Buchholz M, Rolke M et al. Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Gastroenterology* 2001; 121: 678–684
4. Mueller-Pillasch F, Lacher U, Wallrapp C et al. Cloning of a gene highly overexpressed in cancer coding for a novel KH-domain containing protein. *Oncogene* 1997; 14: 2729–2733
5. Venter JC, Adams MD, Myers EW et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291: 1304–1351

Anschrift für die Verfasser

Prof. Dr. Thomas M. Gress
Abteilung Innere Medizin I
Universitätsklinikum Ulm
Robert-Koch-Str. 8
89081 Ulm

Glossar

Blotting

Untersuchungsverfahren, bei dem das Material nach der Auftrennung (z.B. mittels Elektrophorese) auf eine Membran aus Nylon, Nitrozellulose oder Ähnlichem übertragen wird. Die Visualisierung erfolgt zum Beispiel über die Bindung fluoreszierender oder radioaktiv markierter Gensonden

Expressionsprofil

Gesamtheit aller in einem Gewebe oder einer Zelle als mRNA vorliegenden aktiven bzw. exprimierten Gene

Genom

Gesamtheit der genetischen Elemente (Gene) eines Organismus

Genexpression

Aktivierung eines Gens durch Übersetzung der in der DNA gespeicherten genetischen Information in mRNA-Kopien und gegebenenfalls Proteine

Northern Blot

Blotting-Verfahren zum Nachweis von Ribonukleinsäuren

onkofötale Gene

Gene, die im gesunden Organismus ausschließlich in bestimmten Phasen der Embryonalentwicklung aktiv sind, jedoch im Rahmen der Tumorgenese in neoplastischen Zellen reaktiviert werden

Southern Blot

Blotting-Verfahren zum Nachweis von Desoxyribonukleinsäure-Fragmenten

Transkription

Erstellung von mRNA-Kopien eines Gens; erster Schritt zur →Genexpression

Translation

Übersetzung der mRNA-Sequenz in Proteine

Herzinsuffizienz

Etwa 1% der westlichen Bevölkerung leidet an einer chronischen Herzinsuffizienz, die Tendenz ist steigend. Das Grundleiden besteht in bis zu 75% der Fälle in einer koronaren Herzerkrankung, bei 14–15% der Patienten liegt eine dilatative Kardiomyopathie vor. Nur in wenigen Fällen findet sich ein kausal therapierbares Grundleiden – etwa ein Klappenvitium, das sich operativ korrigieren lässt. Bei den übrigen Patienten stehen allgemeine supportive Maßnahmen, wie beispielsweise eine Gewichtsreduktion, die Behandlung einer Hypertonie und eine salzarme Diät sowie die symptomatische medikamentöse Langzeittherapie (Kombinationstherapie mit ACE-Hemmer, Beta-Blocker, Diuretika und gegebenenfalls Digitalis und Aldosteron-Antagonist) im Mittelpunkt.

Das pathophysiologische Verständnis zur Therapie der chronischen, symptomatischen Herzinsuffizienz hat sich in den letzten Jahren grundlegend gewandelt. War man initial davon ausgegangen, dass die verminderte Kontraktilität eine Therapie mit positiv inotrop wirksamen Substanzen fordert – zu dieser Zeit waren Beta-Rezeptorantagonisten sogar kontraindiziert –, so brachte das Verständnis zur Modulation der Vor- und Nachlast, aber ganz besonders das Verstehen der sympathoadrenergen und der Renin-Angiotensin-Aldosteron-Stimulation bei diesen Patienten einen grundlegenden Wandel in der Therapie (neurohumorale Stimulation). Waren in früheren Jahren günstige Einflussnahmen auf hämodynamische Parameter (meist nur kurze Zeit wirksam) das Ziel des therapeutischen Bemühens, so zielt die Pharmakotherapie nun auf die Beeinflussung lang andauernder, meist reparativ wirksamer Vorgänge. Nur für die neurohumoral wirksamen ACE-Hemmer und Beta-Blocker ist in mehreren randomisierten kontrollierten klinischen Studien eine Verbesserung der Symptomatik und eine Verlängerung des Überlebens nachgewiesen – und dies nur bei Patienten, die zudem mit Diuretika behandelt wurden!

Neben der Weiterentwicklung der konservativen Therapieoptionen, die auf die Beeinflussung der neurohumoralen Aktivierung zielen, werden mechanische und

elektrische Unterstützungssysteme weiterentwickelt. Die biventrikuläre Schrittmacherstimulation beispielsweise zeigt eindrucksvolle Verbesserungen der Symptomatik bei herzinsuffizienten Patienten und möglicherweise auch einen prognostischen Benefit bei Patienten mit ausgeprägter QRS-Zeit-Verlängerung. Allerdings müssen hier die laufenden Studien noch abgewartet werden. Neben gentherapeutischen Ansätzen können in Zukunft möglicherweise Patienten nach Myokardinfarkt durch eine Zellersatztherapie profitieren. Welcher Zelltyp unter welchen Bedingungen dazu am besten geeignet ist, ist aber noch völlig ungeklärt. Die ersten klinischen Studien zeigen wohl eher die Sicherheit des Verfahrens als die langfristige Wirksamkeit dieser Technik.

Angesichts der immer noch sehr hohen Letalität der Erkrankung sind neue Optionen in der Therapie dringend gefordert. Aber bereits heute sollten wir jedem Patienten die Therapie mit ACE-Hemmer und Beta-Blocker angedeihen lassen, um so nicht nur seine Lebensqualität zu verbessern, sondern auch sein Überleben zu verlängern!



Prof. Dr. Robert H. G. Schwinger, Köln

A handwritten signature in blue ink that reads "Robert H. G. Schwinger".