

Arbeitsgruppenbericht

Multiparametrische Diagnostik in der Pathologie¹⁾

Multiparametric diagnostic methods in pathology

Paul Cullen^{1,a,*}, Harald Funke², Hanns-Georg Klein³, Thomas Langmann⁴, Thomas Miethke⁵, Michael Neumaier⁶ und Guido Sauter⁷

¹ MVZ für Laboratoriumsmedizin, Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie, Hygiene und Umweltmedizin Dr. Löer, Dr. Treder und Kollegen, Münster, Deutschland

² Stiftungslehrstuhl für Molekulare Hämostaseologie, Institut für Vaskuläre Medizin der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena, Deutschland

³ Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin Dr. Klein und Dr. Rost, Martinsried, Deutschland

⁴ Institut für Humangenetik der Universität Regensburg, Regensburg, Deutschland

⁵ Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München, München, Deutschland

⁶ Institut für Klinische Chemie, Medizinische Fakultät Mannheim, Universitätsklinikum Mannheim der Universität Heidelberg, Mannheim, Deutschland

⁷ Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Zusammenfassung

Die Arbeitsgruppen Chipdiagnostik und Bioinformatik der DGKL haben sich bei ihrer Jahrestagung 2008 mit Anwendungen der arraybasierten Technologie in der Pathologie beschäftigt. Hauptthemen waren neue Entwicklungen auf dem Feld der Gewebematrizes oder Multigewebeblöcken (engl. tissue arrays), Anwendungen der multiparametrischen Analytik in der epigenetischen Regulation der Genaktivität, sowie die arraybasierte vergleichende genomische Hybridisierungstechnologie (engl. array comparative genomic hybridization oder Array-CGH). Diese Methoden finden bereits heute besonders in der Charakterisierung von Tumorzellen und -gewebe einen breiten Einsatz und haben die Krebsdiagnostik

¹⁾Bericht über die 7. Jahrestagung der Arbeitsgruppe Chipdiagnostik/3. gemeinsame Jahrestagung der Arbeitsgruppen Chipdiagnostik und Bioinformatik der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, Evangelische Akademie, Tutzing am Starnberger See, 29.–30. Mai 2008.

^aVorsitz der AG Chipdiagnostik

*Korrespondenz: Prof. Dr. Paul Cullen, MVZ für Laboratoriumsmedizin Dr. Löer, Dr. Treder und Kollegen, Hafengeweg 11, 48147 Münster, Deutschland
E-Mail: p.cullen@labor-muenster.de

erheblich vorangebracht. Ein wichtiges Ergebnis der Tagung war die Erkenntnis, dass bei der hochparallelen Analytik die technischen Möglichkeiten der klinischen Anwendung voraus sind. Deshalb besteht ein erheblicher Bedarf vor allem an begleitender klinischer Forschung, um die Anwendbarkeit und die Bedeutung dieser Diagnostik zu präzisieren.

Schlüsselwörter: array-CGH; Bioinformatik; Chipdiagnostik; Epigenetik; tissue arrays.

Abstract

In their annual conference in 2008, the Chip Diagnostics and Bioinformatics Working Groups of the Joint German Society of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine dealt with applications of array-based technology in the field of pathology. The major themes of the conference were new developments in area of tissue arrays, multiparametric analysis in epigenetic gene regulation, and array comparative genomic hybridization. These methods are already being widely used in the characterization of tumour cells and tissue and represent a significant advance in cancer diagnostics. One important result of the meeting was the recognition that in the field of highly parallel analysis, the technical possibilities currently exceed our ability to put them to clinical use. For this reason, there is a particularly pressing need for accompanying clinical research in order to better define the uses and importance of these diagnostic tools.

Keywords: array-CGH; bioinformatics; chip diagnostics; epigenetics; tissue arrays.

Einleitung

Inzwischen wird die Chiptechnologie in allen Bereichen der in-vitro-Diagnostik einschließlich der Laboratoriumsmedizin, Bakteriologie und Virologie, Humangenetik und Pathologie eingesetzt. Um dieser Entwicklung Rechnung zu tragen, legen die Arbeitsgruppen „Chipdiagnostik“ und „Bioinformatik“ der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin großen Wert auf eine Zusammenarbeit mit anderen Fachgruppen. In dieser interdisziplinären Tradition fand am 29. und 30. Mai 2008 in der Evangelischen Akademie in Tutzing die Jahrestagung der Arbeitsgruppen unter dem

Titel „Microarrays in der Pathologie“ statt. Hierbei wurden drei Schwerpunkte behandelt. Erstens wurden neue Entwicklungen auf dem Gebiet der Gewebematrizes oder Multigewebeblöcke (*tissue arrays*) beschrieben. Solche Gewebematrizes finden schon heute eine breite Anwendung bei der molekularen Charakterisierung von Geweben auf der Ebene der Proteine, Kohlenhydrate und DNA. Den zweiten Schwerpunkt der Tagung bildeten Anwendungen der multiparametrischen Analytik in der epigenetischen Regulation der Genaktivität, die insbesondere bei der Karzinogenese eine Rolle spielen kann. Als drittes Hauptthema widmete sich die Tagung der arraybasierten vergleichenden genomischen Hybridisierungstechnologie (engl. *array comparative genomic hybridization* oder Array-CGH). Diese empfindliche Methode zur hochauflösenden Darstellung genomischer Ungleichgewichte wird bereits in vielen Laboratorien routinemäßig eingesetzt, um kleine Verluste bzw. Zugewinne an genetischem Material zu erkennen, die mit den klassischen Methoden der Zytogenetik und Molekularzytogenetik nicht zu erfassen sind. Die Array-CGH wird auch immer häufiger zur Charakterisierung von Tumorgewebe verwendet.

Michael Neumaier (Mannheim) gab in der Eingangsveranstaltung eine Retrospektive zum „7-jährigen Jubiläum“ der Jahres-Symposien der AG Molekulare und Chipdiagnostik. Er betonte die ausgesprochene Interdisziplinarität der Veranstaltung, zu der bisher Gäste aus Humangenetik, Mikrobiologie, Virologie und Pathologie ebenso wie aus Politik, Ethik, Berufsverbänden und der Industrie beigetragen hätten. Konsequenz und für die Synergieentwicklung erfreulich sei auch die 2006 vollzogene Einbindung der AG Bioinformatik der DGKL als Mitveranstalter, da sich die Tätigkeitsfelder beider AG im Gesamtkontext der komplexen molekularen Diagnostikentwicklung sinnvoll ergänzen. Besonderes Merkmal der Veranstaltung sei der offene Dialog aller in der molekular-diagnostischen Medizin tätigen Fachgebiete als Ermutigung für die Fortentwicklung der Arraytechnologie in der in-vitro-Diagnostik. Die zunehmende Bedeutung der Tutzing-Tagung ließe sich auch an den von Jahr zu Jahr steigenden Teilnehmerzahlen ablesen.

Genexpressionsanalytik

Frank Lyko (Abteilung Epigenetik, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) referierte zur Bedeutung der Methylierung für die Genexpression im Kontext der Karzinomentstehung. Im Bereich der Genpromotoren führt die Methylierung von CpG Dinukleotiden zur Stilllegung (engl. *silencing*) der Genexpression (Epimutation), ein Phänomen, das besonders bei Tumorsuppressorgenen bedeutsam ist. Weiterhin können die Gene für MicroRNA, die zunehmend in ihrer Schlüsselrolle für Entwicklungsentscheidungen akzeptiert sind, methyliert werden. Neue experimentelle und klinisch-wissenschaftliche Untersuchungen zeigen Möglichkeiten auf, über Demethylierung eine Reaktivierung von Tumorsuppres-

sorgen zu erreichen. 5-Azacytidin und 2'Deoxy 5-Azacytidin sind bekannte Zytostatika, die möglicherweise über den Mechanismus der „Revertierung“ von Methylierungen funktionieren. Derzeit ist erst eine unselektive globale genomweite Demethylierung möglich. An der gezielten Beeinflussung von Genen im Methylierungsstoffwechsel wird jedoch gearbeitet.

Durch Natriumbisulfit-Konversion werden die unmethylierten Cytosine in CpG-Motiven einer nativen genomischen DNA durch hydrolytische Deamination in Uracil verwandelt, während methylierte Cytosinbasen geschützt bleiben. Anschließend PCR-Amplifikation, Sequenzierung und der Sequenzvergleich mit Datenbanken erlaubt die Identifikation der unmethylierten und methylierten Cytosine der Proben-DNA. Auf die Bedeutung einer schnellen und quantitativen Analytik wie beispielsweise durch Pyrosequenzierung wurde hingewiesen. Technische Fortschritte erlauben inzwischen neben der Untersuchung des globalen Methylierungsstatus auch eine hochdurchsatzfähige Array-basierte Analyse von Gensequenzen (genomweite spezifische Methylierungsanalyse, das sogenannte „Methylom“). Multiparametrische Methylierungsanalytik könnte eine Rolle beim Monitoring von Demethylierungstherapien spielen.

Wie **Michael Hummel** (Institut für Pathologie, Charité, Berlin) berichtete, erfüllt die Erstellung von Genexpressionsprofilen drei Hauptfunktionen: die Identifikation neuer Entitäten, die Vorhersage der Prognose sowie die Planung individualisierter Therapieansätze. Das gilt derzeit insbesondere bei der Diagnose und Therapie von Krebserkrankungen.

Vornehmlich bei der Abschätzung der Prognose kann die Analyse von Genexpressionsmustern von großer Bedeutung sein. So korrelierte der klinische Verlauf des diffusen großzelligen B-Zell-Lymphoms besser mit einer Klassifikation anhand des Genexpressionsmusters als mit Klassifikationen auf histologischer oder immunphänotypischer Basis. Zusätzlich lasse sich die Aussagekraft klassischer Prognosemarker mit Hilfe der Genexpressionsanalytik verbessern. So sei beim B-Zell-Lymphom die Expression des BCL2-Gens bei bestimmten Genexpressionsmustern mit einer schlechten Prognose assoziiert, bei anderen Genexpressionsmustern dagegen nicht.

Hummel deutete auch auf ein interessantes Phänomen in der Genexpressionsanalyse hin. So unterschied sich eine 70-Gen Expressionssignatur, die von der Gruppe um Van't Veer in Utrecht bei Mammakarzinom identifiziert wurde (Weigelt et al. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100: 15901–15905) von der Gensignatur, die andere Autoren bei dieser Erkrankung fanden. Dieses Phänomen ist inzwischen auch bei anderen Malignomen gefunden worden und deutet darauf hin, dass unterschiedliche Gensignaturen identische biologische Entitäten identifizieren können. So wurde bei der **Microarray In Node negative Disease may Avoid ChemoTherapy (MINDACT)**-Studie des Mammakarzinoms gefunden, dass die Genexpression mit der Proteinexpression – die sehr heterogen sein

kann – oft schlecht übereinstimmt. In der anschließenden Diskussion wurde auf die herausragende Bedeutung der verwendeten Methoden bei der Ermittlung des Genexpressionsmusters eingegangen.

Gewebemikroarrays

In der zweiten Sitzung wurden Systematik und technische Aspekte der Gewebemikroarrays (engl. *tissue microarrays*) sowie deren diagnostische Applikationen vorgestellt und diskutiert. **Guido Sauter** (Institut für Pathologie, Universität Hamburg) stellte die von ihm maßgeblich beeinflusste Entwicklung von Gewebemikroarrays und ihrer Systematik vor. Das Qualitätsmanagement für die Beurteilung histochemischer Ergebnisse lässt sich durch Gewebemikroarrays erheblich verbessern. Weiterhin sind solche Arrays zur Überwachung des Abbaus von Immunreaktivität in Gewebeproben geplant. Die Standardisierbarkeit der Gewebemikroarrays führt dazu, dass die Subjektivität bei der Beurteilung verringert wird. Die gleichzeitig hohe Parallelität erleichtert die Evaluation prognostischer Kandidatenmarker. Hinsichtlich des Vergleichs zum klassischen Großschnitt ergibt sich, dass fokale Unterschiede in der Großschnittanalyse häufig überinterpretiert würden. Umgekehrt ist bei den Gewebemikroarrays die Wahl des repräsentativen Ausschnitts von essentieller Bedeutung. Anhand einer internationalen Kooperationsstudie zum Mammakarzinom (Al-Kuraya K et al. *Mod. Pathol.* 2005, 18:891–897) zeigte Sauter, wie Gewebemikroarrays für die systematische Untersuchung von unterschiedlichen Krankheitskohorten eingesetzt werden können.

Arndt Hartmann (Institut für Pathologie, Universität Erlangen) referierte zur Bedeutung von Gewebemikroarrays als diagnostisches Hochdurchsatzverfahren für die Validierung gesamtgenomischer Screening-Untersuchungen und übertrug die von Sauter dargestellten technologischen Hintergründe in konkrete Anwendungen. Er wies auf das Potenzial von Gewebemikroarrays für die Untersuchung der Zellzyklusregulation, sowie von Apoptosemarkern und Signaltransduktion hin. Nicht nur bei der Validation von Genexpressionsstudien, vergleichenden Genomhybridisierungen (engl. *comparative genome hybridisation, CGH*), Einzelnukleotidpolymorphismus (engl. *single nucleotide polymorphism, SNP*)-Studien und proteomischer Analysen, sondern auch bei groß angelegten Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierungen (FISH)-Analysen auf der Ebene der Einzelzelle beziehungsweise des Zellverbundes verfügen Gewebemikroarrays über ein großes Potenzial. Wesentlich sei die simultane Betrachtung von Panels statt von Einzelmarkern. Gewebemikroarrays seien auch bedeutsam für die Untersuchung der Korrelation zwischen dem RNA-Profil und dem immunhistochemischen Phänotyp auf Proteinebene. Hartmann betonte, dass ausreichende klinische Daten zu den Proben auf den Gewebemikroarrays verfügbar sein müssten, um diese richtig auswerten zu können.

Amr Abid (Invitrogen, UK) präsentierte das Konzept der MaxArray Tissue Microarrays (TMA)-Produktlinie. Er bestätigte den steigenden Bedarf nach standardisierten Untersuchungsgeweben auch aus der zunehmenden Zahl von Publikationen in diesem Bereich. Weitere Argumente für den Einsatz von TMA sind ein effizienterer Geräteinsatz, reduzierte Personalkosten, ein geringerer Reagenzienverbrauch, ein bessere Nutzbarkeit seltener Gewebeproben, sowie verbesserte intra- und inter-Assay-Reproduzierbarkeit und Qualitätssicherung. Die Hauptanwendungsgebiete für dieses Produkt sieht Abid in der Charakterisierung von Antikörperbindungseigenschaften, in der Detektion von Stammzellen, sowie allgemein in der Krebsforschung.

Im letzten Vortrag der Sitzung stellte **Karl-Friedrich Becker** (Technische Universität, München) eine eigene patentgeschützte Methode vor, mit der sich eine Proteomanalyse auch an formalinfixierten Geweben durchführen lässt. Das Verfahren liefere vergleichbare Ausbeuten zu klassischen Gefrierschnitten, wenngleich Unterschiede bestehen. Das System wird von Qiagen vertrieben und erlaubt die Herstellung von Protein-Mikroarrays aus fixierten Geweben, die anschließend mit verschiedenen Methoden einschließlich der Massenspektrometrie analysiert werden können. Anwendungen, bei welchen Proteinlysate zwecks semiquantitativer Untersuchung auf Gesamtproteingehalt normalisiert und immobilisiert wurden, werden demonstriert. Die Rolle von Proteinarrays, die aus formalinfixiertem Gewebe hergestellt werden, zur funktionellen Charakterisierung von Geweben im Sinne einer „Systempathologie“ wurde diskutiert.

Vergleichende Genomhybridisierung mittels Mikroarrays (engl. *array-based comparative genome hybridization, array-CGH*)

Im dritten Teil des Symposiums wurden technische Aspekte und klinische Anwendungen der molekularen Karyotypisierung mittels arraybasierter vergleichender Genomhybridisierung referiert und diskutiert.

Eva Klopocki (Institut für Medizinische Genetik, Charité Berlin) gab einen Überblick über das Prinzip der Array-CGH sowie verschiedene Anwendungen in Forschung und Diagnostik. Insbesondere die Diagnostik von Entwicklungsverzögerungen und Syndromen profitiere von der Array-CGH. Das Prinzip beruhe auf der vergleichenden Hybridisierung von Patienten- und Kontroll-DNA auf einem Chip, auf dem genomweit Fangsonden (aus künstlichen bakteriellen Chromosomen (engl. *bacterial artificial chromosome [BAC]*)-Klone oder Oligonukleotiden) festgebunden seien. Durch die unterschiedliche Markierung von Patienten- und Kontroll-DNA könnten Unterschiede im Hybridisierungsverhalten erfasst werden, denen genomische Ungleichgewichte (sogenannte „Imbalancen“) beim Patienten zugrunde lägen.

Die Vorteile der Array-CGH lägen in der genomweiten Analyse auf Deletionen, Duplikationen und Amplifikation

nen in einem Experiment, der Notwendigkeit von nur geringen Mengen genomischer DNA z.B. aus Blut oder Gewebe für die Analyse, der Automatisierbarkeit, sowie der höheren Auflösung gegenüber der herkömmlichen Karyotypisierung und der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)-Diagnostik. Da die Sequenz der BAC-Klone/Oligonukleotide bekannt sei, gäbe es eine Verknüpfung zu Datenbanken (z.B. Ensembl Genome Browser, UCSC (University of California, Santa Cruz), DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources, Sanger Research Centre, Cambridge, UK) mit detaillierten Informationen über die Gene in den aberranten Regionen sowie über Genotyp-Phänotyp Korrelationen. Für den Nachweis von balancierten Translokationen, Polyploidien oder Mosaiken müsse allerdings weiterhin die konventionelle Karyotypisierung angewendet werden. Durch den Einsatz von hochauflösenden Arrays in der Forschung seien in den vergangenen Jahren zahlreiche neue Syndrome beschrieben und bekannte Fehlbildungen aufgeklärt worden.

Im zweiten Übersichtsreferat sprach **Uwe Heinrich** (Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsmedizin Dr. Klein und Dr. Rost, Martinsried) über Qualitätssicherung bei der Routineanwendung der Array-CGH mittels niedrig auflösender BAC-Arrays. Hierbei standen Themen wie Automatisierung, Validierung und Befundinterpretation im Vordergrund. Um die Variabilität der Rohdaten zu minimieren wurde neben der Automatisierung der Hybridisierungsschritte eine Dokumentation der Chargenkontrolle einzelner Komponenten (insbesondere der Cot1-DNA für die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen) gefordert. Für die Validierung kontrollbedürftiger Deletionen wurde der Einsatz der FISH-Technik vorgeschlagen. Duplikationen seien hingegen schwierig mit FISH zu validieren, da Artefakte eine falsche Signalintensität vortäuschen können. Als kostengünstige und effiziente Lösung dieses Problems präsentierte Heinrich ein Konzept zur Kreuzvalidierung mittels einer weiteren, Oligonukleotid-basierten Array-Plattform, die sich in einer Pilotstudie anderen Verfahren gegenüber als überlegen erwies (Heinrich et al., J Lab Med 2008;32:298–307). Die Qualitätssicherung muss im besonderen Maße auch die Befundinterpretation umfassen, d.h. die Ergebnisse müssen einer sorgfältigen Analyse unter Zuhilfenahme der verfügbaren Datenbanken und der klinischen Angaben unterzogen werden. Aus Gründen der unerwünschten Detektion zahlreicher unklassifizierter und daher nicht interpretierbarer Varianten (insbesondere Varianten in der Kopienzahl (engl. *copy number variants*, CNV) sei daher ein primärer, genomweiter Einsatz hochauflösender Arrays derzeit der Forschung vorbehalten und sollte in der Routine nur bei speziellen Indikationen (z.B. unter Verwendung eines genortspezifischen Mikroarrays) und zum Zweck der Validierung eingesetzt werden. Dieser Standpunkt werde auch von den klinischen Genetikern für die Beratungspraxis befürwortet, da unklare Ergebnisse die betroffenen Familien nur verunsicherten.

In der nachfolgenden Diskussion wurde diese Vorgehensweise kontrovers diskutiert, da durch den primären Einsatz hochauflösender Chips auch in der Diagnostik die Forschung positiv beeinflusst wird. **Nick Haan**, (BlueGnome, Cambridge, UK) stellte Daten der ersten 7000 analysierten Fälle von Entwicklungsverzögerung in Großbritannien vor. Die Technologie der BAC-Arrays sei am Genome Center der Universität Cambridge entwickelt worden und habe vor einigen Jahren zur Ausgründung von BlueGnome geführt. Die Technologie sei inzwischen auch in Skandinavien, Deutschland, Frankreich, Italien, den USA, Kanada und Australien verbreitet und in diesen Ländern auch in der Diagnostik im Einsatz. Da die überwiegende Mehrzahl der Veränderungen größer als 1 Mb seien, könnten mit niedrig auflösenden BAC-Arrays mehr als 90% der kausativen Imbalancen detektiert werden. Darüber hinaus enthalte der BlueGnome-Chip zusätzlich Sonden für den Nachweis von 400 bekannten Syndromen, wodurch man im Grunde über ein sehr leistungsfähiges Diagnostik-Produkt verfüge. Für die FISH-Bestätigung von Deletionen stehen 26.000 BAC-Klone zur Verfügung. Die Qualität der Arrays werde durch automatisierte Herstellung und zahlreiche interne Kontrollen gewährleistet. Inzwischen gebe es Entwicklungsprojekte für weitere Anwendungen, z.B. im Bereich der Pränataldiagnostik, der Aneuploidie-Diagnostik, im Rahmen einer künstlichen Befruchtung oder der Leukämie-Diagnostik. Das Unternehmen arbeite auch an der Entwicklung hochauflösender Oligonukleotid-Arrays für die Forschung.

Im letzten Vortrag dieser Sitzung stellte **Jörg Kleiber** (Roche Diagnostics, Penzberg) den AmpliChip[®] vor, einem FDA-zertifizierten Produkt für den Nachweis der wichtigsten, pharmakogenetisch relevanten Allele des CYP2D6- und CYP2C9-Cytochrom-Gens auf der Basis der Affymetrix[®]-Technologie. Obwohl der AmpliChip schon seit einigen Jahren verfügbar sei, habe sich das Produkt auf dem Markt noch nicht durchsetzen können. Dies mag einerseits an der ungeklärten Frage der Abrechnung liegen, zum anderen an der mangelnden Akzeptanz seitens der behandelnden Ärzte, obwohl der Kosten-Nutzen-Effekt einer vorgeschalteten pharmakogenetischen Diagnostik für bestimmte Medikamente bereits nachgewiesen sei.

Epigenetik

Die Epigenetik beschäftigt sich mit der Weitergabe von Eigenschaften auf die Nachkommen, die nicht auf Abweichungen in der DNA-Sequenz zurückgehen, sondern auf eine vererbte Änderung der Genregulation und/oder der Genexpression.

Im ersten Vortrag wurde von **Gernot Längst** (Institut für Biochemie III, Universität Regensburg) die molekularen Grundlagen epigenetischer Regulation beschrieben. Längst erläuterte ein breites Spektrum biochemischer und molekulargenetischer Methoden zur Untersuchung von DNA-Protein-Wechselwirkungen wie beispielsweise

das nukleosomale Schiebe-Assay (engl. *nucleosome sliding assay*). Er berichtete über neue Erkenntnisse zur Verpackung genomischer DNA in Nukleosomen und damit zur epigenetischen Kontrolle der DNA in Form von Chromatin. Die negativ geladene chromosomale DNA ist um kleine positiv geladene Histon-Proteine (Histon-Oktamere) gewickelt und bildet eine perketten-ähnliche Struktur. Einzelne Nukleosomen werden durch Linker-Histone verknüpft. Die exakte Position der Nukleosomen legt fest, welche DNA-Abschnitte für die Genexpression und epigenetische Regulation zugänglich sind.

Längst präsentierte einen Mechanismus, in dem „Chromatin-Remodeling Komplexe“ die DNA Sequenz über strukturelle Eigenschaften der DNA auslesen, um gezielt Nukleosomen zu positionieren. Molekulare Maschinen können durch energieabhängige Mechanismen die Nukleosomen gezielt von der DNA entfernen oder verschieben. Es scheint einen Code zu geben, der die DNA-Sequenz mit der relativen Position der Nukleosomen verbindet. Eukaryote Zellen besitzen eine Vielzahl von Chromatin-Remodeling Komplexen und die jeweils in Zellen und Geweben vorhandenen Maschinen bestimmen die Position der Verpackungsproteine und damit den Zugang von regulatorischen Proteinen (z.B. Transkriptionsfaktoren) oder DNA-Modifikationsenzymen (z.B. DNA-Methylierung) zu Abschnitten der DNA. Neben dem Vorhandensein von zelltypspezifischen Transkriptionsfaktoren sind zelltypspezifische Chromatin-Remodeling-Proteine wichtige Vermittler der kontrollierten Genexpression. Chromatin-Remodeling-Enzyme sind für DNA-abhängige Prozesse essentiell und Mutationen dieser Maschinen sind häufig mit der Entartung von Zellen assoziiert.

Im zweiten Vortrag in diesem Abschnitt berichtete **Michael Rehli** (Abteilung für Hämatologie/Onkologie, Klinikum der Universität Regensburg) über das genomweite Profiling der CpG-Methylierung bei der Leukämie.

Rehli erklärte den Zusammenhang der Methylierung von CpG-Inseln mit dem Abschalten von Tumorsuppressorgenen bei der Entstehung von Krebs. Seine Arbeitsgruppe hat eine neue Technik zur Detektion von CpG-methylierter DNA entwickelt, die auf der hoch affinen Präzipitation methylierter DNA mittels eines rekombinanten Methylbindungsproteins (MB) beruht und dadurch eine Methyl-CpG-Immunpräzipitation erlaubt. MB-PCR Analysen erfordern weder Bisulfitbehandlung noch den Einsatz von methylierungssensitiven Restriktionsenzymen. Aufgrund der einfachen Anwendung und hohen Sensitivität eignet sich diese Methode besonders zur Untersuchung limitierter Probenmengen z.B. von Tumorproben. Rehli zeigte Daten zur aberranten Hypermethylierung des Transkriptionsfaktors ICSBP (*interferon consensus binding protein*) bei akuter myeloischer Leukämie (AML). In einer genomweiten Analyse von CpG-Inseln mittels MB-Microarray konnte die Arbeitsgruppe mehr als 100 Gene mit verändertem Methylierungsstatus in myeloischen Zelllinien und Myeloblasten von AML-Patienten detektieren. Interessanterweise besteht keine

große Überlappung mit veränderten Genexpressionsprofilen dieser Zellen. Man kann deshalb davon ausgehen, dass Hypermethylierungsmechanismen bei Malignomen größtenteils unabhängig vom transkriptionellen Status der jeweiligen Gene sind. Diese Methylierungsstudien könnten deshalb neue diagnostische Marker für die Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen darstellen.

Im letzten Vortrag stellte **Philipp Schatz** die Epigenomics AG als ein Molekular diagnostik-Unternehmen mit einem Schwerpunkt auf der Entwicklung von Produkten für die Krebsdiagnostik vor. Basierend auf Unterschieden in der DNA-Methylierung entwickelt Epigenomics Tests zur Früherkennung von Krebs. Die Entwicklungspipeline umfasst unter anderen den klinisch validierten Biomarker Septin-9 für die Früherkennung von Darmkrebs in Blutplasma. Septin-9 wurde in einer Fall-Kontroll-Studie in Blutproben von 97 Patienten mit Darmkrebs und 172 Probanden ohne Darmkrebsbefund untersucht. Die Befunde wurden endoskopisch bestätigt. Durch das Testverfahren konnte bei 72 der 97 Krebspatienten Darmkrebs nachgewiesen werden (74% Sensitivität), bei 14 von 172 Probanden wurde ein falsch-positiver Wert angezeigt (92% Spezifität). Die detaillierten Ergebnisse dieser Studie wurden von Lofton-Day publiziert (Clin Chem 2008; 54:414–23). Schatz erläuterte weiterhin das Prinzip von Realtime-PCR DNA-Methylierungs-Biomarker Kits, die auf der proprietären HeavyMethyl(R) (HM)-Technology beruhen und zusammen mit dem Unternehmen TIB MOLBIOL für Forschungszwecke angeboten werden. Epigenomics besitzt weitere patentgeschützte DNA-Methylierungs-Biomarker in verschiedenen Entwicklungsstadien für die Früherkennung von Prostata- und Lungenkarzinom in Urin- bzw. Blutproben. Anschließend an diesen Vortrag wurde die Wertigkeit von Markern zur Früherkennung von Tumoren kontrovers diskutiert. Insbesondere wurde darauf hingewiesen, dass bei Reihenuntersuchungen nicht die Sensitivität oder Spezifität, sondern die positive und negative Vorhersagekraft entscheidend seien. Diese hänge jedoch von der Prävalenz der Erkrankung im untersuchten Kollektiv ab. So seien Sensitivitäten von 74% und Spezifitäten von 92% beispielsweise beim Kolonkarzinom mit einer Prävalenz von ca. 0,4% in der Gesamtbevölkerung nicht ausreichend. Bei einer Untersuchung von 1000 zufällig ausgesuchten Personen wären drei richtig positive, ein falsch negativer, aber 80 falsch positive Befunde zu erwarten. Das heißt, nur etwa ein dreißigstel aller positiven Befunde würden stimmen. Wie Schatz bemerkte, trifft dieses Problem jedoch nicht nur für den Epigenomics-Test zu, sondern auch für andere derzeit verwendete Screening-Methoden wie der Nachweis okkulten Bluts im Stuhl.

Zum Schluss zog **Paul Cullen** (Vorsitz der AG Chipdiagnostik) das Fazit, dass bei der hochparallelen Analytik die technischen Möglichkeiten der klinischen Anwendung voraus seien. So existiere ein großer Bedarf an begleitender klinischer Forschung, um die Anwendbar-

keit und die Bedeutung dieser Diagnostik zu präzisieren. Weiterhin existiere ein erheblicher Bedarf bei der Standardisierung und der Qualitätskontrolle, ehe viele dieser Methoden in der breiten Labordiagnostik Eingang finden. Um dieser Tatsache Rechnung zu tragen, haben die Arbeitsgruppen Chipdiagnostik und Bioinformatik entschieden, ihre gemeinsame Jahrestagung im Jahr 2009 der Bedeutung der hochparallelen Analytik im klinischen Alltag zu widmen. Ein weiteres Thema der Jahrestagung 2009 wird die Gesamtgenomanalyse (*whole genome analysis*) sein.

Danksagung

Diese Jahrestagung wird nur durch die großzügige finanzielle Unterstützung industrieller Sponsoren ermöglicht.

Folgenden Unternehmen sind wir deshalb zu großem Dank verpflichtet: Affymetrix Ltd., Agilent Technologies GmbH, BlueGnome Ltd., Illumina Ltd., ImaGenes GmbH, IMGGM Laboratories GmbH, Implen GmbH, Invitrogen Ltd., Roche Diagnostics GmbH, Hoffmann La Roche AG, Tecan Deutschland GmbH.

Hinweis

Die 8. Tagung der Arbeitsgruppen Chipdiagnostik und Bioinformatik findet 2009 am 14./15. Mai in der evangelischen Akademie in Tutzing statt. Das aktuelle Programm können Sie unter anja.weber@medizinische-genetik.de anfordern.