



## Kom.-Drs. 15/246

Dr. Reinhard Ullmann  
Molecular Cytogenetics Group  
Dept. Human Molecular Genetics  
Innestrasse 73, 14195 Berlin  
Tel.: + 49 - 30 - 84 13 1251  
Fax: + 49 - 30 - 84 13 1383  
Ullmann@molgen.mpg.de

Deutscher Bundestag  
Enquete-Kommission  
„Ethik und Recht der modernen Medizin“  
Platz der Republik 1  
11011 Berlin

### Stellungnahme zum Fragenkatalog

Sehr geehrte Damen und Herren,

anbei finden Sie meine Antworten auf die unter „DNA Chips“ gelisteten Fragen. Entsprechend den Anforderungen in der Pränataldiagnostik wird nur auf DNA Chips zur Untersuchung von DNA Veränderungen eingegangen.

Mit freundlichen Grüßen

Reinhard Ullmann

Berlin, 13.05.2005

## 2.30 Wie ist heute der Entwicklungsstand des DNA-Chips?

Eine kurze Einführung in das Prinzip der DNA Chips

Die DNA ist ein doppelsträngiges Molekül, welches über Bindungen zwischen den einzelnen Bausteinen (Basen) zusammengehalten wird. Die Basenbindungen der gegenüberliegenden Stränge sind spezifisch, so kann nur ein G (Guanin) mit einem C (Cytosin) und ein A (Adenin) mit einem T (Thymin) eine Bindung eingehen. Passende Stränge werden als komplementär bezeichnet.

Durch Wärmezufuhr kann man die Doppelstränge in zwei Einzelstränge trennen, die anschließend versuchen, entsprechend ihrer Basenabfolge, wieder zum Doppelstrang zusammenzufinden. Dieses Prinzip macht man sich bei allen Formen der DNA Hybridisierung zunutze.

Zuerst generiert man eine Sonde, das ist ein DNA Stück jenes Genortes, den man überprüfen will. Sonden DNA und die zu testende Patienten DNA werden zusammengebracht und durch Wärmezufuhr Einzelstränge generiert. Anschließend werden sich die Einzelstränge, ohne Rücksicht auf deren Ursprung (Sonde oder Patienten DNA), wieder zu Doppelsträngen vereinigen. An jenen Stellen, wo die Basenabfolge der Sonde zur Patienten DNA komplementär ist, können auch Doppelstränge entstehen, bei denen ein DNA Strang von der Patienten DNA und einer von der Probe stammt (Hybrid? Hybridisieren). Markiert man die Sonde vorab mit einem Fluoreszenzfarbstoff, kann diese Bindung sichtbar gemacht werden.

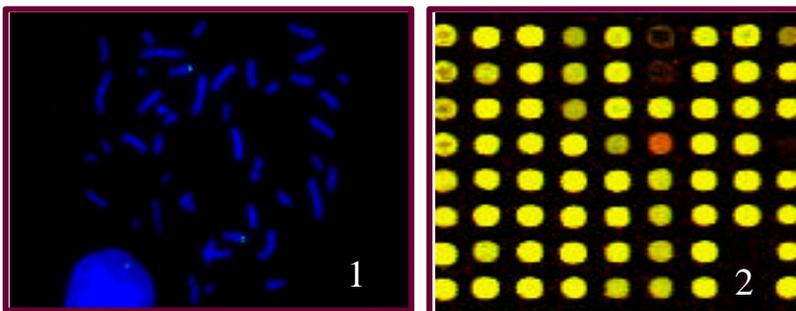


Bild 1: Eine Sonde für Chromosom 8 (grün) erkennt die zwei homologen Chromosomen (blau) eines gesunden Mannes. Bild 2: Ausschnitt einer DNA Chip Untersuchung eines Patienten mit geistiger Behinderung. Gelb signalisiert normale DNA Kopienzahl für den durch die jeweilige Sonde repräsentierten Genort. Die rote Farbe zeigt einen DNA Verlust an.

Im Bild 1 sehen Sie eine praktische Anwendung. Eine Sonde für eine bestimmte Region auf Chromosom 8 (grün markiert) wird auf Chromosomen eines gesunden Spenders hybridisiert. Das grüne Signal entsteht dort, wo die Basenabfolge der Sonde zur Basenabfolge am Genort komplementär ist.

Gibt es Unterschiede in der DNA Kopienzahl, z.B. fehlt ein durch die Sonde erkannter Genort im zu untersuchenden Patienten, würde dies durch die veränderte Anzahl von grünen Signalen erkannt werden. Eine Sonde für Chromosom 21 würde z.B. in einem Patienten mit Down Syndrom (Trisomie 21) Signale auf drei Chromosomen geben. Dieser Test wird in der Pränataldiagnostik häufig angewandt.

DNA Chips basieren auf der Umkehrung dieses Prinzips. Die Sonden-DNA wird auf Glasobjektträger (oder ähnlichem Trägermaterial) aufgebracht und die fluoreszenz-markierte Patienten-DNA darauf hybridisiert (Bild 2).

Die Anzahl der Sonden, die gleichzeitig untersucht werden können, hängt somit nur noch von den technischen Rahmenbedingungen ab, d.h. wieviel unabhängige Sonden-DNAs auf den Objektträger aufgebracht werden können.

Der am MPI für Molekulare Genetik verwendete DNA-Chip zur Erkennung von chromosomalen Gewinnen oder Verlusten umfasst mehr als 36000 Sonden-DNAs. Damit ist das humane Genom vollständig und überlappend abgedeckt. Änderungen in der DNA-Kopienzahl (Verluste oder Gewinne) können festgestellt werden, sobald sie größer als 100000 Basen sind. Zum Vergleich, Chromosom 21 ist ca. 47 Millionen und Chromosom 1 ca. 245 Millionen Basen groß. Die klassische Chromosomenanalyse hat im klinischen Routinebetrieb ein Auflösungsvermögen von 8-10 Millionen Basen.

### Verschiedene Arten von DNA Chips:

a) Chips zur Feststellung von chromosomalen Gewinnen und Verlusten: Aufgrund der Herstellungsart können diese Chips grob in zwei Gruppen eingeteilt werden. DNA-Chips, bei denen DNA aufgebracht ist, die aus rekombinanten Bakterienklonen mit menschlichen DNA-Stücken gewonnen wird (z.B. Bacterial Artificial Chromosome (BAC) Klone) und Oligoarrays, bei denen, in der Regel 20-80 Basen lange und chemisch hergestellte DNA-Stücke aufgebracht werden. Die derzeit am weitesten verbreitete Plattform sind DNA-Chips mit BAC-Klon-DNA. Die diagnostische Sicherheit der BAC-Arrays ist im Vergleich zu Oligoarrays derzeit noch weit höher. Durch technische Fortschritte (z.B. weitere Erhöhung der Dichte von DNA-Sonden) und die enorme Flexibilität beim Chip-Design wird die Bedeutung von Oligoarrays in Zukunft aber stark zunehmen.

b) SNP Array: Single Nucleotide Polymorphisms sind genetische Variationen in der Bevölkerung, die durch den Austausch einzelner Basen im Laufe der Evolution entstanden sind. SNPs können mit bestimmten Veranlagungen assoziiert sein, oder diese sogar verursachen. Bedeutsam sind solche Polymorphismen zum Beispiel, wenn es darum geht herauszufinden, ob eine bestimmte Person auf ein Medikament anspricht, oder ob etwa Nebenwirkungen zu erwarten sind. SNP Chips können solche genetischen Polymorphismen erkennen. Für einige SNPs ist eine Assoziation mit einem gewissen biologischen Verhalten schon bekannt. Erst kürzlich hat die Firma Affymetrix im Verbund mit Roche Diagnostics die EU Zertifizierung eines SNP Chips für den Nachweis von Varianten innerhalb der Genfamilie CYP450 erreicht. Polymorphismen in dieser Genfamilie sind für die personenabhängige, unterschiedliche Wirkung von Medikamenten für Schizophrenie, Depression, Herz-Kreislaufkrankungen, etc. verantwortlich ( [http://www.corporate-ir.net/ireye/ir\\_site.zhtml?ticker=AFFX&script=410&layout=-6&item\\_id=608583](http://www.corporate-ir.net/ireye/ir_site.zhtml?ticker=AFFX&script=410&layout=-6&item_id=608583) , [http://www.roche-diagnostics.com/products\\_services/amplichip\\_cyp450.html](http://www.roche-diagnostics.com/products_services/amplichip_cyp450.html) )

c) Resequenzierungs-Chips: Mittels Resequenzierungs-Chips kann das Vorhandensein von Mutationen in verschiedenen Genen nachgewiesen werden. Viele Forschungslabors nutzen solche Chips zum Nachweis von bekannten, aber auch neuen, unbekanntem Mutationen in verschiedenen Genen. In einer Hybridisierung können ca. 30000 Basen sequenziert werden.

### **2.31. Auf wieviele genetische Veranlagungen, die sonst jeweils einen eigenen Durchgang erfordern würden, kann eine Gen-Probe mit Hilfe des DNA-Chips in einem einzigen Durchgang untersucht werden?**

Hier ist die Entwicklung extrem dynamisch. Vor wenigen Jahren konnten z.B. SNP Chips nur 10000 SNPs erkennen. In Kürze wird von der selben Firma ein 500000 SNP Chip erwartet. Das entspricht einer 50fachen Erhöhung der DNA Sondendichte.

Ähnlich ist die Situation bei den BAC Arrays zur Detektion von chromosomalen Gewinnen und Verlusten. Waren in den Forschungslabors voriges Jahr 3000 DNA Sonden der Technik, so gibt es mittlerweile, wie hier am MPI für Molekulare Genetik, Chips mit über 36000 Sonden. Die Entwicklung bei den Oligoarrays ist derzeit noch schwierig abzuschätzen, aber wahrscheinlich vergleichbar mit der von SNP Chips.

Zur Erhöhung der diagnostischen Sicherheit wird es angebracht sein, dieselbe Veränderung über mehrere unabhängige DNA Sonden nachzuweisen. Aufgrund der bereits jetzt möglichen

DNA Sonden auf einem Chip liegt die Zahl der gleichzeitig überprüfbaren Veränderungen im Bereich von mehreren Tausend.

### **2.32 Was sind die besonderen Vorteile des DNA Chips gegenüber herkömmlichen Verfahren genetischer Analyse?**

Im Vergleich zur klassischen Chromosomenanalyse bieten DNA Arrays folgende Vorteile:

- a) Zeit: Alle angesprochenen Untersuchungsmethoden basierend auf DNA Chips benötigen keine Zellkultur und Chromosomenpräparation. Dadurch kommt es zu einer Zeitersparnis von 1-5 Tagen.
- b) Geringes Ausgangsmaterial: Die meisten dieser Untersuchungen können schon mit wenigen Zellen durchgeführt werden.
- c) Sehr viele Genorte gleichzeitig untersuchbar
- d) Auflösungsvermögen: bereits sehr kleine Veränderungen können erkannt werden. Das ist u.a. bedeutsam bei der Charakterisierung sogenannter Mikrodeletionssyndrome, die mit klassischer Chromosomenanalyse nicht möglich ist.
- e) Objektivierbarkeit: Die Qualität der Analyse ist nicht mehr abhängig vom Ausbildungsstand der Person, die die Untersuchung durchführt.

Nachteile:

- a) Geräteanschaffungskosten
- b) Chromosomale Veränderungen, bei denen es zu keinem Verlust oder Gewinn von DNA kommt (balanzierte Translokationen, Inversionen), können nur nach Anwendung aufwendiger Zusatzmethoden untersucht werden. Zum derzeitigen Stand der Technik ist das in der klinischen Routine nicht vorstellbar. Balanzierte Veränderungen spielen allerdings in der Pränataldiagnostik eine eher untergeordnete Rolle.

Im Vergleich zur Fluoreszenz in-situ Hybridisierung, die z.B. häufig als Schnelltest zum Nachweis von Trisomien verwendet wird, bieten DNA Chips den Vorteil, daß gleichzeitig weit mehr Genorte überprüft werden können.

### **2.33. Wie lange dauert eine Analyse mit Hilfe eines DNA Chips im Vergleich zu herkömmlichen Verfahren?**

Die Analyse kann in einem gut eingespielten Laborbetrieb innerhalb von 24-32h durchgeführt werden. Durch Optimierung der Protokolle ist es durchaus vorstellbar, diese Zeit noch weiter zu verkürzen.

### **2.34. Bietet der DNA Chip Kostenvorteile gegenüber anderen Verfahren?**

Wenn die gleichzeitige Analyse vieler Gene medizinisch indiziert ist, bietet der DNA Chip massive Kostenvorteile. Diesen Einsparungen stehen anfänglich allerdings hohe Investitionen in die notwendige Geräteausstattung gegenüber. Aus ökonomischen Gesichtspunkten erscheint es daher ratsam, diese Art der Untersuchungen in Zentren zu organisieren. Da die ersten kommerziellen Anbieter erst seit sehr kurzer Zeit auf dem Markt sind, ist es schwierig, die zukünftige Preisentwicklung abzuschätzen. Durch die vorhandene Konkurrenzsituation, große Abnahmemengen klinischer Routinelabors und weiteren technischen Entwicklungen ist allerdings zu erwarten, daß die Preise für DNA Chips reduziert werden.

### **2.35. Werden DNA Chips bereits außerhalb des reinen Forschungsbereichs kommerziell angeboten? Wie hoch ist die Leistungsfähigkeit der heute erhältlichen DNA-Chips? Wie hoch ist die diagnostische Sicherheit?**

Nachfolgend eine Auswahl an Firmen, die bereits Chips für die Untersuchung von DNA anbieten.

Affymetrix ;Oligoarray : [http://www.affymetrix.com/products/application/whole\\_genome.affx](http://www.affymetrix.com/products/application/whole_genome.affx)

Diese Firma bietet SNP Chips mit 10000, 100000 und bald 500000 DNA Sonden an. SNP Chips werden vorwiegend zur Analyse von Single Nucleotide Polymorphisms verwendet (siehe oben), laut Firmenangaben können sie aber auch für die Detektion von chromosomalen Gewinnen oder Verlusten eingesetzt werden.

Nimblegene; Oligoarray:

<http://www.nimblegen.com/products/cgh/>

Auf diesem Chip befinden sich derzeit 385000 DNA Sonden. Laut Firmenangabe beträgt das Auflösungsvermögen für die Feststellung chromosomaler Gewinne und Verluste ca. 50kb. Es ist aber auch möglich, selbst DNA Chips entsprechend der eigenen Fragestellung zu bestellen und z.B. die krankheitsrelevanten genomischen Regionen mit extrem hoher Dichte abzudecken.

Agilent ; Oligoarray:

<http://www.chem.agilent.com/scripts/pds.asp?lpage=29444>

Auf diesen Arrays befinden sich derzeit ca. 40000 DNA Sonden. Auch diese Firma bietet in Kürze sogenannte Zoom-in Chips an. Dabei handelt es sich um Chips, die nach Kundenwünschen zusammengestellt werden.

Spectral genomics; BAC Array:

<http://www.spectralgenomics.com/technology.htm>

Dieser BAC Array bietet ein Auflösungsvermögen von ca. 1Mb über das gesamte Genom. Diese Firma ist eine der wenigen, deren Chips schon länger auf dem Markt sind. Die Firma empfiehlt, zur Erhöhung der Sicherheit, jedes Experiment einmal zu wiederholen.

Es ist derzeit noch sehr schwer, die diagnostische Sicherheit der Analyse in Zahlen zu fassen, da es noch keine Erfahrungen über die breite Anwendung (kommerzieller) Chips gibt. Im eigenen Labor durchgeführte Vergleiche mit anderen Methoden der Zytogenetik zeigten jedoch, daß DNA Chips verlässlich alle genetische Veränderungen erkannten und in vielen Fällen genetische Auffälligkeiten diagnostizierten, die anderen Methoden entgangen waren.

Leistungsfähigkeit und Sicherheit hängen unter anderem davon ab, welche Fragestellung der Untersuchung zugrunde gelegt wird und wie demzufolge die Selektion der DNA Sonden erfolgt. Die derzeit auf den Markt kommenden Arrays sind mit Mehrheit noch nicht auf bestimmte krankheits-assoziierte Regionen im Genom fokussiert, sondern decken das Genom ziemlich gleichmäßig ab. Es ist zu erwarten, daß, nach gewisser Zeit und einem erweiterten Erkenntnisstand, spezielle Diagnostikchips auf den Markt kommen werden, die dann mit großer Redundanz (und damit äußerst hoher Sicherheit) krankheitsrelevante Regionen abdecken werden können. Je mehr unabhängige Sonden eine genetische Veränderung anzeigen können, um so sicherer wird die Aussage. Eine Trisomie 21 wird mit dem am MPI verwendeten 36000 BAC Array durch knapp 500 DNA Sonden erkannt. Die Gefahr hier ein falsches Ergebnis zu bekommen ist extrem gering.

Zusammenfassend hängt die Sicherheit der Aussage von mehreren Faktoren ab:

- a) Art der verwendeten Chips: BAC Chips gelten derzeit noch als verlässlicher und geben stabilere Ergebnisse. Zukünftig könnten allerdings Oligoarrays durch ihre extreme Dichte an DNA Sonden ähnliche Sicherheit erreichen.
- b) Größe der Veränderung (bei chromosomalen Gewinnen oder Verlusten): Große Veränderungen werden durch viele unabhängige DNA Sonden angezeigt und können daher mit sehr großer diagnostischer Sicherheit festgestellt werden. Vorstellbar ist, daß man, besonders bei kleinen Veränderungen, zur Erhöhung der diagnostischen Sicherheit die Ergebnisse durch unabhängige Methoden überprüft.
- c) Homogenität der Zellen: Es kann vorkommen, daß eine Veränderung nicht in allen Zellen vorkommt (Mosaik). Ein großer Prozentsatz an „normalen“ Zellen kann das Erkennen der Veränderung erschweren. Mosaik stellen generell eine Herausforderung an diagnostische Methoden dar.
- d) Qualität des durchführenden Labors

### **2.36. Ab wann ist mit einem breiten Einsatz von DNA-Chips zu rechnen?**

Es ist bereits jetzt eine klare Bewegung der kommerziellen Anbieter in Richtung klinische Diagnostik erkennbar. Ein konkreter Zeitrahmen ist aber schwer zu definieren, da die Einführung dieser Technik in die klinische Routine unter anderem durch das komplexe Zusammenspiel von Wissenschaft, Ökonomie und letztlich der Nachfrage durch Ärzte und Patienten bestimmt wird.

### **2.37. Welche Fortschritte in der Humangenetik sind durch die Einführung von DNA Chips mittelfristig zu erwarten?**

Durch den Einsatz der DNA Chips in Forschung und Diagnostik wird es vermehrt zur Aufklärung bislang unbekannter genetischer Ursachen von Erbkrankheiten kommen (z.B. Mikodeletionssyndrome) und damit bedeutsame Fortschritte in der klinischen Diagnostik gemacht werden.

**2.38. Wäre der Einsatz von DNA-Chips in der genetischen Pränataldiagnostik denkbar, etwa in der Art, dass eine Gen-Probe auf mehrere Hundert oder Tausend Veranlagungen untersucht wird?**

Aus technischer Sicht ist das denkbar und möglich.

**2.39. Ist nach einer breiten Markteinführung des DNA Chips zu erwarten, daß damit eine einfache, schnelle und preiswerte Methode für die routinemäßige parallele Analyse einer großen Zahl genetischer Informationen im Sinne einer unspezifischen Risikoabklärung möglich ist?**

Ja.