

Medizinische Universitätsklinik, Kantonsspital, Bruderholz
 Departement Biomedizin, Universität Basel
 Barbara C. Biedermann

Molekulare Früherkennung in der Medizin – Konzept, Techniken, Perspektiven

Das Konzept der molekularen Früherkennung hat mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms um die Jahrtausendwende erheblichen Aufschwung bekommen. Technologischer Fortschritt wird in den nächsten Jahren umfangreiche, ja umfassende (komprehensive) molekulargenetische Untersuchungen des Individuums in die Reichweite des diagnostischen Alltags bringen. In gewissen Bereichen der Medizin, z. B. in der Infektiologie oder der Hämato-Onkologie, sind molekulare Diagnosen bereits heute obligater Standard. Im Falle polygenetischer, multifaktoriell bedingter Krankheiten haben molekulargenetische Tests heute jedoch nur in Ausnahmefällen einen klinisch relevanten Stellenwert. Neue Biomarker, meistens Proteine oder Metaboliten, sind nicht selten durch comprehensive, molekulare Verfahren („-omics“) identifiziert worden. Nur die genaue Kenntnis der diagnostischen und prognostischen Aussagekraft und der Limitationen eines molekularen Tests erlaubt seine sinnvolle Anwendung.

Einleitung

Es gibt in der Medizin nur wenige Krankheiten, denen nicht ein asymptomatisches Stadium vorausgeht. Ein solches Zeitfenster, so kurz es auch sei, ist immer eine Gelegenheit, um mit geeig-

neten Maßnahmen Erkrankung zu verhindern. Eine potentiell bedrohliche Krankheit früh zu erkennen und einer wirksamen, verhältnismäßigen Therapie zuzuführen ist eine höchst wert- und sinnvolle Maßnahme. Wüsste man beispielsweise, welche arteriosklero-

tische Plaque im Koronarbett wann genau rupturieren wird, könnte man viele Herzinfarkte durch eine rechtzeitige, perkutane Angioplastie der Kranzarterien verhindern. Dieses Konzept der Früherkennung einer Krankheit im asymptomatischen Stadium (Abb. 1) hat mit der Entwicklung leistungsfähiger, molekularmedizinischer Verfahren in den letzten Jahren Aufschwung erhalten.

Die wichtigsten, genetischen Untersuchungsverfahren

Der Begriff „molekulare Diagnostik“ ist nicht auf den Nachweis und die Analyse von krankmachenden Genen in DNA oder RNA beschränkt. Genetische Untersuchungen im engeren Sinn haben jedoch wegen ihrer Präzision, Sensitivität und Spezifität den Begriff „molekulare Diagnostik“ in den letzten Jahren zunehmend besetzt. Deshalb werden, um begriffliche Klarheit zu schaffen, die wichtigsten genetischen Testverfahren, die in der Humanmedizin zur Anwendung kommen, hier kurz besprochen (Tab. 1).

Zytogenetik

Die Zytogenetik ist wohl eines der ältesten Laborverfahren welches für genetische Untersuchungen zur Anwendung kommt. Technisch-praktisch nutzt dieser Test die Tatsache, dass sich die Chromosomen einer Zelle im Rahmen der Mitose so entflechten und aufwickeln, dass sie als Einzelpartikel sichtbar werden. Die Länge der Chromosomenarme und das typische Bandenmuster bei der Anfärbung erlaubt die Identifikation von Chromosomenanomalien.

FISH

Bei der sogenannten FISH (*fluorescent in situ hybridization*) werden mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehene Oligo-

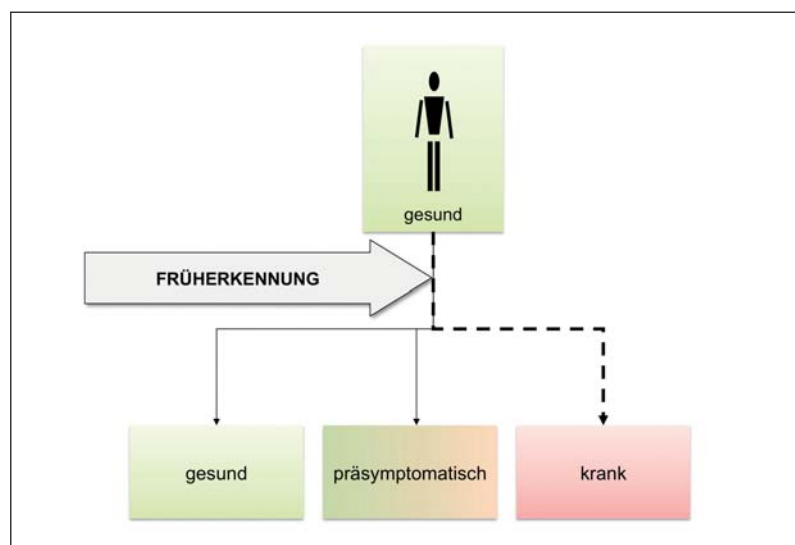


Abbildung 1 Das Konzept der Früherkennung. Im Verlaufe seines Lebens entwickelt ein Mensch Krankheiten oder er bleibt gesund. Fast allen Krankheiten geht ein asymptomatisches Stadium voraus. Molekulare Früherkennung ist dann hilfreich, wenn man die Zeit, die bis zum Krankheitsausbruch bleibt, für wirksame, individuelle Prävention oder Therapie nutzen kann.

nukleotide an komplementäre, chromosomale DNA-Abschnitte gebunden (hybridisiert). Im Normalfall werden so die beiden Allele eines Gens in einem einzelnen Zellkern (doppelter Chromosomensatz) sichtbar gemacht.

SSCP

Der sogenannte *SSCP* (*single strand conformational polymorphism*) beruht darauf, dass die gelelektrophoretische Beweglichkeit eines DNA-Stranges von seiner Konformation abhängt. Diese wird von seiner Nukleinsäuresequenz beeinflusst. Wenn ein Genabschnitt aus Zell-DNA mittels PCR amplifiziert wird und das PCR-Produkt auf einem Gel getrennt, wandern mutierte und nicht-mutierte DNA-Stränge unterschiedlich weit. Die SSCP ist so sensitiv, dass Punktmutationen, also auch SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), identifiziert werden können.

RFLP

Der sogenannte *RFLP* (*restriction fragment length polymorphism*) nutzt die

große Vielfalt von Restriktionsenzymen aus, welche von Bakterien produziert werden und welche DNA an enzym-typischen Stellen sehr spezifisch schneiden. Für viele Genpolymorphismen findet sich ein Restriktionsenzym, das diese veränderte Stelle in der DNA spezifisch erkennen und schneiden kann. Der RFLP ist ein einfacher, augenfälliger, schneller und technisch wenig aufwendiger Test

Gensequenzierung

Schließlich erlaubt die *Gensequenzierung* die Identifikation der einzelnen Nukleinsäuresequenzabfolge. Sie ist der direkteste Beweis für das Vorliegen einer bestimmten Genvariante oder Mutation.

Obwohl einige dieser Verfahren keine aufwendige oder teure Infrastruktur brauchen, werden genetische Tests mit Vorteil in dafür speziell akkreditierte Laboratorien geschickt. Eurogentest ist eine europäische Initiative, welche im Bereich der genetischen Testdurch-

führung Standards entwickelt, einsetzt und überprüft (<http://www.eurogentest.org/laboratories/>). In der Schweiz stellt die Schweizerische Gesellschaft für Medizinische Genetik eine Liste autorisierter Labors zur Verfügung (www.sgm.ch).

Das Konzept der Früherkennung im Zeitalter der molekularen Medizin

Für die molekulare Früherkennung einer Krankheit wäre es ideal, wenn bestimmte Genvarianten oder Gensequenzmuster mit dem Erkrankungsrisiko eng verknüpft wären. Dies ist z. B. für Infektionskrankheiten, einem Sonderfall der erworbenen, genetischen Erkrankungen, der Fall.

Beispiel 1: der Nachweis von retroviraler HIV-spezifischer RNA im Blut ist die Basis für die Diagnose „HIV-Infektion“. Sie geht unbehandelt mit großer Sicherheit in die bekannte, erworbene Immunschwächekrankheit AIDS über

Tabelle 1 Die wichtigsten, häufig gebrauchten molekulargenetischen Untersuchungsverfahren.

Test	Besonderheiten
Zytogenetik (Chromosomenanalyse)	Orientierende Untersuchung auf das Vorliegen grober genetischer Veränderungen (z.B. Monosomien, Trisomien, Deletionen, Translokationen etc.). Untersuchungsmaterial: Metaphasenchromosomen
Fluoreszierende in situ Hybridisierung (FISH)	Nachweis umschriebener, bekannter Genvariationen (z.B. Translokationsstellen, Y-Chromosom, Homo- und Heterozygotie, loss of heterozygosity LOH etc.) Untersuchungsmaterial: Metaphasenchromosomen oder Gewebe (Interphasenkerne)
Einzelstrangkonformationspolymorphismus (SSCP)	Orientierender Suchtest zur Identifikation einer Genvariante (z.B. Punktmutation) in einem mittels serieller PCR amplifizierten Gen. Untersuchungsmaterial: PCR-Produkt
Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)	Identifikation einer Genvariante (z.B. Punktmutation) mit Hilfe eines DNA-schneidenden, sequenzspezifisch aktiven Enzyms. Untersuchungsmaterial: PCR-Produkt
Gensequenzierung	Bestimmung der Nukleinsäuresequenz eines Genabschnittes (einige hundert Nukleotide). Geeignet für die Identifikation neuer Mutationen oder als Bestätigungstest. Untersuchungsmaterial: PCR-Produkt

und stellt im Sinne der Früherkennung also eine „asymptomatische“ Vorstufe einer Krankheit dar.

Lägen krankheitsrelevante Genprofile oder Polymorphismen in der Keimbahn vor, wären sie bei jedem Individuum postkonzeptionell unveränderlich vorgegeben und könnten jederzeit (d.h. auch schon im jugendlichen Alter) untersucht werden. Ein derartiger Test müsste naturgemäß nur ein einziges Mal im Leben gemacht werden und er wäre in idealer Weise geeignet für eine Frühdiagnose.

Diese Voraussetzungen mögen für klassische, hereditäre monogenetische Krankheiten mit hoher Penetranz bis zu einem gewissen Grad erfüllt sein.

Beispiel 2: ein Träger von mehr als 40 CAG-Repeats (dies sind repetitive Abfolgen von 3 Nukleotiden: Cytosin-Adenin-Guanin und die Anzahl solcher Repeats ist bei Personen, die an Chorea Huntington erkranken, erhöht) im Huntington-Gen von Chromosom 4 erkrankt praktisch immer an dieser schweren, neuropsychiatrischen Krankheit.

Für die viel häufigeren, komplexen polygenen Erkrankungen haben sich derartige molekulargenetische Tests bis heute nicht durchgesetzt. Die klinischen Grenzen rein genomischer Diagnoseverfahren liegen darin begründet, dass in den seltensten Fällen die genetische Veranlagung allein determiniert, ob eine Krankheit ausbricht oder nicht. Mehrheitlich sind Umweltfaktoren als krankheitsauslösende Mechanismen involviert.

Beispiel 3: Eine Trägerin einer FaktorV-Leiden-Mutation hat ein nur leicht erhöhtes Risiko an einer Thromboembolie zu erkranken. Wenn die betreffende Person aber raucht oder Ovulationshemmer einnimmt, steigt dieses Risiko sprunghaft an [1].

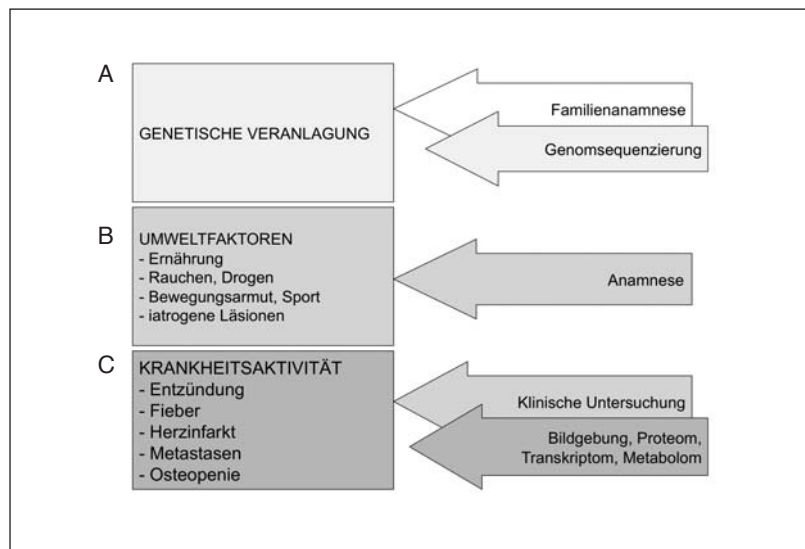


Abbildung 2 Medizinische Methoden zur Früherkennung. A. Die genetische Veranlagung kann durch die Familienanamnese oder durch mehr oder weniger vollständige genetische Testungen abgeschätzt werden. B. Schädliche Umweltfaktoren lassen sich am einfachsten durch die Anamnese erfassen. C. Die Krankheitsaktivität kann mit der klinischen Untersuchung, bildgebenden Verfahren aber auch mit umfassenden Expressionsanalysen (Transkriptom, Proteom, Metabolom) beschrieben werden.

Schließlich ist gut bekannt, dass es genetische Konstellationen gibt, die den Ausprägungsgrad einer krankheitsauslösenden Mutation mitgieren und deshalb deren Penetranz reduzieren können. Das bedeutet, dass ein Mensch zwar eine bestimmte Mutation trägt, aber dennoch nicht erkrankt. Um hier nicht unnötig Ängste zu schüren sieht man grundsätzlich davon ab, Gentests ohne klinische Verdachtsdiagnose durchzuführen. Diesem Umstand wird in der Praxis der medizinischen Genetik dadurch Rechnung getragen, dass man einen Patienten (Propositus) in der Regel nur dann auf das Vorliegen einer krankheitsauslösenden Genvariante hin untersucht, wenn er selber manifeste Krankheitszeichen aufweist. Gelingt der Nachweis einer entsprechenden Mutation kann es sinnvoll sein, Verwandte auch im asymptomatischen Stadium daraufhin zu untersuchen. Dies insbesondere dann, wenn

gute präventive Maßnahmen bestehen. Das Wissen um hereditäre, vererbare Krankheiten wird in einer Familie oft tabuisiert. Wegen der für das Individuum je nachdem sehr schwerwiegenden Bedeutung und unveränderlichen Natur der Ergebnisse ist der Umgang mit genetischen Untersuchungen beim Menschen in der Schweiz gesetzlich (http://www.admin.ch/ch/d/sr/c810_12.html) geregelt.

Umfassende Früherkennung zielt darauf ab, genetische Veranlagung (Prädisposition), schädigende Umweltfaktoren und präklinische Krankheitsaktivität für den einzelnen Patienten zu erfassen (Abb. 2), eine möglichst genaue Diagnose vorzunehmen um daraus dann die bestmögliche, personalisierte Behandlung abzuleiten. Diese Idee ist nicht neu. Doch während früher Familienanamnese und körperliche Untersuchung die einzigen Methoden

Tabelle 2 Technologien die zur umfassenden Charakterisierung biologischer Untersuchungsproben (Gewebe, Serum oder Plasma, Körperflüssigkeiten etc) angewendet werden.

Verfahren	Prinzip und Besonderheiten der Methoden
Nukleinsäure-Chips oder -Arrays	Verschiedene Oligonukleotide werden analog zur Mikrochip-Technologie auf ein Trägermaterial aufgebracht (spotted). Auf kleinstem Raum können so viele Nukleinsäuresequenzen als detektierende Proben vorgelegt werden (zum Beispiel: alle relevanten Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNP) des menschlichen Genoms). Durch die rasterartige Anordnung können die einzelnen Oligonukleotidspezies wie die Felder eines Schachbretts identifiziert werden. Eine Testprobe, welche Nukleinsäurefragmente enthält, wird mit dem Array inkubiert, und die spezifisch bindenden, komplementären DNA-Sequenzen durch Einfärbung sichtbar gemacht. Untersuchungsmaterial: Nukleinsäuregemische (Genome, Transkriptome)
Phagen-Bibliotheken	Bakteriophagen sind Viren, welche in Bakterien leben. Wird das Phagen genom genetisch modifiziert, werden die entsprechenden Gene auch in den Phagen-tragenden Bakterien exprimiert. Diese symbiotisch lebenden Mikroorganismen können dazu verwendet werden, Proteinliganden (z.B. Antikörper) zu exprimieren. Werden nicht nur einige wenige, sondern alle denkbaren möglichen Bindungsmotive so exprimiert, spricht man von einer Phagen-Bibliothek. Diese enthält problemlos mehrere Millionen einzelner Liganden und kann für Suchexperimente (Screenings) herangezogen werden. Dabei werden aus der gesamten Bibliothek jene Liganden identifiziert, die am besten ein bestimmtes Molekül erkennen und binden. Untersuchungsmaterial: Proteingemische (Proteom)
HPLC/Massenspektrometrie	Mit diesem Verfahren werden komplexe biologische Materialien chromatographisch aufgetrennt und die Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen bis auf die molekulare Ebene genau charakterisiert. Untersuchungsmaterial: Protein- und Peptidgemische (Proteom), Metaboliten (Metabolom, Lipidom).

* High-performance liquid chromatography

waren, um den hereditär-genetischen Hintergrund einer Erkrankung und deren Manifestationsgrad oder „Phänotypen“ zu erfassen, stehen heute umfassende, sogenannte „komprehensive“ Testverfahren (Tab. 2) zur Verfügung, mit denen die Gesamtheit der Gene (=„Genom“), die Gesamtheit der Proteine (=„Proteom“) und beliebige weitere „-ome“ (z. B. Transkriptome, Metabolome, Lipidome) eines einzelnen Menschen, seiner Gewebe und Organe, untersucht werden können [2]. Den nukleinsäurebasierten, genetischen Krankheitsmerkmalen werden Biomarker gegenübergestellt. Ein Biomarker ist ein Indikator eines physiologischen oder pathogenen Prozesses, der einer objektiven Messung zugänglich ist [3]. Biomarker (z. B. der Blutdruck, das CRP, das HbA1c usw) sind mit der Zeit

veränderliche Parameter, währenddem Genpolymorphismen oder -mutationen in den betroffenen Zellen und Geweben in der Regel unveränderlich vorliegen. Ergänzt werden diese Methoden durch moderne bildgebende Verfahren (sog. „molecular imaging“ [4]), welche bestimmte molekulare Krankheitsmerkmale im Körperinneren (wie z. B. Entzündung in einer arteriosklerotischen Plaque) nachweisen können. Für die schnelle und einfache Erfassung einer Exposition gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen bleibt die Anamnese heute weiterhin konkurrenzlos.

Die Vision der präzisen, molekularen Diagnose erhielt mit der vollständigen Sequenzierung des menschlichen Genoms um die Jahrtausendwende großen Auftrieb [5], doch das Angebot an

guten, validierten molekularen Testverfahren hinkt bis heute der großen Nachfrage im Bereich der häufigen, komplexen und erworbenen, genetisch bedingten Krankheiten hinterher (Abb. 3).

Der Ruf nach translationaler Medizin

Um die klaffende Lücke zwischen dem riesigen Wissensschatz, den die Entschlüsselung des menschlichen Genoms gehoben hat, und der sinnvollen, nützlichen medizinisch-klinischen Anwendung zu schließen, erklang der Ruf nach translationaler Medizin: Kluge und geschickte „Übersetzer“ waren gefragt: Ärzte, die mit Patienten und Grundlagenwissenschaftlern sprechen

und beide verstehen konnten. Mit diesem Schritt wurden relevante klinische Fragestellungen definiert und formuliert, auf welche die heute unglaublich leistungsfähige Biomedizin mehr oder weniger gut antworten kann. Es gibt heute kaum einen Bereich der Medizin mehr, in den die molekulare Medizin und entsprechende Testverfahren nicht Einzug gehalten hätten. Doch nur in wenigen Fächern haben sie sich gegen die etablierten Labortests durchgesetzt oder diese sogar als quasi Goldstandard-Verfahren abgelöst. Ein Beispiel dafür ist sicher die Infektiologie, dort wiederum vor allem die globale Epidemiologie, wo molekulare Früherkennung in den letzten Jahren einen revolutionären Charakter angenommen hat: HIV, SARS, H5N1, H1N1, um nur einige wenige Beispiele zu nennen. Nur Google – Spiegel der menschlichen Neugier! – ist heute gleich schnell oder gar schneller als molekulargenetische Tests [6].

Wohin geht die Reise?

Das Wissen um den genetischen Bauplan verschiedener Organismen (inklusive des Menschen), die leistungsfähigen, umfassenden molekularen Untersuchungsmethoden und letztlich die Leichtigkeit der IT-basierten, elektronischen Archivierung all dieser Informationen eröffnet faszinierende Perspektiven für die Entwicklung der Medizin. Wenn heute die klinisch richtigen und wichtigen Fragen gestellt werden, sind bemerkenswerte Therapieerfolge möglich (Beispiel: Imatinib bei Chronisch myeloischer Leukämie oder TNF-Blockade bei rheumatoider Arthritis). Der Aufwand für die sorgfältige, klinische Prüfung innovativer Diagnose- und Behandlungsverfahren darf jedoch nicht unterschätzt werden. So hat man in den letzten Jahren gleich mehrmals schmerzlich erfahren müs-

sen, dass Surrogatmarker, welche zur schnelleren Abschätzung eines scheinbar günstigen Therapieeffektes herangezogen wurden, die harten Endpunkte (z. B. kardiovaskuläre Ereignisse bei lipidmodulierenden oder blutzuckersenkenden Therapien) in klinischen Studien nicht ersetzen [7]. Wir selber haben in einer eigenen kleinen Fall-Kontrollstudie untersucht, ob bekannte, mit kardiovaskulären Ereignissen und Myokardinfarkt assoziierte Genpolymorphismen auch bei unseren Patienten mit symptomatischer Arteriosklerose gehäuft vorkommen. Von 9 untersuchten SNPs fand sich nur ein einziger signifikant gehäuft bei den arteriosklerosekranken Patienten, und 6 waren sogar häufiger bei asymptomatischen Patienten [8]. Wir haben festgestellt, dass die sorgfältige, möglichst umfassende klinische Untersuchung jedem der von uns untersuchten Poly-

morphismen, aber auch den neuen Biomarkern der Arteriosklerose, zur Einschätzung der Krankheitsaktivität weit überlegen ist [9]. Diese eigene Beobachtung ist für den Kliniker tröstlich: es braucht heute wirklich große Würfe um Altbewährtes, Gutes deutlich zu übertreffen. Dann wird Innovation allerdings spürbar, indem sie das Erscheinungsbild von Krankheiten radikal verändert (Beispiel: Erregerkultur, Resistenzprüfung und Antibiotikatherapie bei bakteriellen Infekten; Koronarangiographie und katheterbasiertes Revaskularisationsverfahren bei Arteriosklerose; Nachweis der bcr-abl Translokation und Therapie mit Imatinib bei Chronisch myeloischer Leukämie). Verlieren wir als Ärzte nicht den Mut, diese Art des echten Behandlungsfortschrittes für unsere Patienten zu fordern! Die Zeit für derartige Meilensteine ist reif.

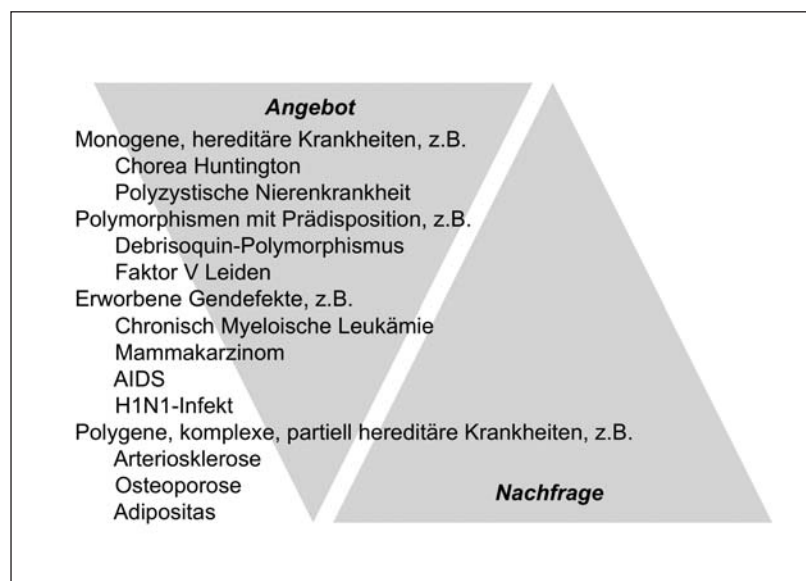


Abbildung 3 Das Angebot und die Nachfrage an molekularen Tests. Lange Zeit waren die molekulargenetischen Tests für die Diagnose der klassischen, monogenen hereditären Leiden reserviert. Heute holen die im klinischen Alltag deutlich wichtigeren erworbenen genetischen Krankheiten (Infekte und Tumore) auf. Der größte Nachholbedarf an klinisch nützlichen, molekulargenetischen Testverfahren besteht im Bereich der polygenen, komplexen Erkrankungen.

Danksagung

Diesen Beitrag widme ich mit großer Dankbarkeit meinen Mitarbeitern und Kollegen, die mir in den letzten 10 Jahren geholfen haben, molekulare Medizin zu praktizieren.

Molecular tests in modern medicine – concepts, technical aspects and future direction

Early diagnosis by molecular tests has increasingly caught attention after deciphering the complete human genome sequence in 2001. Meanwhile, complete genome sequencing will soon become available for each individual. Molecular testing is standard of care in certain infectious or malignant diseases. Novel biomarkers are emerging as a result of modern comprehensive procedures (transcriptomics, proteomics, metabolomics etc). However, hype and hope are particularly close in this field and responsible conduct by clinicians will ensure beneficial use of new tests.

Literatur

1. Vandenbroucke JP, Koster T, Briet E, Reitsma PH, Bertina RM, Rosendaal FR. Increased risk of venous thrombosis in oral-contraceptive users who are carriers of factor V Leiden mutation. *Lancet*. 1994 Nov 26; 344: 1453–7.
2. Biedermann BC. Das Molekular-Medizinische Teleskop. 1 ed.: Schwabe Verlag; 2005.
3. Tardif JC, Heinonen T, Orloff D, Libby P. Vascular biomarkers and surrogates in cardiovascular disease. *Circulation*. 2006 Jun 27; 113: 2936–42.
4. Weissleder R, Pittet MJ. Imaging in the era of molecular oncology. *Nature*. 2008 Apr 3; 452: 580–9.
5. Collins FS. Shattuck lecture – medical and societal consequences of the Human Genome Project. *N Engl J Med*. 1999 Jul 1; 341: 28–37.
6. Ginsberg J, Mohebbi MH, Patel RS, Brammer L, Smolinski MS, Brilliant L. Detecting influenza epidemics using search engine query data. *Nature*. 2009 Feb 19; 457: 1012–4.
7. Barter PJ, Caulfield M, Eriksson M, Grundy SM, Kastelein JJ, Komajda M, et al. Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *N Engl J Med*. 2007 Nov 22; 357: 2109–22.
8. Erzberger P, Gombert MT, Mutschelknauss M, Wyler von Ballmoos M, Biedermann BC. A CETP polymorphism improves diagnostic power of clinical examination in patients with cardiovascular disease. A case-control study. *Swiss Medical Weekly*. 2010 May 29; 140: 307–13.
9. Mutschelknauss M, Kummer M, Muser J, Feinstein SB, Meyer PM, Biedermann BC. Individual assessment of arteriosclerosis by empiric clinical profiling. *PLoS ONE*. 2007; 2: e1215.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. med. Barbara C. Biedermann
Medizinische Universitätsklinik
Kantonsspital
CH - 4101 Bruderholz

ab 1.7.2010:
FMH Innere Medizin
Stapfenstraße 18
8345 Adetswil

barbara.biedermann@unibas.ch