

Komplexe Microarrays in Krebsforschung und -diagnose.

Robert Fleischer, Marcus Frohme und Jörg D. Hoheisel

Abteilung Funktionelle Genomanalyse, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg

Microarrays sind aus der biomedizinischen Forschung mittlerweile nicht mehr wegzudenken. Obwohl doch immer noch eine relativ junge Technologie, findet sie inzwischen breite Verwendung und hält damit auch langsam Einzug in das klinisch-diagnostische Umfeld. Während im Forschungsbereich schon einige Anwendungen zur Routine werden, stehen einer diagnostischen Umsetzung häufig noch fehlende Qualitätsmerkmale und auch die Interpretierbarkeit der Ergebnisse im Wege. Nichtsdestotrotz werden einige Chip-basierende Untersuchungen in kurzer Zeit zum Standardrepertoire diagnostischer Labore gehören, während andere dagegen erst noch reifen und ihre Zweckmäßigkeit beweisen müssen.

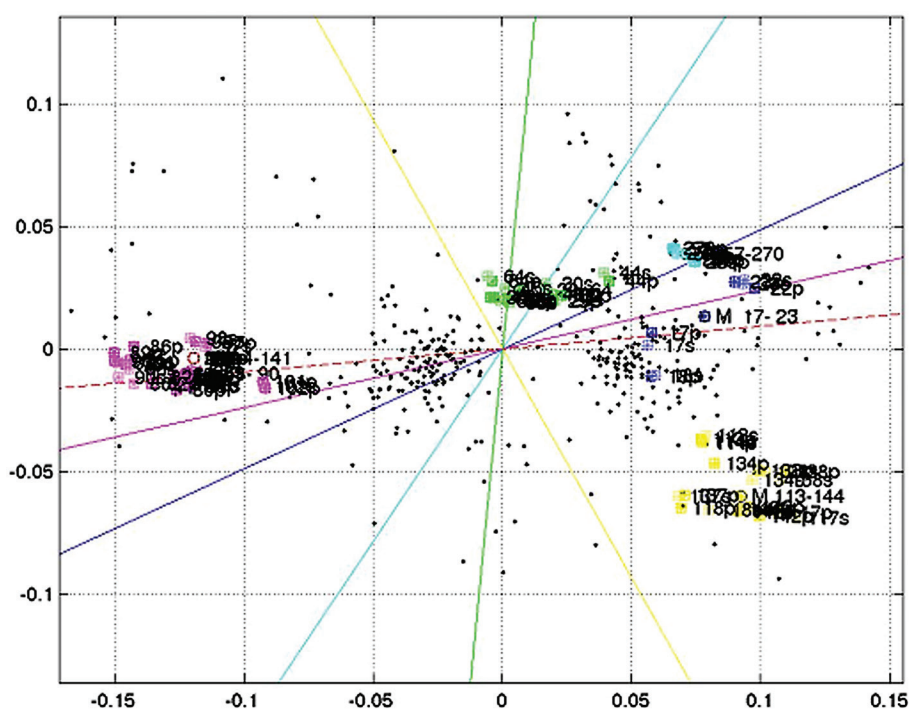


Abb. 1: Klassifizierung von Pankreastumoren mittels transkriptioneller Untersuchungen. Transkript-Profile von Tumoren wurden nach statischen Verfahren ausgewertet und einer Korrespondenz-Clusteranalyse unterzogen, durch die die multidimensionale Datenmatrix in eine Ebene projiziert wird. Durch dieses Verfahren werden mehrere Variable (hier: Gene und Tumore) gleichzeitig analysiert und dargestellt. Je mehr ein Faktor mit einem anderen korrespondiert, desto größer ist die räumliche Nähe. Die farbigen Quadrate definieren Tumore einzelner Personen, die schwarzen Punkte symbolisieren differenziell transkribierte Gene. Die räumliche Aufteilung in Patientengruppen verdeutlicht die signifikanten molekularen Unterschiede zwischen verschiedenen Tumortypen, die durch eine unterschiedliche Färbung gekennzeichnet sind. Gleichzeitig besteht innerhalb der Gruppen ein recht hoher Grad an Homogenität.

► Das zugrunde liegende Prinzip der Microarray-Technologie ist so neu nicht. Bereits in 1965 beschrieben Gillespie und Spiegelman^[1], dass einzelsträngige DNA stark an Nitrozellulose bindet aber trotzdem für eine Hybridisierung mit komplementären Sequenzen zugänglich ist. Die Entwicklung der nach ihm benannten „Blotting“ Technik durch Edwin Southern in 1975^[2] war ein Meilenstein in der Analyse von Nukleinsäuren und eines der Verfahren, ohne die die frühe Genomforschung undenkbar gewesen wäre. Nylonfilter mit geordneten Rastern aus rekombinanten Klonbibliotheken wur-

den durch Hans Lehrach eingeführt^[3] und ermöglichten ein paralleles, da inverses Analyseformat für komplexe Proben. Statt die Gesamt-DNA bzw. RNA zu fixieren und mit einzelnen Sonden sequenziell zu untersuchen, wurden die Sonden als individuelle DNA-Fragmente – zuerst in Form von *E. coli* oder Hefe Klonkolonien – in einem geordneten Raster auf einer festen Phase aufgebracht und konnten anschließend *gleichzeitig* mit einem komplexen Probengemisch inkubiert werden. Der daraus resultierende Anstieg der produzierten Datenmengen war eine Voraussetzung für genomweite Unter-

suchungen. Bereits durch frühe Studien wurde das Potenzial dieser Methodik für die Analyse von Tumor-RNA dokumentiert^[4]. Chemische *in situ* Synthese von Oligonukleotid-Rastern^[5,6] und das Aufbringen vieler DNA-Fragmente an definierten Belegpunkten auf kleinen, kompakte Glasoberflächen^[7] machten Microarrays besser verfügbar und handhabbar.

Diversifizierung

Inzwischen gibt es eine Vielzahl an Möglichkeiten, wie DNA-Microarrays produziert werden können. Zurzeit am weitesten verbreitet und für die Hochdurchsatz-Produktion identischer Microarrays bestens geeignet sind Oligonukleotid-Chips der Firma *Affymetrix*, die mittels fotolithografisch kontrollierter *in situ* Synthese hergestellt werden. Mehr als eine Millionen Sonden können auf einem Chip von 1,28 x 1,28 cm dargestellt werden. Ein großer Nachteil dieses Systems ist seine geringe Flexibilität. Diese ermöglicht jedoch beispielsweise das Geniom Gerät der Firma *febit*^[8], auf dem Chips mit völlig flexiblem Design hergestellt und genutzt werden. Die Lichteinstrahlung wird hier durch elektronisch steuerbare Mikrospiegel kontrolliert, nahezu identisch zur Technologie, die in Projektoren für Computerpräsentationen breite Verwendung findet. Dadurch entfällt die aufwändige Herstellung von Masken. Gleichzeitig ermöglicht die Mikrofluidik dieses Systems eine Ausweitung der Anwendungsmöglichkeiten. Nach der *in situ* Synthese der Sondenmoleküle und der Bindung der komplexen Proben, können weitere Schritte durchgeführt werden, wie etwa PCR. Da es sich bei dem Chip um ein geschlossenes System handelt, findet keine Verdunstung statt. Gerade für die Forschung ist die systeminhärente Flexibilität ein Muss, um Entwicklungen schnell voran zu treiben. Aber auch in Richtung der Routinediagnostik finden neue Entwicklungen statt. Das Microarray-System der Firma *Infineon* beispielsweise zielt auf dieses Marktsegment ab. Zusätzlich bringen Firmen dieser Größenordnung, die aus anderen Arbeitsfeldern kommen, wiederum ganz andere Voraussetzungen und Expertisen hinsichtlich der Qualitätssicherung mit. Aber auch der mit PCR-Produkten beladene Microarray hat seine Existenzberechtigung oder gar Vorteile. Eine Darstellung eines ganzen Genoms *in toto* lässt sich auf absehbare Zeit nicht anders realisieren.

Neben einer Vielzahl technischer Entwicklungen, entwickelt sich aber auch das Anwendungsportfolio rasant weiter. Aus einfachem Genotypisieren entwickelten sich beispielsweise Analysen von Einzelbasenaustauschen zur Identifizierung krankheits-

relevanter Gene oder zur Ermittlung molekular-epidemiologisch definierter Patientengruppen, die Typisierung pathogener Organismen, Studien epigenetischer Veränderungen der Erbsubstanz [siehe auch *BIOforum* 5/2004, 31–33] bis hin zur Re-Sequenzierung genomischer Information. Recht neu sind Anwendungen jenseits der Nukleinsäuren. Speziell im Bereich der Diagnostik wird eine Nutzung ganzer Pancele von Antikörpern vorangetrieben, motiviert ähnlich zu den frühen Arbeiten an DNA-Microarrays über eine Parallelisierung ein kritisches Mehr an Information zu erreichen, das für eine Interpretation der komplexen biologischen Vorgänge ausreicht aber durch das umgekehrte Format des „Western-Blots“ nicht zu erhalten ist^[9].

Krebsforschung

Die Krebsforschung hat mit Hilfe der Microarray-Technologie enorme Fortschritte gemacht. Mittlerweile können für viele Tumore molekulare Untergruppen von Patienten aufgrund von Unterschieden in komplexen genomischen, epigenetischen oder transkriptionellen Mustern bestimmt werden, bis hin zur Definition gänzlich neuer Tumorentitäten^[10]. Auch prognostische Marker wurden identifiziert und befinden sich zum Teil bereits in prä-klinischer Anwendung. Eine weitere Stärkung des Potenzials wird sich aus einer Kombination und dem Vergleich der verschiedenen Datensätze ergeben. Über die Microarray-Technologien besteht erstmals die Möglichkeit, die komplexen funktionellen Zusammenhänge, die eine normale Zelle zu einer Tumorzelle transformieren, in Gänge zu analysieren, anstatt nur Einzelaspekte anzusehen. Während für diagnostische Anwendungen auf eine Reduzierung der Belegpunkte abgezielt wird, ist gleichzeitig jedoch klar, dass selbst mit den Kapazitäten der heutigen Verfahren die Komplexität des biologischen Systems Mensch nicht vollständig untersucht werden kann. Daraus ergibt sich unmittelbar die Notwendigkeit, die einzelnen Kompartimente des Körpers oder der Zelle getrennt zu analysieren und die Grenzflächen molekular besser zu definieren. Gleichzeitig werden die hochgesteckten Ziele der Systembiologie zunächst reduziert auf relativ einfache Teilsysteme. Als problematisch hat sich auch die Weiterführung und zellbiologische Umsetzung der Ergebnisse erwiesen. Dies ist zum einen die Folge der ungeheuren Menge an interessanten Ergebnissen, liegt aber gleichzeitig auch an der schwierigen biologischen Interpretation solch komplexer Datensätze. Gleich-





zeitig sind viele nachfolgende Prozesse noch nicht in dem Maße entwickelt, um die Information als Ganzes weiter zu verfolgen. Selbst das Treffen einer sinnvollen Auswahl ist sehr aufwändig. Auch aufgrund dieser Sachlage wurde beispielsweise in Heidelberg von EMBL und DKFZ gemeinsam eine Einrichtung zur Etablierung und Durchführung von Testverfahren mit kleinen Molekülen aufgebaut.

Krebsdiagnostik

Während viele Microarray-Untersuchungen im Forschungsbereich bereits gut etabliert sind, gibt es für die Anwendung in der klinischen Diagnostik vielfach noch Probleme. Eines der grundlegenden ist die Etablierung eines jeweils passenden Testverfahrens, das die relevante Information robust liefert. Dazu sind einmal gute Sensormoleküle notwendig. Selbst im Bereich DNA-Chips ist die Auswahl der entsprechenden Probensequenzen nicht immer trivial, da Kreuzreaktionen vermieden werden sollten. Gleiches gilt auch für Antikörper. Hier wird die Problematik noch weiter verstärkt, da neben der Spezifität auch noch die Bindungsstärken solcher Moleküle stark schwanken. Zusätzlich war bis vor kurzem eine chemische Synthese äquivalent zur Synthese von Nukleinsäuremolekülen nicht praktikabel, was sich mit dem Aufkommen von alternativen Molekülklassen, die ein ähnliches Verhalten wie Antikörper zeigen, aber ändert. Zusätzlich befinden sich auch Verfahren zur Isolation von Antikörpern hoher Selektivität und Bindungsstärke im hohen Durchsatz in der Entwicklung.

Selbst für grundsätzlich funktionierende Testverfahren, sind in den meisten Fällen die bisher durchgeführten Studien von den Fallzahlen her für eine sichere diagnostische Aussage nicht ausreichend. Solche Fallzahlen sind einmal notwendig, um die tatsächlich informativen Sondenmoleküle zu identifizieren, zum Zweiten aber auch um die Aussagekraft eines Testverfahrens zu bestätigen. Gleichzeitig fehlt es vielfach noch an Qualitätssicherungsmaßnahmen und entsprechender Dokumentation für Routineanwendungen, um eine Analyse nachvollziehbar und vergleichbar durchführen zu können. Ein Punkt in dieser Richtung wäre eine echte Quantifizierung der Molekülmengen, die auf einem Chip gebunden werden, anstelle der Bestimmung relativer Änderungen. Eine Verdopplung von 5 auf 10 Moleküle kann gänzlich andere Auswirkungen haben als ein äquivalenter Anstieg von 500 auf 1000.

Ein ebenfalls kritischer Parameter ist die Nachweisgrenze solcher Tests. Gerade im klinischen Bereich gibt es häufig Begren-

zungen hinsichtlich der Ausgangsmengen zellulären Materials. Zudem muss die Dynamik des Nachweisverfahrens ausreichend groß sein, da schon geringere Änderungen in der Menge bestimmter Moleküle große Auswirkungen auf das gesamte zelluläre System haben können. Amplifikationsschritte sind aufwändig und fehlerbehaftet, oder im Bereich von Proteinen zurzeit gänzlich unmöglich. Es gibt aber Entwicklungen, die auf den Nachweis von wenigen oder gar Einzelmolekülen ausgerichtet sind. So arbeiten wir beispielsweise in Kooperation mit den Firmen *Evotec Technologies*, *IBA* und *ION-TOF* sowie der Universität Münster daran, das Binden von Nukleinsäuren auf Microarrays über den direkten Nachweis der Phosphatgruppen nachzuweisen, die in DNA bzw. RNA vorhanden sind^[11]. Dabei werden „Peptide Nucleic Acids“ (PNAs) als Sondenmoleküle genutzt, die chemisch sehr unterschiedlich sind und keine Phosphatgruppen beinhalten, sich funktionell aber sehr ähnlich zu Nukleinsäuren verhalten. Die Auslesung erfolgt über Massenspektrometrie. Aufgrund der hohen Sensitivität des Verfahrens, kann – neben des Wegfalls der Probenmarkierung – auch eine Amplifikation des Ausgangsmaterials vermieden werden.

Ausblick

Die Entwicklung der Microarray-Technologie gab der Krebsforschung ein Mittel in die Hand, die komplexen molekularbiologischen Vorgänge zumindest für einzelne Molekülklassen zusammenhängend zu analysieren, wodurch sich neben dem grundlegenden Erkenntnisgewinn auch relativ schnell umsetzbare diagnostische Möglichkeiten eröffneten. Dabei erstreckt sich die Technologie – obwohl immer noch mit Schwerpunkt in der Nukleinsäure-Analytik – immer weiter in andere Molekülklassen oder gar zu ganzen zellulären Systemen. Während einige der Verfahren kurz vor ihrer Einführung in die Diagnostik stehen, werden andere noch Jahre benötigen, bis die Datengrundlage wie auch die Kenntnis ihrer Interpretierbarkeit eine sichere Diagnosestellung erlauben. Es steht aber außer Frage, dass in naher Zukunft eine ganze Reihe von Chip-basierenden Testverfahren zum routinemäßigen Diagnoserepertoire in der Krebserkennung und -behandlung gehören werden.

Literatur

- [1] Gillespie D. und Spiegelman S.: *J. Mol. Biol.* 12, 829–842 (1965)
- [2] Southern E. M.: *J. Mol. Biol.* 98, 503–517 (1975)
- [3] Poustka A. et al.: Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. 51, 131–139 (1986)
- [4] Gress T. M. et al.: *Mamm. Genomes* 3, 609–619 (1992)
- [5] Fodor S.P. et al.: *Science* 251, 767–773 (1991)
- [6] Maskos U. und Southern E. M.: *Nucleic Acids Res.* 20, 1679–1684 (1992)
- [7] Schena M. et al.: *Science* 270, 467–470 (1995)
- [8] Baum M. et al.: *Nucleic Acids Res.* 31, e151 (2003)
- [9] Kusnezow W. et al.: *Protein Microarrays* (Scheda M., Hrsg.), im Druck (2004)
- [10] Esposito I. et al.: *Virchows Arch.* 444, 447–453 (2004)
- [11] Brandt O. et al.: *Nucleic Acids Res.* 31, e119 (2003)

Korrespondenzadresse:

Robert Fleischer, Marcus Frohme und
Jörg D. Hoheisel
Abteilung Funktionelle Genomanalyse
Deutsches Krebsforschungszentrum,
Im Neuenheimer Feld 580
D-69120 Heidelberg
www.dkfz.de/funct_genome