

AUS DEM LABOR

Wichtige Werkzeuge in Diagnostik und Forschung

Genmarker

Genmarker sind heute aus der medizinischen Forschung und Diagnostik nicht mehr wegzudenken. Sie spielen oft eine zentrale Rolle, wenn man molekulare Ursachen, Wirkungen oder Therapien von Krankheiten wie Aids oder Krebs erkennen und überwachen möchte. Aber auch zur Untersuchung von Verwandtschaftlichkeit oder forensischen Fragen oder zur Feststellung von Korrelationen von Genveränderungen mit Krankheiten, wie beispielsweise Herzinsuffizienz, Diabetes oder Fettleibigkeit, sind sie unabdinglich.

Mit einem Genmarker oder auch „genetischen Marker“ können ganz unterschiedliche Formen von Genveränderungen sichtbar gemacht werden, wobei solche genomischen Veränderungen vererbt oder erworben sein können. Erworbene Genveränderungen können z.B. Folge von bestimmten viralen Infektionen (z.B. HIV) sein oder bei unterschiedlichen Krebserkrankungen auftreten. In jedem Fall handelt es sich bei einem Genmarker um einen eindeutig identifizierbaren und bekannten DNA-Sequenzabschnitt, der mittels einer Sonde sichtbar gemacht werden kann. Genmarker lassen sich dabei in zwei Haupttypen einteilen, in sogenannte (a) natürliche Marker und (b) in Reportergene.

Die natürlichen Genmarker entsprechen Genomveränderungen, die je nach Typ der Veränderung, mit verschiedenen molekularen Sonden sichtbar gemacht werden können. Beispiele dafür sind bekannte Mutationen, die mit einer Krankheit assoziieren, wie die „ Δ F508“ im CFTR Gen, verantwortlich für die Cystische Fibrose oder eine BRCA1 Genmutation, die zu Brustkrebs führen kann, aber auch natürliche Punktmutationen (auch SNP genannt vom englischen „single nucleotide polymorphism“), die u.a. als molekulare Verwandtschaftsmarker verwendet werden können. Je nach Art der vorliegenden Mutation werden verschiedene Techniken angewandt, um mit einem Genmarker spezifische Veränderungen in der DNA Sequenz nachzuweisen. Beispielsweise können mit Hybridisierungssonden, die spezifisch entweder die normale (Wildtyp) oder die mutierte Sequenz detektieren, selektiv Veränderungen nachge-



Prof. Dr. sc. nat. Beat Thöny
Zürich

wiesen werden. Die Hybridisierung basiert biochemisch immer auf der Doppelhelix- oder Basenpaarungs-Eigenschaft der nachzuweisenden Nukleinsäure. Weiter kann eine Gen-Sonde kovalent mit einem Enzym für eine Farbreaktion oder direkt mit fluoreszierenden Molekülen gekoppelt werden, um eine positive (oder stabile) Hybridisierung zwischen Zielgen und Gensonde sichtbar zu machen. Eine ganz andere Nachweismethode, um eine Gen- oder DNA-Sequenzveränderung selektiv nachzuweisen, ist der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus, kurz RFLP, bei dem ein spezifischer, nicht mutierter DNA-Abschnitt von einem Restriktionsenzym erkannt und geschnitten wird. Weitere Genmarker-Analysen geben Auskunft über die unterschiedliche Anzahl oder Anordnung von wieder ganz verschiedenartigen repetitiven DNA-Abschnitten. Solche repetitiven DNA Sequenzen werden als Mikrosatelliten oder „variable number tandem repeats“, kurz VNTR, bezeichnet und machen bis zu 50% des menschlichen Genoms aus.

Man spricht oft auch von Genmarkern, wenn beispielsweise in einem Tumorgewebe eine spezifische Veränderung der Genexpression beobachtet wird. So kann z.B. die Genexpression für ein bestimmtes Onkoprotein pathologisch erhöht oder ein Tumorsuppressorgen inaktiviert sein. Eine weitere Möglichkeit ist die pathologische Expression von Fusionsgenen, die durch eine chromosomale Translokation entstehen. Solche Veränderungen haben oft eine fehlerhafte Wirkung auf Signalkaskaden, die typischerweise den Zellzyklus und somit das Zellwachstum kontrollieren und im Gleichgewicht halten, also eine unkontrollierte Proliferation verhindern. Diese Veränderungen können oft nicht nur im Tumorgewebe selber, sondern auch

in den metastasierenden Zellen nachgewiesen werden. Als prominentes Beispiel für eine gesteigerte Expression eines Onkoproteins findet man den EGF-Rezeptor (englisch „Epidermal Growth Factor Receptor“ oder EGFR) in verschiedenen Tumorarten hoch reguliert. Ein Beispiel für ein Tumorsuppressorgen ist das p53 Protein, welches in ganz unterschiedlichen Tumoren inaktiviert vorkommt. Das Philadelphia Chromosom ist eines der am Besten untersuchten Formen einer chromosomalen Translokation (zwischen den Chromosomen 9 und 22) und kann eine chronische myeloische Leukämie (CML) verursachen. In diesem Beispiel ist das neu gebildete Fusionsgen das BCR-ABL, welches nach Expression als Fusionsprotein eine Rolle in der Zellwachstumskontrolle spielt. Mit einem entsprechenden Genmarker, einer Gensonde, kann dieses Fusionsgen spezifisch im Blut nachgewiesen werden.

Bei der Verwendung eines Reportergens wird meistens eine erkennbare (Biolumineszenz- oder Fluoreszenz-)Färbung sichtbar gemacht. Dabei werden Eigenschaften von entsprechenden Reporterproteinen genutzt. Solche Reporterproteine werden vor allem in der medizinischen Grundlagenforschung eingesetzt. Anhand von zwei Beispielen soll der Einsatz der Reporter-Gen-Technik erklärt werden.

Die Reporter-Gen-Technik in der aktuellen Krebsforschung

Die Biolumineszenz eines Reportergens basiert auf der Nutzung des Luciferasegens, isoliert aus dem Glühwürmchen oder von Tiefseefischen, welche ein spezielles Enzym besitzen, das die Substanz Luciferin in einen blau-grünlich fluoreszierenden Leuchtstoff umwandelt. Das entsprechende Gen kann als Reporter-Gen beispielsweise in eine Krebszelle mit dem bereits vorhandenen Fusionsgen BCR-ABL eingebaut und in Mäuse injiziert werden. Mit einer solchen Maus als Leukämie-Modell lassen sich verschiedenste Untersuchungen wie Behandlungen mit potentiellen neuen Medikamenten durchführen. Dabei kann die Wanderung und Proliferation der lebenden Zellen, aber auch die Eliminierung der Krebszellen mit verschiedenen Krebstherapeutika mit dem Biolumineszenz-Reporter-Gen und entsprechender Bildgebung am lebenden Tier untersucht werden. Das geschieht, indem das Reporter-Gen-Substrat Luciferin in die Mäuse eingespritzt wird, um dann die anästhesierten Tiere in einer Dunkelkammer mit spezieller Kamera-Ausrüstung auf die Intensität der ausgesendeten Biolumineszenz- oder Lichtstrahlung abzubilden. Die Lichtintensität kann damit gewissen Körperregionen oder Organen zugeordnet und gemessen werden, d.h. es leuchten ausschliesslich die Gewebe, welche die intakten Zellen mit dem Reporter-Gen enthalten. Weiter kann diese Messung mit dieser Technik beliebig wiederholt werden, um das Schicksal der Leukämiezellen über einen längeren Zeitraum am lebenden Organismus sichtbar zu machen und zu verfolgen, ohne dass die Versuchstiere euthanasiert werden müssen.

Die Reporter-Gen-Technik in der Gentherapie

Eine andere Anwendung einer Reporter-Gen-Technik mit Luciferase als Reporter ist in der Abbildung gezeigt. Gemäss Definition in der Wikipedia-Enzyklopädie befasst sich die Gentherapie mit der Korrektur krankheitsauslösender genetischer Defekte und schleust über spezielle Methoden korrekte Gensequenzen (Vektoren) unter Austausch der defekten Abschnitte in die DNA ein. Um nun die Wanderung oder das Schicksal von Genvektoren zu untersuchen und zu verfolgen, kann ebenfalls das Luciferasegen als Reporter-Gen eingesetzt werden. Für die Gentherapie werden heute oft modifizierte (virale) Vektoren verwendet mit möglichst hohem Gewebetropismus, um spezifische Zellen für die Therapie zu erreichen. In der Abbildung ist das Zielgewebe die Leber (der Maus), wel-

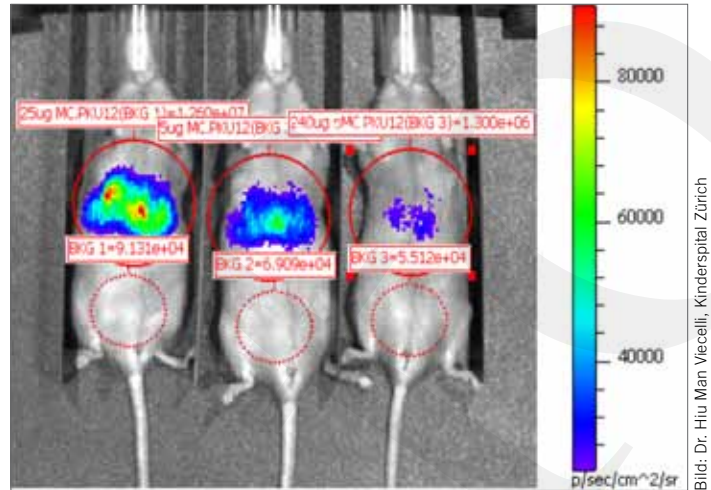


Abb. 1: Stabile Expression des Reportergens Luciferase ein Jahr nach Injektion eines leberspezifischen Vektors mit unterschiedlicher Dosis (Mäuse links und Mitte) plus negativ Kontrolle (Maus rechts)

che mit einem massgeschneiderten Vektor selektiv erreicht werden kann. Mit der Biolumineszenz-Imaging Reporter-Gen-Technik kann nach Gentherapie mit einem Vektor mit der Luciferase als Reporter eine quantitative Beobachtung aller Organe am lebenden Tier bei Bedarf lebenslanglich durchgeführt werden. Nur das dauerhafte Einfügen eines intakten Gens in die Leber für beispielsweise die monogenetische Erkrankung $\alpha 1$ -Antitrypsin-Mangel, ein Mangel eines spezifischen Proteaseinhibitors, was zu Leberzirrhose und Lungenemphysem führt, hat Aussicht auf eine erfolgreiche Therapie. Reporter-Gen-Techniken sind somit nicht nur für die moderne medizinische Gen- und Krebsdiagnostik unerlässlich, sondern sind auch ein wichtiges Forschungswerkzeug zur Generation von Vektoren für die Gentherapie.

Prof. Dr. sc. nat. Beat Thöny

Abteilung für Stoffwechselkrankheiten, Universitäts-Kinderklinik
Steinwiesstrasse 75, 8032 Zürich
beat.thony@kispi.uzh.ch

Abkürzungen:

- BRCA1: BReast CAncer 1 oder auch Brustkrebsgen 1
- HIV: Humane Immundefizienz-Virus (englisch: human immunodeficiency virus)
- CF: Cystische Fibrose oder auch Mukoviszidose mit der typischen Mutation „ $\Delta F508$ “ als Akronym für eine Deletion vom Kodon an Position 508, das für eine Phenylalanin („F“) im CFTR-Protein codiert
- CFTR-Gen: codiert für den „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“
- SNP: englisch: „single nucleotide polymorphism“
- EGF-Rezeptor: englisch: „epidermal growth factor receptor“ oder EGFR
- VNTR: englisch: „variable number tandem repeat“
- CML: chronische myeloische Leukämie

Take-Home Message

- ◆ Genmarker oder auch „genetische Marker“ sind eindeutig identifizierbare und bekannte DNA-Sequenzabschnitte, mit denen ganz unterschiedliche Formen von Genveränderungen sichtbar gemacht werden können
- ◆ Man kann Genmarker in natürliche Marker und in Reportergene unterteilen. Mit natürlichen Genmarkern lassen sich Genomveränderungen nachweisen, die individuell spezifisch, aber „natürlich“ sind, oder mit einer Krankheit korrelieren oder dazu führen
- ◆ Reportergene führen in der Regel zu einer erkennbaren Biolumineszenz- oder Fluoreszenz-Färbung und werden vor allem in der medizinischen Grundlagen- oder Krebsforschung eingesetzt