



## „Gendiagnostik - ein unverzichtbarer Bestandteil moderner Labordiagnostik“

– Symposium der BNLD im Rahmen der Analytica Conference, München 2002

Auf der Analytica 2002 fand am 24. April 2002 ein von der BNLD organisiertes Fachsymposium mit dem Thema: „Gendiagnostik- ein unverzichtbarer Bestandteil moderner Labordiagnostik“ unter der Moderation von PD Dr. Burkhard Brandt und PD Dr. Norbert Gässler statt.

Das Symposium teilte sich in zwei Schwerpunkte. Der erste Teil unter dem Titel „**Rationale Molekulare Diagnostik im klinischen Laboratorium**“ wurde von Vortragenden aus klinischen Laboratorien bestritten. In den Vorträgen standen die Empfehlungen zum klinischen Einsatz der neuen Diagnostik im Vordergrund. Im zweiten Teil unter dem Titel „**Genanalysen – aktuelle Methoden im Überblick**“ wurden von Wissenschaftlern aus der Industrie die aktuellsten Technologien für die Genanalyse und ihre Anwendung vorgestellt.

Die Veranstaltung trug der Tatsache Rechnung, dass die Molekulare Diagnostik dem Labor und damit auch dem Kliniker eine Vielzahl von neuen Verfahren zur Verfügung stellt. Die Weiterbildung muss deshalb die praktisch Tätigen in die Lage versetzen, die neue Diagnostik einzusetzen. Andererseits müssen noch umfangreiche Studien durchgeführt werden, welche die klinische Wertigkeit der genannten Verfahren absichern, damit klare Empfehlungen für den Umgang mit ihnen gegeben werden können. Die Vorträge des Symposiums haben deshalb auch verdeutlicht, bei welchen Parametern noch ein besonders großer Bedarf an weiteren Studien besteht. Insbesondere gilt dies für die therapeutischen Konsequenzen bei Vorliegen einer genetischen Prädisposition. Aber auch an der Therapieindikation und -prädiktion mittels molekularer Parameter muss noch weiter gearbeitet werden.

Herr Gässler, Hildesheim, der 1. Vorsitzende der Berufsvereinigung der Naturwissenschaftler in der Labordiagnostik (BNLD), begrüßte die Teilnehmer und Referenten zur dritten Weiterbildungsveranstaltung anlässlich der Analytica und stellte die BNLD kurz vor.

Im ersten Teil des Symposiums referierte **Frau Prof. Dr. Ch. Mannhalter (Wien, Austria)** über die „**Rationale molekulare Diagnostik im klinisch-hämostaseologischen Laboratorium**“.

*Sie führte aus, dass in den letzten zwanzig Jahren zahlreiche Gene des Hämostasesystems identifiziert und verschiedene Mutationen in diesen Genen mit Störungen der Hämostase in Zusammenhang gebracht wurden. Man fand heraus, dass die G1691A-*

*Mutation im Faktor V-Gen (Faktor V-Leiden) und die G20210A-Mutation im Prothrombin-Gen das Risiko für venöse Thrombose erhöhen, und dass für Menschen mit beiden Mutationen die Gefahr, schon in jungen Jahren eine Thrombose zu erleiden, hoch ist. Man konnte unterschiedliche Punktmutationen sowie kleine und größere Deletionen im Protein C- und Protein S-Gen identifizieren und den Mutationsnachweis zur Verbesserung der Diagnostik bei bekanntem familiären Protein C- bzw. S-Mangel einsetzen. Und man hat zwei häufige genetische Defekte (Inversionen) im Faktor VIII-Gen als Ursachen der schweren Hämophilie A identifiziert und diese erfolgreich zur Diagnostik bei Überträgerinnen herangezogen. Doch trotz der nachgewiesenen Bedeutung der genannten Mutationen sind die Einsatzmöglichkeiten der Mutationsdiagnostik im klinischen Alltag eines Gerinnungslabors noch begrenzt. Große Studien haben gezeigt, dass eine Mutation nicht bei jedem Menschen die gleiche Auswirkung hat, da endogene und exogene modulierende Faktoren den Phänotyp beeinflussen. Da noch sehr wenig über modulierende Faktoren bekannt ist, ist es häufig schwierig, die Auswirkungen einer Mutation in ihrer ganzen Tragweite zu bewerten. Es ist daher von ausserordentlicher Wichtigkeit, die Forschung voranzutreiben, um Gen-Gen- und Gen-Umwelt-Interaktionen zu verstehen, damit in Zukunft eine zuverlässige Interpretation der Ergebnisse von Mutationsuntersuchungen möglich sein wird.*

**„Die molekulare Diagnostik von Fettstoffwechselstörungen“** wurde von **Herrn Dr. S. Gehrisch (Dresden)** vorgestellt.

*Im Fokus dieses Vortrages der molekularen Diagnostik des Fettstoffwechsels stand die Suche und Analytik von Mutationen oder Polymorphismen in Genen des Lipoproteinmetabolismus, die für ein erhöhtes prämaures Arteriosklerosisiko verantwortlich gemacht werden können. Angeborene Störungen des Fettstoffwechsels dagegen sind sehr selten und haben praktisch kaum Bedeutung.*

*Die Mutationssuche im LDL-Rezeptor-Gen und dem Apo B-100 Gen, dem Liganden dieses Rezeptors in den Lipoproteinen, wurde und wird aufgrund des hohen Arteriosklerosisikos einer Hypercholesterolämie in vielen Ländern sehr intensiv betrieben. Die Aufklärung der molekularen Ursachen der im mittleren und höherem Lebensalter häufigen Dyslipidämien (Hypertriglyzeridämie mit oder ohne Hypercholesterolämie) in den daran beteiligten Genen wie z.B. der Lipoproteinlipase, der hepatischen Triglyzeridlipase, dem Apo E u.a. erfolgte bisher in einem viel geringeren Umfang. Gleiches gilt auch für die Gene, die mit einem verminderten HDL-Cholesterol assoziiert sind. Für die Mutationssuche in den Genen des Fettstoffwechsels werden neben der Sequenzierung - als dem Goldstandard der Mutationsanalytik - insbesondere die Methode des „Single Strand Conformational Polymorphism“ (SSCP), die Dichtegradientengelelektrophorese (DGGE) und in geringerem Umfang die Temperaturgradientengelelektrophorese (TGGE) als Screeningmethoden eingesetzt. Die chemische und die enzymatische Mismatch Cleavage-Methode erlangten keine große*

Verbreitung. Die DHPL (Denaturing-HPLC) erlaubt durch die Kombination von optimierter Temperatur (nach dem Aufschmelzen), denaturierenden Gradienten und HPLC eine rationale, schnelle und sensitive Mutationssuche, die auch für größere Probenumfänge gut geeignet zu sein scheint. Die rationale molekulare Diagnostik von Mutationen in den Genen des Fettstoffwechsels, die relevant für die Hyperlipidämien sind und gehäuft bei Patienten gefunden werden, erfolgt mit gut etablierten PCR-basierenden Methoden (Restriktions-Fragmentlängen-Polymorphismus (RFLP), allelspezifische PCR, u.v.a.). Eine multiplexe Analytik von 23 LDL-Rezeptormutationen und einer Apo B-100-Mutation mittels eines kommerziellen Oligo-Ligation-Assay-(OLA)-Kits war sehr praktikabel und vielversprechend, kann jedoch nicht mehr bezogen werden. Aus Sicht des Autors muss kritisch eingeschätzt werden, dass die zur Zeit verfügbare molekulare Analytik des Fettstoffwechsels noch in viel zu geringem Maße zur Aufklärung der Ursachen der Hyperlipidämie beiträgt und deshalb nicht für eine individualisierte, patientenbezogene Therapie herangezogen werden kann.

**Herrn PD Dr. B. Brandt (Münster)** gab einen kurzen „**Einblick in die Mutagenese von Tumoren**“

Er berichtete, dass die molekulare Diagnostik von Tumoren davon ausgeht, dass maligne Tumoren eine genetische Evolution, auch Mutagenese genannt, durchlaufen. Die Mutationen, die zur Entstehung und Ausbreitung eines malignen Tumors führen, müssen dabei in Genen auftreten, die das Wachstum, die Differenzierung und den Tod der Zellen in den Geweben des menschlichen Körpers maßgeblich bestimmen. Man unterscheidet prinzipiell dabei drei Gruppen von Genen: a) die dominanten Onkogene, bei denen eine Mutation zu ihrer Aktivierung führt und die den Zellen ein positives Wachstumssignal geben; b) die rezessiven Tumorsuppressorgene, bei denen die Mutation zu einem Wegfall eines Wachstumsstopp-Signals führt und c) die dritte Gruppe der Mutatorgene, die sich genetisch rezessiv wie die Suppressorgene verhalten. Hier führt die Mutation zu einem Funktionsverlust eines Proteins, das die Integrität der genomischen DNA nach der Replikation sicherstellt. Sensitive analytische Verfahren stellen die Grundlage für die Bestimmung von Parametern auf der Genom- (DNA) und Transkriptomebene (mRNA) für die klinische molekulare Diagnostik dar. Man muss sie in Parameter für die Prädispositionsdiagnostik und für Prognoseabschätzung und Therapieplanung unterscheiden (Keimbahnmutationen und somatische Mutationen). Für den klinischen Einsatz der Parameter muss weiter nach ihrem Stellenwert für Diagnosesicherung, Differentialdiagnose, Prognose und Therapie unterteilt werden, um dem behandelnden Arzt ihre Gewichtung in der Entscheidung über Beratung und Behandlung des Patienten zu ermöglichen. Die Anwendung der Parameter unter strenger Indikationsstellung stellt allerdings eine erhebliche Verbesserung der Krankenversorgung dar. Allein die Tatsache, dass einer Vielzahl von Familienangehörigen von Patienten mit erblichen Malignomen wiederkehrende, invasive diagnostische Verfahren erspart

*bleiben und auf der anderen Seite Gendefekträgern durch engmaschige Kontrollen sogar das Malignom gänzlich erspart bleiben kann, ist eine solche Verbesserung.*

Den letzten Vortrag im ersten Teil des Symposiums hielt **Herr Dr. K. Korn (Erlangen)**. Er referierte über die „**Virologische Diagnostik am Beispiel von HIV mittels Molekularbiologischer Methoden**“.

*Seinen Aussagen zur Folge haben molekularbiologische Methoden in der Virologie seit vielen Jahren einen hohen Stellenwert. Schon bald nach der Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde diese für eine große Zahl virologischer Fragestellungen eingesetzt. Zunächst stand hierbei der rein qualitative, hochempfindliche Nachweis viraler Nukleinsäure im Vordergrund, der beispielweise die Diagnostik bei viralen Meningitiden und Enzephalitiden enorm verbessert hat. Mittlerweile ist für viele Fragestellungen in der Virologie aber auch die Quantifizierung viraler Nukleinsäuren unerlässlich geworden, insbesondere im Rahmen des Monitorings bei antiviraler Therapie. Schließlich erlangt auch die weitere Charakterisierung amplifizierter Nukleinsäure-Fragmente zunehmend Bedeutung, etwa in der Differenzierung der verschiedenen Genotypen des Hepatitis C-Virus. Am Beispiel von HIV lassen sich die Vorteile, aber auch viele der Probleme molekularbiologischer Diagnostik in der Virologie gut illustrieren. So ist eine effiziente Behandlung HIV-infizierter Patienten ohne den quantitativen HIV-RNA-Nachweis im Plasma als Prognose- und Verlaufsmarker heute nicht mehr vorstellbar. Als weiteres Element ist die Virustatika-Resistenztestung zu nennen, die sich ebenfalls molekularbiologischer Methoden bedient und insbesondere bei Patienten mit Therapieversagen zur Optimierung der weiteren Behandlung eine Rolle spielt. Dagegen ist im Blutspendebereich die Frage des Nutzens einer zusätzlichen molekularen Testung auf HIV weiterhin Gegenstand kontroverser Diskussionen.*

Nach einer Kaffeepause folgte im zweiten Teil des Symposiums ein Überblick über aktuelle molekularbiologische Methoden. **Herr Dr. G. Selders** von der **Fa. Applied Biosystems (Weiterstadt)** stellte die **DNA-Kapillarelektrophorese** vor, um **Genanalysen im Routinebetrieb** durchzuführen.

*Er führte in die genetische Analyse unter dem routinemäßigen Einsatz der Kapillarelektrophorese für die Sequenzierung und Fragmentanalyse im Labor ein. Es wurden sowohl aktuelle Entwicklungen zur HIV-Subtypisierung durch Sequenzierung und Einsatz moderner Software als auch neue Methoden zur Analyse von Punktmutationen vorgestellt. Des Weiteren stellte er ein neues Mitglied in der ABI Prism Genetic Analyzer-Familie vor, den ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer mit 4 Kapillaren..*

Im Anschluss daran wurden von **Herrn Th. Schild, Applied Biosystems (Weiterstadt)** **Methodische Entwicklungen zur „Real-Time“ - PCR** vorgestellt.

*In den vergangenen Jahren hat sich nach seiner Ansicht die Real-Time PCR zu einer akzeptierten Methode nicht nur in der pharmazeutischen Forschung, sondern insbesondere auch in der Molekularen Medizin weiterentwickelt. Vor allem bei quantitativen Analysen ersetzt sie in zunehmenden Umfang konventionelle immunologische- sowie Blotting-Techniken. Typische Anwendungsbeispiele sind Erforschung und Therapie der sog. „minimal residual diseases“ (MRD), Bestimmung der Genkopienzahl sowie die quantitative Analyse von Humanpathogenen. Ein weiteres Anwendungsgebiet von wachsendem Interesse ist der Nachweis von krankheits- bzw. therapie relevanten Punktmutationen (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs). Insbesondere nach der vollständigen Sequenzierung des humanen Genoms ergeben sich hier völlig neue Aussichten und Möglichkeiten.*

Abschließend stellte **Herr R. Vogelsang** das Portfolio der **Fa. Applied Biosystems (Weierstadt)** umfassend vor.

*Das Ziel der im Jahre 2001 ins Leben gerufenen Genom Initiative der Applera Corporation ist nach seinem Bericht, dem Anwender Testverfahren im Bereich Genotyping wie auch Genexpression zur Verfügung zu stellen. Diese Testverfahren haben einen aufwendigen Validierungsprozess durchlaufen, welcher zum einen die Funktionalität der Testverfahren gewährleistet, und zum anderen zusätzliche Informationen wie Allel-Frequenz oder Splice-Varianten berücksichtigt. Die Identifikation von Mutationen, SNPs, wird durch Resequenzierung von 40-50 Individuen verschiedener ethnischer Zugehörigkeit bei Celera Genomics ermöglicht. Ziel in diesem Schritt ist es, 300.000 SNPs zu identifizieren, die mit einer entsprechenden Allel-Frequenz in den verschiedenen ethnischen Gruppen vorhanden sind. Die Anwendung einer neuen Minor Groove Binder (MGB) -Sondentechnologie zusammen mit dem Universellen PCR-Protokoll wird es in Zukunft ermöglichen, TaqMan Assays für ca. 30.000 humane Gene und mehr als 300.000 verschiedene SNPs herzustellen. Verschiedene Genexpressionsassays oder SNPs können nun im PCR-Array-Format (96 oder 384 Tests) in einem PCR-Lauf analysiert werden.*

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass wir uns in einer Zeit immer schnellerer Entwicklungen befinden, so dass weitere Verbesserungen insbesondere durch den Einsatz von sogenannten „Single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) und der Genchip-Technologie bald zu erwarten sind. Es gilt nun, mit „harten“ Daten der Molekularen Diagnostik gegenüber ihren Skeptikern größere Überzeugungskraft zu verleihen und die Akzeptanz zu erhöhen. Nichtsdestotrotz sind die auf diesem Symposium genannten Verfahren unter strenger Indikationsstellung einsetzbar und können schon jetzt eine Verbesserung in der Krankenversorgung darstellen.

Aus der Sicht der Veranstalter kann man sagen, dass das interessante Symposium mit den hochqualifizierten Beiträgen der Referenten als ein Highlight der Analytika-Konferenz bezeichnet werden darf. Die Resonanz seitens der Analytika-Teilnehmer war so groß, dass teilweise die Kapazität des Vortragsraumes (120 Sitzplätze) nicht ausreichte.

Für die Veranstalter

PD Dr. Norbert Gässler

PD Dr. Burkhard Brandt