

# Genexpressionsprofile in Tumordiagnostik und Krankheitsmanagement

Malte Buchholz, Wolfgang Böck, Thomas Gress

Abteilung Innere Medizin I  
Universität Ulm

## Zusammenfassung

Die klinische Anwendung der Array-Technologie verspricht für die Zukunft wesentliche Fortschritte bei der exakten Diagnose und individualisierten Behandlung von Tumorerkrankungen. Array-Hybridisierungen können wertvolle Informationen über Herkunft, proliferatives und metastatisches Potential sowie Therapierbarkeit eines Tumors beisteuern. Noch gilt es allerdings, eine Reihe von konzeptionellen und methodischen Herausforderungen zu meistern, zu denen die optimale Nutzung der bereits verfügbaren Daten, die Auswahl zuverlässiger Normalisierungsverfahren zur Auswertung der „Diagnose-Chips“ und die Entwicklung von sensitiven Methoden zur Erstellung von Expressionsprofilen aus extrem begrenzten Mengen an Untersuchungsmaterial gehören.

## Schlüsselwörter

Expressionsprofilanalysen, Molekulare Diagnostik, individualisierte Therapie

## Gene expression profiles in tumor diagnostics and disease management

### Summary

The clinical application of array technologies promises for the future substantial advancements in the field of sophisticated diagnostics and individualized treatment of cancer. Array hybridizations can yield valuable information about the origin, proliferative and metastatic potential as well as the susceptibility to various forms of treatment of a tumor. To date, however, there remain a number of conceptual and methodological challenges to be met, including the optimal utilization of the available data, the selection of reliable normalization procedures for the interpretation of the hybridization results, and the developments of sensitive methods for the generation of expression profiles from minute amounts of sample material.

### Keywords

Expression profiling, molecular diagnostics, individualized therapy

Das enorme Potential der Array-Technologie eröffnet auch auf den Gebieten der Tumor-Diagnostik und -Therapie vielversprechende neue Möglichkeiten. Einerseits trägt die Erstellung komplexer Genexpressionsprofile einer möglichst großen Anzahl von Tumoren im Vergleich zu gesundem Gewebe entscheidend zur Gewinnung von Erkenntnissen über die der Tumorgenese zugrundeliegenden genetischen Veränderungen bei, und kann auf diese Weise zur Identifizierung von neuen prognostischen Markern oder potentiellen therapeutischen Angriffspunkten beitragen (Gress et al., 1996; Geng et al., 1998; Backert et al., 1999). Andererseits können die Daten aus Array-Hybridisierungen und anderen Expressionsanalyse-Experimenten (Differential Display, SAGE, cDNA-RDA u.a.; siehe z.B. Velculescu et al., 1995; Geng et al., 1998) dazu genutzt werden, um hochspezialisierte, aus individuell selektierten Genen bestehende Mikroarrays zu konstruieren, die eine umfassende molekulare Charakterisierung individueller Tumore im Rahmen der klinischen Diagnose und Therapie erlauben.

Ziel des Einsatzes solcher „Diagnose-Chips“ ist es, aus Biopsiematerial von Tumorpatienten aussagekräftige Expressionsprofile zu erstellen, die ein möglichst breites Spektrum diagnostisch und therapeutisch relevanter Fragestellungen beantworten. 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, um Primärtumore



**Abb 1 Falschfarb-Überblenddarstellung von Hybridisierungen mit dem Prototyp eines Pankreaskarzinom-Diagnose-Arrays**

Für den Array wurden cDNA-Fragmente von zunächst ca. 100 verschiedenen Genen, die auf der Basis vorausgegangener Expressionsprofil-Analysen (Gress et al., 1996) ausgewählt wurden, jeweils in Duplikaten auf 7 x 4 cm große Nylon-Membranen aufgedruckt und mit radioaktiv markierter Gesamt-mRNA aus Gewebeproben je eines Patienten mit Pankreas-Karzinom bzw. chronischer Pankreatitis hybridisiert. Gene, die nur in der chronischen Pankreatitis exprimiert werden, erscheinen in grün, Pankreaskarzinom-spezifische Signale in rot und gleichmäßig exprimierte Gene in gelb.

von Metastasen unterscheiden bzw. die ungefähre Lokalisation eines noch nicht identifizierten Primärtumors vorhersagen zu können. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Ross et al. (2000) konnten die Autoren zeigen, dass selbst unter den hochartifizialen Bedingungen der in-vitro Kultur von Zelllinien die gewebe- und zelltyp-spezifischen Expressionsmuster weitgehend stabil bleiben, so dass die auf der Basis von Cluster-Analysen vorgenommene Zusammenfassung von Zelllinien in distinkte Gruppen häufig die gemeinsame Abstammung der Linien aus einem bestimmten Ursprungsgewebe widerspiegelt.

Auch die differentialdiagnostisch oftmals schwierige Abgrenzung von malignen gegenüber benignen oder entzündlichen Prozessen lässt sich mit einer geeigneten Genauwahl bewerkstelligen. Derzeit wird in unserer Arbeitsgruppe ein Prototyp eines Arrays evaluiert, der die klinisch z.T. sehr schwierige Differenzierung zwischen einem entzündlichen Tumor bei chronischer Pankreatitis und einem Pankreaskarzinom mit entzündlicher Begleitreaktion erlaubt (s. Abbildung 1). Andere Arbeitsgruppen haben array-basierte Expressionsprofil-Analysen bereits erfolgreich zur Differenzierung verschiedener Formen akuter Leukämien (Golub et al., 1999) bzw. zur Definition von unterschiedlichen Subtypen beim ‚diffuse large B-cell lymphoma‘ eingesetzt (Alizadeh et al., 2000).

Über die rein diagnostische Anwendung hinaus liegt jedoch ein großes Potential 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, deren Expressionsstärken Informationen über den zu erwartenden Verlauf der Erkrankung liefern können. Zum Beispiel weist eine Überexpression von Wachstumsfaktoren oder ihren Rezeptoren bzw. die Ausbildung von sog. ‚autocrine loops‘ auf ein ausgeprägtes proliferatives Potential des Tumors hin, während eine Deregulation von Matrix-Metalloproteinasen und ihren Inhibitoren sowie Veränderungen im Spektrum der extrazellulären Strukturproteine Rückschlüsse auf die Neigung zur Metastasierung zulassen. Gleichzeitig lässt sich das stetig zunehmende Wissen über die Mechanismen der Resistenzbildung gegen bestimmte Chemotherapeutika und die daran beteiligten Gene, zu deren prominentesten Vertretern das ‚Multi-drug Resistance Gen‘ (mdr-1), die Thymidilat-Synthase (TS) sowie die Mitglieder der Cytochrom P450-Familie gehören, dazu nutzen, um im Zusammenspiel mit den oben beschriebenen Analysen und weiteren klinischen Parametern bereits im Vorfeld einer Therapie die jeweils erfolgversprechendste Kombination verschiedener therapeutischer Verfahren und Nachsorgemaßnahmen zu ermitteln.

Wie bereits erwähnt, ergibt sich die theoretisch maximal erreichbare Informationsausbeute für ein gegebenes Hybridisierungsexperiment aus der

Auswahl der auf dem Array repräsentierten Gene. Die rasant fortschreitende Entwicklung auf dem Gebiet komplexer Expressionsanalysen und die Einrichtung öffentlich zugänglicher Datenbanken, die jedem Forscher Zugriff auf die akkumulierten Daten erlauben (siehe z.B. <http://genome-www.stanford.edu/nci60/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/UniGene/ddd?ORG=Hs> und <http://www.sage.net.org>), lässt erwarten, dass die Konzeption von aussagekräftigen Arrays in Zukunft deutlich erleichtert wird (vgl. Brors in diesem Heft). Die größte Herausforderung für die routinemäßige klinische Anwendung der Array-Technologie liegt zweifellos in der meist extrem begrenzten Menge des zur Verfügung stehenden Untersuchungsmaterials. Systematische Untersuchungen müssen zeigen, ob die mit gängigen Biopsie-Methoden gewonnenen Probenmengen ausreichen, um die Erstellung von verlässlichen Expressionsprofilen zu ermöglichen, und welche Aufarbeitungs- und ggf. Amplifikationsprotokolle geeignet sind, um die Sensitivität der Detektion ohne Verlust an Linearität zu verbessern (vgl. Gonzalez et al., 1999; Mahadevappa und Warrington, 1999; Phillips und Eberwine, 1996). Ein besonders interessanter Ansatz besteht in der Isolierung zirkulierender Tumorzellen aus peripherem Blut nach dem Prinzip der immunomagnetischen Selektion (Martin et al., 1998). Sofern sich die methodischen Probleme, die sich aus der geringen Konzentration von disseminierten Tumorzellen und der Verunreinigung der Präparationen mit weissen Blutkörperchen ergeben,

überwinden lassen, läge hierin eine äußerst attraktive Möglichkeit, aus einfach zu gewinnenden Blutproben wertvolle Informationen über Vorhandensein und Eigenschaften eines Tumors zu gewinnen.

Neben diesen speziellen Überlegungen sind für die Konzeption und Verwendung von „Diagnose-Chips“ einige Punkte zu beachten, die für die Arbeit mit Expressionsanalyse-Arrays ganz allgemein gelten. Wichtigste Voraussetzung für die Erzeugung standardisierter, untereinander vergleichbarer Ergebnisse ist die Einführung von Normalisierungsverfahren, die anhand möglichst invariabler Bezugsgrößen die Umrechnung der in individuellen Hybridisierungsexperimenten ermittelten Expressionsstärken in konstante Maßeinheiten erlauben. Gerade für spezialisierte Arrays mit jeweils relativ kleiner Genauswahl, für die wegen des hohen Anteils potentiell differentiell exprimierter Gene die mittlere Signalstärke aller repräsentierten Gene als Bezugsgröße unbrauchbar ist, ist die Wahl des Normalisierungsverfahrens von entscheidender Bedeutung. Auch hier müssen breitangelegte Untersuchungsreihen erweisen, welche Methoden geeignet sind, um die für den routinemäßigen Einsatz der Array-Technologie in Diagnostik und Krankheitsmanagement erforderliche Validität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt existieren also bezüglich der klinischen Anwendung von Mikroarrays noch wesentlich mehr offene Fragen als befriedigende Antworten. Angesichts der enormen Möglichkeiten, die diese neue Technologie bietet, und der zu erwartenden erheblichen Vorteile für die Patienten ist es daher von großer Bedeutung, dass die anstehenden

konzeptionellen und methodischen Probleme so rasch wie möglich gelöst werden.

**Literatur**

Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J Jr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403:503-511.

Backert S, Gelos M, Kobalz U, Hanski M-L, Böhm C, Mann B, Lövin N, Gratchev A, Mansmann U, Moyer MP, Riecken E-O, Hanski C (1999) Differential gene expression in colon carcinoma cells and normal tissues detected with a cDNA array. *Int. J. Cancer* 82:868-874.

Gonzalez P, Zigler JS, Epstein DL, Borras T (1999) Identification and Isolation of Differentially Expressed Genes from Very Small Tissue Samples. *BioTechniques* 26:884-892.

Geng M, Wallrapp C, Müller-Pillasch F, Frohme M, Hoheisel JD, Gress TM (1998) Isolation of differentially expressed genes by combining representational difference analysis (RDA) and cDNA library arrays. *Biotechniques* 25:434-438.

Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES (1999) Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286:531-537

Gress TM, Müller-Pillasch F, Geng M, Zimmerhackl F, Zehetner G, Friess H, Büchler M, Adler G, Lehrach H (1996) A pancreatic cancer-specific expression profile. *Oncogene* 13:1819-1830.

Mahadevappa M, Warrington JA (1999) A high-density probe array sample preparation method using 10- to 100-fold fewer cells. *Nat. Biotechnol.* 17:1134-1136.

Martin VM, Siewert C, Scharl A, Harms T, Heinze R, Öhl S, Radbruch A, Miltenyi S, Schmitz J (1998) Immunomagnetic enrichment of disseminated epithelial tumor cells from peripheral blood by MACS. *Exp. Hepatol.* 26:252-264.

Phillips J, Eberwine JH (1996) Antisense RNA Amplification: A Linear Amplification Method for Analyzing the mRNA Population from Single Living Cells. *Methods* 10:283-288.

Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Waltham M, Pergamenschikov A, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Myers TG, Weinstein JN, Botstein D, Brown PO (2000) Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet.* 24:227-235.

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW (1995) Serial Analysis of Gene Expression. *Science* 270:484-487.

**Korrespondenzadresse**

PD Dr. Thomas Gress  
Abteilung Innere Medizin I  
Universität Ulm  
Robert-Koch-Str. 8  
D-89081 Ulm  
Tel. +49-731-5024385  
Fax +49-731-5024102  
thomas.gress@medizin.uni-ulm.de

Anzeige



**DYOMICS**  
INNOVATIONS FOR LIFE SCIENCE

## Diodenlaserkompatible Fluoreszenzmarker

*made in Germany*

**Dyomics GmbH**  
Winzerlaer Str. 2A  
D-07745 Jena

☎ 03641-508 200  
☎ 03641-508 203  
www.dyomics.com  
info@dyomics.com

**Produkte**

- Fluoreszenzmarker (NHS-Ester)
- Konjugate (Avidin, Streptavidin)
- lipophile Fluorophore
- Sensor-Farbstoffe & Indikatoren
- NIR-Chromophore

**Service**

- Entwicklung von Fluorophoren
- Konjugate gemäß Kundenwunsch
- Auftragsforschung
- Auftragssynthese
- Consulting