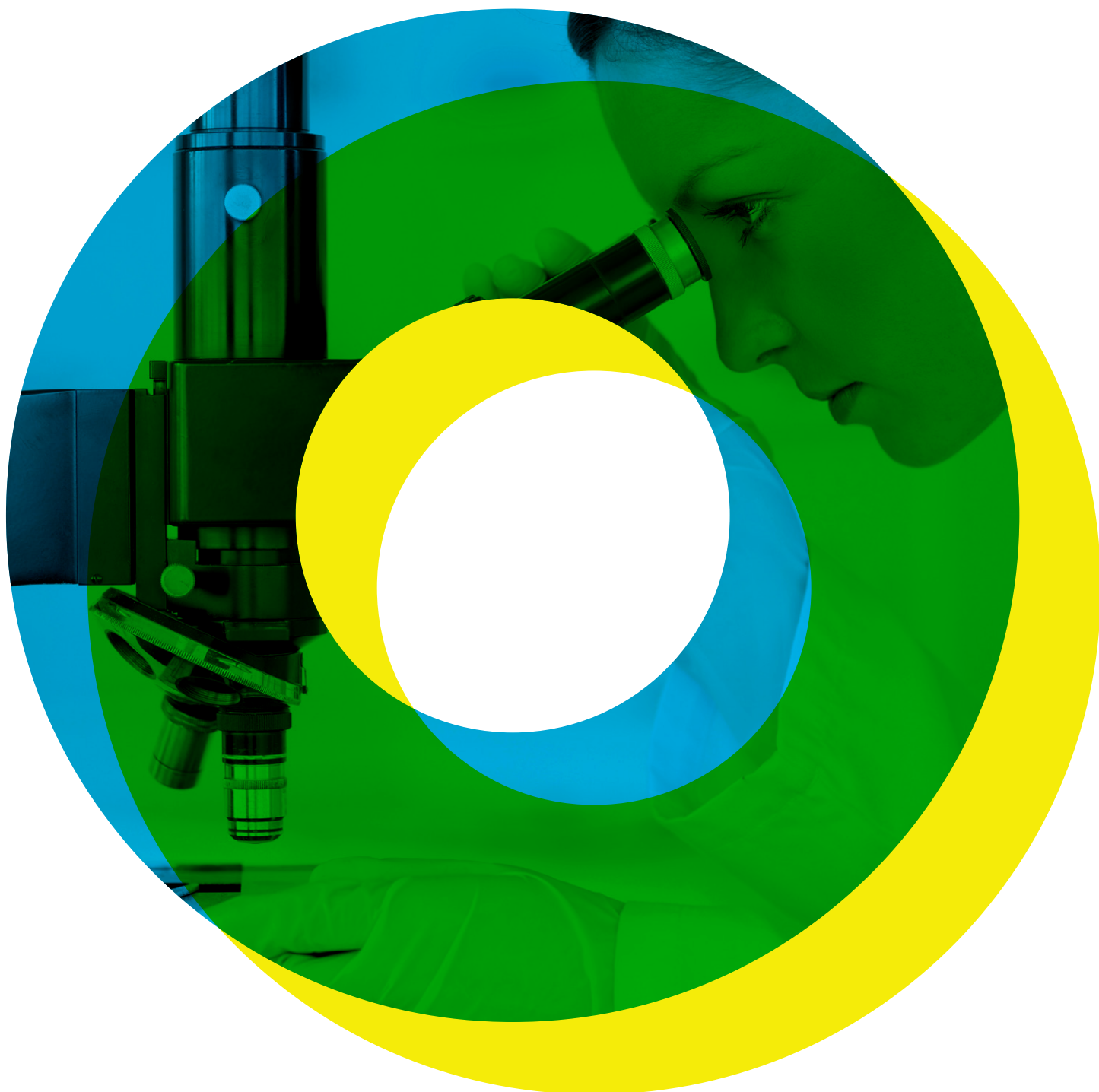


_Alle Laboruntersuchungen
_Mikrobiologie, Genanalysen
_Alle Kassen und Privat
_Zertifiziert nach ISO 9001 & ISO 14001

LABORS.AT 



GENETIK

ERBANLAGEN ALS RISIKOFAKTOREN FÜR ERKRANKUNGEN

LABORS.AT-FORTBILDUNGSAKADEMIE

Labors.at ist das größte medizinisch-diagnostische Labor Österreichs und führt im Rahmen von etwa 2.000.000 Patientenaufträgen ca. 20.000.000 medizinische Analysen pro Jahr durch. Rund 1.500 Arztordinationen und eine Vielzahl von anderen Institutionen haben Labors.at als ihren Laborpartner ausgewählt.

Aufgrund dieser ungewöhnlichen Größe trägt Labors.at eine große Verantwortung für die Qualität der medizinischen Versorgung im niedergelassenen Bereich in Ostösterreich. Die Qualität und der sinnvolle Einsatz der Labormedizin hängt nicht nur vom Labor selbst, sondern auch in wesentlichem Ausmaß von den Vorgängen in dessen Umfeld ab.

Um den medizinischen Anforderungen und qualitativen Erwartungen an ein großes Regionenlabor gerecht werden zu können, betreibt Labors.at die Labors.at Fortbildungsakademie. Im Rahmen dieser Akademie werden wissenschaftliche Vorträge und Fortbildungsveranstaltungen mit Workshops organisiert. Außerdem gibt Labors.at auch Fortbildungsbroschüren und praktische Anleitungen heraus.

Die Aktivitäten der Labors.at Fortbildungsakademie sind auf www.labors.at > Fortbildungsakademie zusammengefasst.

Das Labors.at Facharztteam möchte mit der Labors.at Fortbildungsakademie einen Beitrag zum hohen Niveau der medizinischen Versorgung im niedergelassenen Bereich in Ostösterreich leisten.

MR Dr. Johannes Bauer
Univ.-Doz. Dr. Georg Endler
Univ.-Doz. Dr. Markus Exner
Dr. Eva Mühl
Dr. Michael Mühl
Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Speiser
Univ.-Prof. Dr. Susanne Spitzauer
Dr. Sonja Wagner
Dr. Peter M. Winter



INHALTSVERZEICHNIS

I. Allgemeine Grundlagen.	4
1. Was sind Proteine (Eiweißstoffe)?	4
2. Was ist DNA (Desoxyribonucleinsäure)?	6
3. Wie unterscheidet sich die DNA verschiedener Menschen?	7
4. Was ist RNA (Ribonucleinsäure)?	8
5. Wie funktioniert die Proteinbildung?	9
6. Was ist der Genetische Code?	10
7. Was sind die Chromosomen des Menschen?	11
8. Was ist das humane Genom?	12
9. Was ist ein Gen?	12
10. Was ist ein Allel?	13
11. Was versteht man unter Genexpression?	13
12. Was ist eine Mutation?	14
13. Was sind DNA-Reparaturmechanismen?	15
14. Was versteht man unter Epigenetik?	16
15. Was sind genetische Störungen?	17
16. Was versteht man unter Genetischer Diagnostik?	19
17. Was versteht man unter Genthherapie?	21
II. Spezielle Fragestellungen	22
1. Welche klinische Konsequenz können monogenetische Veränderungen haben?	22
a. Monogenetische Erkrankungen.	22
b. Einfluss auf die Medikamentendosierung	22
2. Wie können sich polygenetische Veränderungen klinisch auswirken?	24
3. Auf welchen Untersuchungen basieren die Angaben zum genetischen Erkrankungsrisiko?	25
4. Wie sicher ist der reale Zusammenhang zwischen einem Single Nucleotide Polymorphismus (SNP) und einer Erkrankung, für die in einer genomweiten Studie eine Assoziation mit dem betreffenden SNP gefunden wurde?	27
5. Kann man das persönliche genetische Risiko für eine bestimmte Erkrankung zahlenmäßig angeben?	27
6. Beispiele für häufig auftretende Erkrankungen, bei denen nach derzeitigem Wissensstand eine polygenetische Prädisposition eine wichtige Rolle spielt.	28
a. Koronare Herzkrankheit.	28
b. Osteoporose	29
c. Fettleibigkeit (Adipositas) und Übergewicht	29

III. Biochemische Methoden der DNA- und RNA-Untersuchung	31
1. DNA-Isolierung	31
2. Polymerasekettenreaktion	32
3. DNA- und RNA-Sequenzierung	33
a. Didesoxymethode nach Sanger	34
b. Next Generation Sequencing	35
c. RNA-Sequenzierung	36
4. Genexpressions-Untersuchung	36
IV. Genetische Diagnostik - Entwicklungstendenzen und Ausblick	37

EINLEITUNG



Modernste labormedizinische Methoden ermöglichen einen „Blick in die Erbanlagen“. Dies bedeutet, dass es in zunehmendem Maße möglich ist, einen Einblick in den genetischen Bauplan jedes einzelnen Menschen zu bekommen. Für Ärzte ergeben sich dadurch immer bessere Möglichkeiten gesunde Menschen im Hinblick auf ihr genetisches, also erblich vorbestimmtes Risiko bestimmte Krankheiten im Laufe ihres Lebens zu entwickeln, zu beraten.

Eine derartige Beratung macht insbesondere dann Sinn, wenn der Betroffene aktiv etwas dazu beitragen kann, das Entstehen einer Erkrankung zu verhindern oder zumindest hinauszuzögern.

Dieser Bereich der Medizin, die sogenannte Präventiv- oder Vorsorgemedizin, wird in den nächsten Jahren und Jahrzehnten zunehmend an Bedeutung gewinnen. Rasant vermehrt sich das Wissen über genetisch bedingte Erkrankungsrisiken, aber auch über Möglichkeiten zur Verhinderung des Ausbruchs dieser Erkrankungen durch Einnahme bestimmter Medikamente oder durch Änderungen des Lebensstils.

In bestimmten Fällen entscheiden Erbanlagen darüber, ob manche Medikamente ausreichend wirksam sind oder nicht. Auch das Auftreten von Medikamenten-Nebenwirkungen kann durch genetische Faktoren beeinflusst werden. Es kann daher durchaus sinnvoll sein, vor der Einleitung einer Therapie genetische Labordiagnostiken zu veranlassen.

Labors.at ist eines der führenden medizinischen Labors auf dem Gebiet der genetischen Diagnostik und möchte mit der Broschüre „Genetik – Erbanlagen als Risikofaktoren für Erkrankungen“ Ärzten detaillierte Informationen über den aktuellen Stand der Wissenschaft auf diesem Gebiet der medizinischen Labor-Diagnostik geben. Die Kurzfassungen der einzelnen Kapitel sollen es medizinischen Laien ermöglichen, sich ein Bild über die Grundlagen und Einsatzgebiete der Gendiagnostik zu machen.

Die Autoren

Univ.-Prof. DDr. Pierre Hopmeier
Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Speiser

Wir hoffen, dass die vorliegende Informationsschrift einen Beitrag sowohl zur Verbesserung der Therapie als auch zur Verhinderung des Auftretens von Erkrankungen leisten kann.

Ihr Labors.at-Facharztteam

MR Dr. Johannes Bauer
Univ.-Doz. Dr. Georg Endler
Univ.-Doz. Dr. Markus Exner
Dr. Eva Mühl
Dr. Michael Mühl
Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Speiser
Univ.-Prof. Dr. Susanne Spitzauer
Dr. Sonja Wagner
Dr. Peter M. Winter

I. ALLGEMEINE GRUNDLAGEN

1. WAS SIND PROTEINE (EIWEISSSTOFFE)?

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

- _ Ein normalgewichtiger Mensch besteht zu etwa 17 % aus Eiweißstoffen, zu 60 % aus Wasser und zu 17 % aus Fett. Die restlichen 6 % setzen sich aus Zuckern (Kohlenhydrate), Mineralstoffen und Spurenelementen zusammen.
- _ Die Bestandteile, aus denen Eiweißstoffe aufgebaut sind, nennt man Aminosäuren. Die Größe der Eiweißstoffe hängt von der Anzahl der Aminosäuren ab, aus denen sie aufgebaut sind. Eiweißstoffe, die aus weniger als 100 Aminosäuren aufgebaut sind, werden Peptide genannt. Ist die Anzahl der Aminosäuren größer, spricht man von Proteinen.
- _ Der menschliche Organismus kann eine Vielzahl von Aminosäuren selbst erzeugen. Jene, die er nicht selbst herstellen kann, nennt man essentielle Aminosäuren. Der Mensch ist darauf angewiesen, diese mit der Nahrung aufzunehmen.
- _ Die mit der Nahrung aufgenommenen Eiweißstoffe werden im Verdauungstrakt in die einzelnen Aminosäuren aufgespalten. Aus den mit der Nahrung aufgenommenen Aminosäuren werden zusammen mit den selbst erzeugten Aminosäuren Eiweißstoffe hergestellt. Der Bauplan der Eiweißstoffe ist in der Erbsubstanz des Menschen festgelegt.
- _ Die Eiweißstoffe bilden die Grundlage menschlichen Lebens. Sie haben vielfältige Funktionen, die von der Formgebung (Zellskelett, Knochenskelett) über die Steuerung des Stoffwechsels bis hin zur Immunabwehr und der Fortpflanzung reichen.

Ein 70 kg schwerer Mensch besteht etwa zu 60 % aus Wasser, zu 17 % aus Fett, zu 6 % aus anderen Bestandteilen, wie z.B. Kohlenhydraten (Zucker), Mineralstoffen, Spurenelementen, und zu etwa 17 % aus Eiweißstoffen. Alle diese Substanzen bestehen aus Atomen. Dies sind kleinste Teilchen, von denen es verschiedene Arten gibt, die sich durch ihre Masse, Größe und Fähigkeit mit anderen Atomen zu reagieren und Verbindungen einzugehen, unterscheiden. Gleichartige Atome werden chemische Elemente genannt. Auf der Erde gibt es ungefähr 90 natürlich vorkommende chemische Elemente. Beispiele sind Eisen, Kalzium oder Phosphor. Wenn sich Atome zu größeren Einheiten vereinigen, werden diese Verbindungen Moleküle genannt. Eine besondere Gruppe

von Molekülen sind Aminosäuren. Sie bestehen aus den Atomen der Elemente Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Stickstoff; zwei Aminosäuren enthalten zusätzlich Schwefel. Das Charakteristikum von Aminosäuren ist, dass sie zumindest zwei typische Strukturen aufweisen, eine sogenannte Aminogruppe und eine Carboxygruppe (Abb. 1a). Mit Hilfe dieser Gruppen können sich Aminosäuren verknüpfen (Peptidbindung) und größere Moleküle bilden (Abb. 1b). Verbindungen aus bis zu ca. 100 Aminosäuren bezeichnet man als Peptide (Abb. 1c); Strukturen, die aus einer noch größeren Anzahl von Aminosäuren bestehen, nennt man Proteine. Sie können aus tausenden von Aminosäuren bestehen. Viele Proteine verbinden sich zu noch größeren Einheiten (Proteinkomplexen) (Abb. 1d). Dabei sind die unterschiedlichen räumlichen Strukturen, die von Proteinen und Proteinkomplexen gebildet werden, entscheidend für ihre Funktion.

Die Mehrzahl der für den Menschen notwendigen Aminosäuren kann der Körper bei Bedarf selbst herstellen (z. B. Alanin, Cystein oder Glutamin), einige müssen aber mit der Nahrung zugeführt werden; solche Aminosäuren werden als „essentielle“ Aminosäuren bezeichnet (z. B. Isoleucin, Leucin, Lysin oder Methionin).

Die mit der Nahrung aufgenommenen Proteine werden im Verdauungstrakt in ihre Aminosäuren aufgespalten, und diese werden durch den Darm in den Organismus aufgenommen. Aus diesen zugeführten und aus den selbst erzeugten Aminosäuren werden dann nach genetisch festgelegten Bauplänen die körpereigenen Eiweißstoffe hergestellt.

Die Proteine sind die Bausteine aller Organismen und die zentrale Voraussetzung für alle Lebensvorgänge. Ohne Proteine gibt es kein organisches Leben.

Um nur einige Funktionen von Proteinen zu nennen:

- _ Sie bilden die formgebenden Gerüststrukturen des Organismus, vom Zellskelett jeder einzelnen Zelle bis hin zu dem komplex aufgebauten Stütz- und Bewegungsapparat bestehend aus Knochen, Sehnen und Muskulatur.

— Sie wirken als Biokatalysatoren (Enzyme), das heißt, sie ermöglichen den Ablauf einer Vielzahl chemischer Reaktionen im Körper in biologisch effizienter Weise; dazu gehören z. B. die Synthese kleinerer Moleküle, etwa von Cholesterin und von Hormonen, die Verstoffwechselung von Medikamenten oder die Verwertung von Nahrungsmitteln. Im Rahmen der Energiespeicherung

und der Energiegewinnung steuern sie den Auf- und Abbau von Energiedepots in Form von Kohlehydrat- und Fettspeichern.

— Sie haben auch zahlreiche andere Aufgaben, z. B. im Immunsystem, bei allen Sinneswahrnehmungen, beim Sauerstofftransport oder bei der Zellteilung, der Fortpflanzung und der Vererbung.

Eiweißkörper mit zunehmend komplexem Aufbau

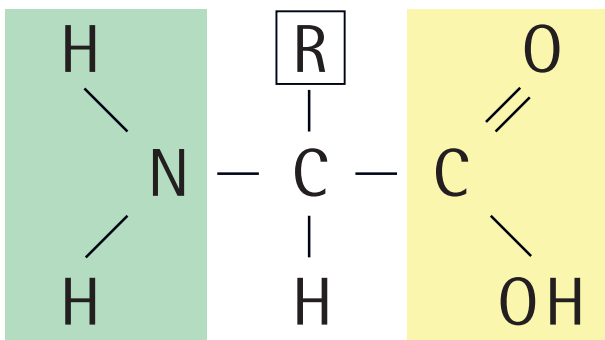


Abb. 1a. Aminosäure

Oben: Aminogruppe grün, Carboxygruppe gelb unterlegt. R = Seitenkette

Rechts: Der gelbe Kreis markiert die Peptidbindung. Kugeln: schwarz: Kohlenstoff, weiß: Wasserstoff, gelb: Sauerstoff, grün: Stickstoff

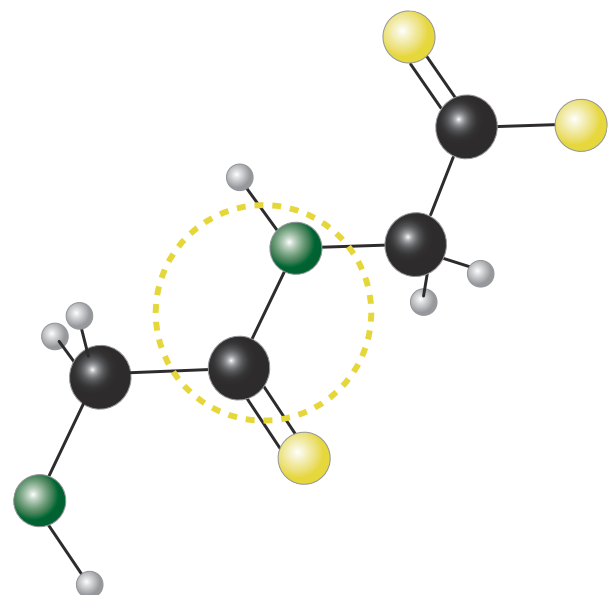
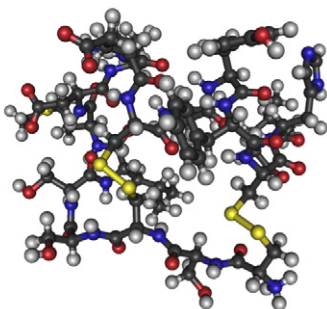
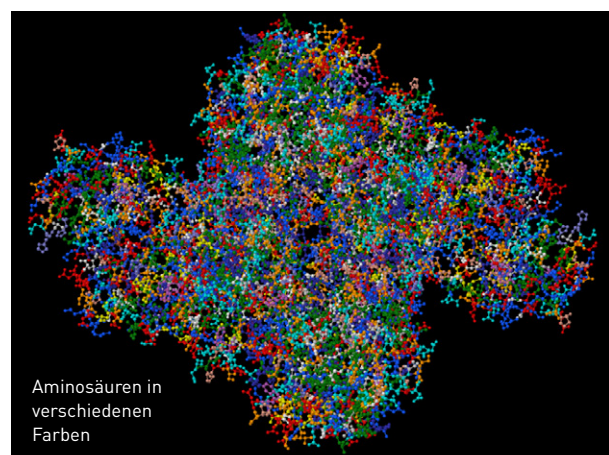


Abb. 1b. Peptid aus zwei Aminosäuren



Kugeln:
schwarz: Kohlenstoff,
weiß: Wasserstoff,
rot: Sauerstoff,
blau: Stickstoff,
gelb: Schwefel

Abb. 1c. Endothelin



Aminosäuren in
verschiedenen
Farben

Abb. 1d. Transferrinrezeptor-Transferrinkomplex

2. WAS IST DNA (DESOXYRIBONUCLEINSÄURE)?

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

- Die DNA ist ein kettenförmiges Molekül, aufgebaut aus vier unterschiedlichen Bausteinen (Nucleotiden).
- Die DNA liegt in den Zellen normalerweise als eingedrehter Doppelstrang bestehend aus zwei gegenläufigen Einzelsträngen vor (Doppelhelixstruktur).
- Weniger als 5 % der DNA dienen als Bauplan für die Herstellung von Eiweißkörpern. Die Funktion von über 95 % ist weitgehend ungeklärt; bestimmte Anteile haben Strukturaufgaben.
- Bei der Zellteilung wird von jedem der DNA-Einzelstränge eine Negativkopie erstellt, sodass die gesamte DNA einer Zelle verdoppelt wird; man bezeichnet das als Replikation. Folge ist, dass für jede neu gebildete Zelle das gesamte Erbmateriale zur Verfügung steht.

Die DNA ist ein kettenförmiges Molekül zusammengesetzt aus einer langen Reihe von Bausteinen, den Nucleotiden. Jedes Nucleotid besteht aus einem Phosphatrest, einem Zucker (Desoxyribose) und einer der vier organischen Basen: Adenin, Guanin, Cytosin oder Thymin (abgekürzt: A, G, C oder T). Das Molekül ist so aufgebaut, dass alternierend je ein Phosphatrest gefolgt von einer Desoxyribose das Rückgrat der Kette bilden und an jede Desoxyribose eine der vier Basen gebunden ist. Die DNA liegt normalerweise nicht als Einzelstrang vor, sondern besteht aus zwei schraubenförmig gedrehten, gegenläufigen Einzelsträngen, bildet also eine Doppelhelix, vergleichbar mit einer eingedrehten Strickleiter. Dabei sind die ins „Innere“ des Doppelstranges ragenden Basen durch chemische Kräfte gepaart, und zwar immer ein A mit einem T und ein G mit einem C. Daraus ergibt sich, dass jeder Einzelstrang die Negativkopie seines Gegenübers ist; die Stränge sind also komplementär (Abb. 2).

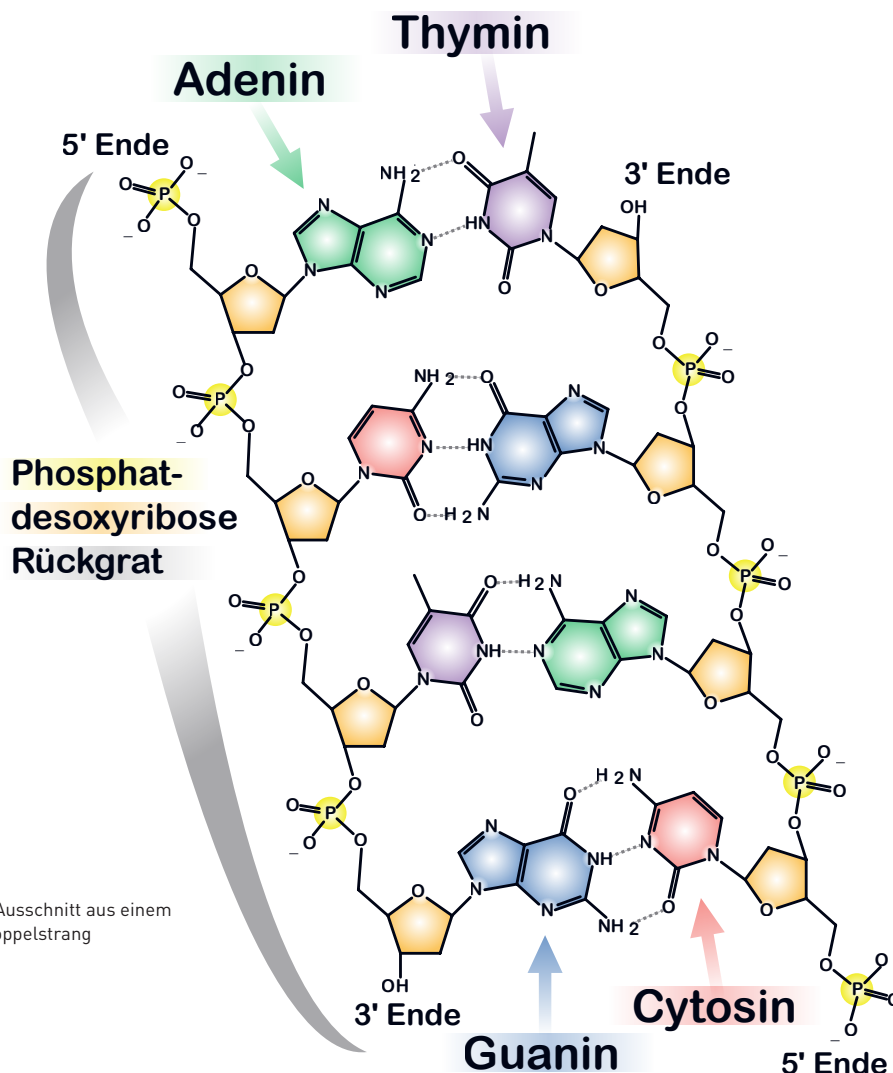


Abb. 2. Ausschnitt aus einem DNA-Doppelstrang

Vor einer Zellteilung wird die gesamte im Zellkern enthaltene DNA verdoppelt, sodass die gesamte genetische Information an beide neu gebildeten Zellen weitergegeben werden kann. Dazu wird der DNA-Doppelstrang in seine Einzelstränge gespalten und von jedem durch Anlagerung und Verknüpfung der komplementären Nucleotide eine Negativkopie erstellt. Diesen Vorgang bezeichnet man als **Replikation**.

Weniger als 5 % der DNA enthält Erbinformation, die als Vorlage für die Bildung von Proteinen dient. Über 95 % dienen u. a. als Vorlage für die Bildung von RNA-Molekülen (→ Was ist RNA (Ribonucleinsäure)?) und werden auch mit Strukturaufgaben in Zusammenhang gebracht, doch ist die biologische Bedeutung für den Großteil der DNA ungeklärt.

3. WIE UNTERSCHIEDET SICH DIE DNA VERSCHIEDENER MENSCHEN?

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

- _ Lediglich etwa 0,5 % der DNA sind von Mensch zu Mensch unterschiedlich.
- _ Unterschiede im Aufbau der DNA sind die Ursache für die Ausprägung von Merkmalen, die nicht bei allen Menschen gleich sind, wie z. B. Haut- und Haarfarbe, Blutgruppen, etc.
- _ Ein wichtiger Unterschied in der DNA verschiedener Menschen geht auf sogenannte Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) zurück; dabei findet sich an einer Stelle der DNA ein anderer Baustein (Nucleotid) als im Regelfall.

Kein Mensch verfügt über eine DNA, die der eines anderen Menschen völlig gleicht. Selbst bei eineiigen Zwillingen gibt es geringfügige Unterschiede, u. a. durch Mutationen (→ Was ist eine Mutation?) im Zuge ihrer Entwicklung. Im Allgemeinen geht man davon aus, dass sich die Basenpaare der Menschen im Durchschnitt um etwa 0,1–0,5 % unterscheiden, dass also – vergleicht man die DNA zweier Personen – zumindest jedes tausendste Basenpaar unterschiedlich ist. Da ein einfacher Chromosomensatz (→ Was sind die Chromosomen des Menschen?) aus rund 3 Milliarden Basenpaaren besteht, entspricht das einer Differenz von mindestens 3 Millionen Basenpaaren. Eine Reihe individueller Merkmale von Menschen geht auf solche Unterschiede in der DNA-Sequenz zurück, z. B. die Augenfarbe oder die Blutgruppen.

Ein kleinerer Teil der DNA-Differenzen beruht auf sogenannten **Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs)**. Als Polymorphismus bezeichnet man allgemein eine Genvariante (→ Was ist ein Gen?), die in der Bevölkerung mit einer Häufigkeit von mindestens 1 % vorkommt; ein SNP ist ein Polymorphismus, bei dem sich an einer bestimmten Stelle der DNA ein einzelnes Nucleotid befindet, das sich von dem allgemein vorherrschenden Nucleotid unterscheidet, z. B. wenn an einer bestimmten Position die Base A vorliegt statt der sonst üblichen Base G. Man schätzt, dass insgesamt etwa 10–30 Millionen SNPs existieren; von diesen haben aber nur etwa 3–5 % einen Effekt auf die Genexpression (→ Was versteht man unter Genexpression?), die übrigen haben keine bekannte Auswirkung.

Neben punktuellen Unterschieden in der DNA-Sequenz, wie sie durch SNPs verursacht werden, gibt es eine Reihe von Variationen, die ausgedehnte DNA-Bereiche betreffen. Dazu gehören z. B. Deletionen (Fehlen einer DNA-Sequenz), Inversionen (ein Teil der DNA verläuft „in verkehrter Richtung“) oder Duplikationen (eine DNA-Sequenz ist verdoppelt).

Von „copy number variations“ spricht man, wenn besonders große DNA-Abschnitte (meist über 1000 bis zu mehreren Millionen Basen) in abnormaler Zahl vorliegen. Ursache können Duplikationen sein, aber auch der Verlust normaler DNA-Anteile (Deletionen), sodass weniger Wiederholungen eines DNA-Abschnittes vorliegen als normal. Copy number variations sind häufig; vergleicht man die Gesamt-DNA zweier nicht verwandter Menschen, so unterscheidet sie sich meist um etwa 0,4 % aufgrund ihrer copy number variations.

Copy number variations können Regionen mit einem oder auch mehreren Genen umfassen. Sie können mit Erkrankungen assoziiert sein, oft haben sie aber keinen erkennbaren Effekt. Einige copy number variations, die eine Erhöhung der Zahl eines bestimmten Gens bewirken, scheinen sich in der Evolution vorteilhaft ausgewirkt zu haben.

4. WAS IST RNA (RIBONUCLEINSÄURE)?

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

- _ Um die auf der DNA gespeicherte Information für die Proteinbildung verfügbar zu machen, werden Kopien der entsprechenden DNA-Abschnitte hergestellt, die sogenannten Messenger-RNAs (mRNAs). Diesen Vorgang, also die Übertragung der genetischen Information von der DNA auf die mRNA, bezeichnet man als Transkription.
- _ Nach ihrer Bildung gelangt die mRNA vom Zellkern zum Produktionsort der Proteine (Ribosomen) innerhalb des Zellplasmas.
- _ Transfer-RNAs (tRNAs) transportieren die Aminosäuren, aus denen die Proteine nach dem auf der mRNA vorgegebenen Bauplan hergestellt werden, zur mRNA an den Ribosomen.
- _ Abgesehen von der mRNA und tRNA gibt es eine Reihe anderer RNA-Formen mit unterschiedlichen Funktionen.

Die RNA ist der DNA ähnlich. Auch sie ist ein kettenförmiges Molekül aus aneinander gereihten Nucleotiden. Wie bei der DNA bildet das Rückgrat des Moleküls eine alternierende Abfolge von Phosphatresten und Zuckern, nur dass es sich beim Zucker um Ribose (und nicht um Desoxyribose wie bei der DNA) handelt. An jede Ribose ist eine der vier organischen Basen gebunden: Adenin, Guanin, Cytosin oder Uracil (abgekürzt: A, G, C und U; im Gegensatz zur DNA enthält die RNA somit Uracil anstelle von Thymin, die übrigen drei Basen finden sich auch in der DNA). Die RNA kommt vorwiegend als Einzelstrang vor; allerdings findet sich abschnittsweise oft eine Doppelstrangstruktur, die dadurch zustande kommt, dass sich komplementäre Anteile eines Stranges unter Bildung einer Schleife aneinander lagern und sich gegenüber liegende komplementäre Basen (A mit U und C mit G) chemisch aneinander binden.

Man unterscheidet verschiedene RNA-Moleküle:

a. Messenger-RNA

Lange bekannt ist die Messenger-RNA (mRNA), deren Funktion darin besteht, die auf der DNA enthaltene Information eines bestimmten Gens zu kopieren und zu den Ribosomen (den „Proteinfabriken“ der Zelle) zu transportieren. Dazu wird der DNA-Doppelstrang zunächst an der zu kopierenden Stelle geöffnet, sodass die beiden Einzelstränge zugänglich werden (ähnlich wie ein geschlossener defekter Zippverschluss, der in der Mitte aufreißt). An einen der Einzelstränge (dem codo-

genen Strang) lagern sich durch Basenpaarung RNA-Nucleotide an, die anschließend zu einem RNA-Strang verknüpft werden. Es entsteht somit eine Negativkopie des betreffenden DNA-Segementes, die prä-mRNA. Diese löst sich dann vom DNA-Strang und durchläuft einen Prozess, den man als Splicing bezeichnet. Dabei werden alle Abschnitte aus der prä-mRNA herausgeschnitten, die nicht als Vorlage für die spätere Bildung eines Proteins dienen, und die Bruchstücke werden wieder zu einem zusammenhängenden RNA-Strang zusammengefügt. Es ist das die reife mRNA. Es gibt auch die Möglichkeit, dass unterschiedliche Segmente aus der prä-mRNA herausgeschnitten werden, sodass von einem einzigen DNA-Segment verschiedene RNAs und damit unterschiedliche Vorlagen für Proteine hergestellt werden. Den Vorgang bezeichnet man als alternatives Splicing; er findet häufig statt und ist die Ursache, dass es wesentlich mehr Proteine als Gene (→ Was ist ein Gen?) gibt. Den gesamten Vorgang, also das „Umschreiben“ eines DNA-Segementes in eine RNA, bezeichnet man als Transkription.

b. Transfer RNA und andere RNA-Formen

Abgesehen von der mRNA gibt es eine ganze Reihe anderer RNA-Formen, darunter die transfer-RNAs (tRNAs) (→ Wie funktioniert die Proteinbildung?), die die für die Proteinsynthese notwendigen Aminosäuren zu den Ribosomen transportieren, weiters solche, die am Aufbau des Ribosoms beteiligt sind und für das „Funktionieren“ der Proteinsynthese Sorge tragen und wieder andere, die nicht direkt an der Bildung von Proteinen beteiligt sind, sondern z. B. auf die Regulation der Genexpression (→ Was versteht man unter Genexpression?) oder die Steuerung von Zellvorgängen Einfluss nehmen.

5. WIE FUNKTIONIERT DIE PROTEINBILDUNG?

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

- Die Strukturen in den menschlichen Zellen, in denen die Proteinproduktion stattfindet, werden als Ribosomen bezeichnet.
- Transfer-RNAs (tRNAs) transportieren die Aminosäuren, aus denen die Proteine nach dem auf der mRNA vorgegebenen Bauplan aufgebaut werden, zur mRNA an den Ribosomen. Der Transport erfolgt durch unterschiedliche tRNAs, die für die verschiedenen Aminosäuren spezifisch sind.
- Die mit ihrer entsprechenden Aminosäure beladenen tRNAs binden jeweils an eine definierte komplementäre Basenfolge auf der mRNA. Dadurch ist gewährleistet, dass die Aminosäuren – entsprechend dem genetischen Bauplan auf der mRNA – in der richtigen Reihenfolge angeordnet werden. Danach werden sie zum fertigen Protein verknüpft.
- Den gesamten Vorgang, also die Bildung eines Proteins aus Aminosäuren, die mit Hilfe von tRNAs angeliefert und nach dem auf der mRNA vorgegebenen Bauplan verknüpft werden, bezeichnet man als Translation.

Die gebildete reife mRNA (→ Was ist RNA (Ribonucleinsäure)?) wird aus dem Zellkern zu den Ribosomen transportiert und dient als Vorlage für die Bildung eines entsprechenden Proteins. Die Bausteine für die Proteinbildung (die Aminosäuren) werden durch transfer-RNAs (tRNAs) zu den Ribosomen gebracht. tRNAs sind kleine Molekül-Fäden (meist 73–95 Nucleotide lang), die kleeblattartige Schleifen bilden. Es gibt eine ganze Reihe unterschiedlicher tRNA-Moleküle. Je nach Art des tRNA-Moleküls wird an einem Ende eine ganz bestimmte Aminosäure gebunden, auf der „gegenüberliegenden“ Seite findet sich eine spezifische, von der Art des tRNA-Moleküls abhängige Folge von drei Basen (ein Basen-Triplett). Diese drei Basen können an eine komplementäre Basen-Sequenz auf einer mRNA andocken. Die drei Basen auf der mRNA nennt man Codon, die dazu passenden Basen auf der tRNA heißen Anticodon (Abb. 3).

Die Abfolge von jeweils drei Basen auf der mRNA bestimmt also, welche Art von tRNA-Molekülen der Reihe nach andocken kann. Da jede tRNA eine bestimmte Aminosäure trägt, wird dadurch zugleich eine Reihenfolge von Aminosäuren festgelegt.

In den Ribosomen, den „Proteinfabriken“ der Zelle, geschieht folgendes: Die mit ihren spezifischen Amino-

säuren beladenen tRNA-Moleküle docken sukzessive an die mRNA an, und eine Aminosäure nach der anderen wird mit ihrer Vorgänger-Aminosäure (durch eine Peptid-Bindung) verknüpft, sodass eine wachsende Aminosäurekette entsteht; nach Abgabe ihrer Aminosäure verlassen die tRNAs das Ribosom. Der Vorgang läuft ab, bis das auf der mRNA codierte gesamte Protein entstanden ist. Auch Beginn und Ende der Proteinsynthese sind durch ein Basen-Triplett festgelegt. Den gesamten Vorgang, also die Übersetzung der mRNA-Sequenz in eine Folge von Aminosäuren und ihre Verknüpfung zu einem Protein, bezeichnet man als **Translation** (Abb. 4).

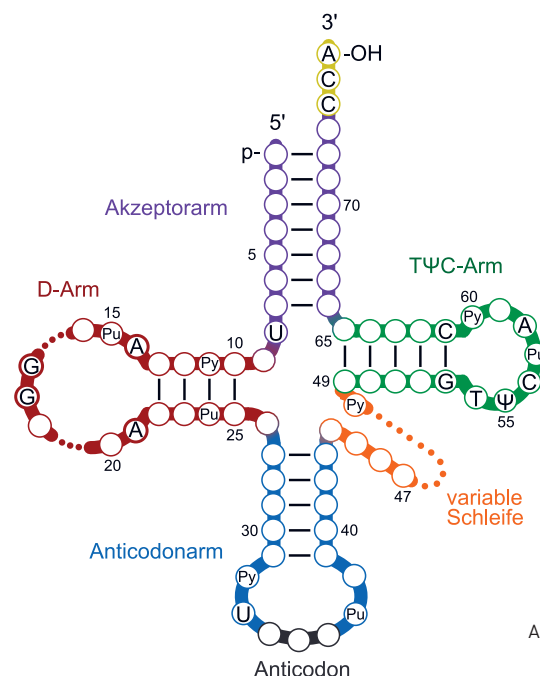


Abb. 3. Schema einer transfer-RNA

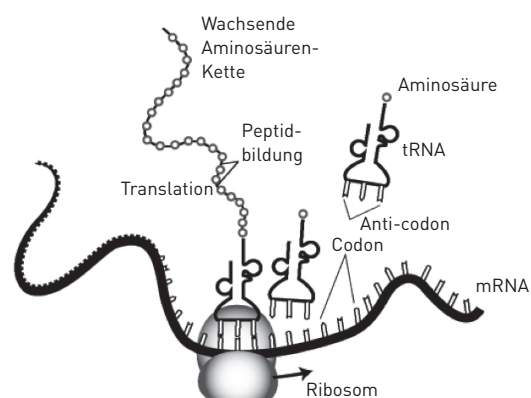


Abb. 4. Schema der Translation

6. WAS IST DER GENETISCHE CODE?

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

Es sind genau festgelegte Abfolgen von jeweils drei Bausteinen (Nucleinsäuren) auf der tRNA und mRNA, die festlegen, welche Aminosäure an welcher Stelle in einen in Bildung befindlichen Eiweißkörper eingebaut wird. Die Gesamtheit aller dieser Abfolgen, die bei der Proteinbildung vorkommen, ist durch den Genetischen Code vorgegeben.

Durch den Genetischen Code ist festgelegt, welche definierte Abfolge von jeweils drei Nucleinsäuren (ein Basen-Triplett) die Information für eine bestimmte Aminosäure sowie für den Beginn und das Ende der Proteinsynthese beinhaltet. (Abb. 5).

Es gibt 20 Aminosäuren, für die ein spezifischer Genetischer Code existiert, dazu kommt die Notwendigkeit, die Information für den Beginn und das Ende einer Proteinsynthese zu codieren; theoretisch wären also insgesamt 22 Basen-Triplets ausreichend. Tatsächlich existieren aber 61 solcher Triplets für Aminosäuren und weitere für die Codierung des Beginns und des Endes der Proteinsynthese (ein Start-Codon und drei Stop-Codons). Die Erklärung ist, dass es für die Codierung der meisten Aminosäuren (und für das Stop-Signal) nicht nur ein einziges Basen-Triplett, sondern mehrere gibt. Zum Beispiel codiert sowohl die Basenfolge GAA als auch GAG für Glutaminsäure (Glu) (Abb. 5). Diese Eigenschaft bezeichnet man als Degeneration des Genetischen Codes. Diese ist entwickungsgeschichtlich ein großer Vorteil, da bei der Replikation der DNA (→ Was ist DNA (Desoxyribonucleinsäure)?) nicht selten „falsche“ Basen eingebaut werden. Durch die Degeneration des Genetischen Codes besteht aber die Möglichkeit, dass die Natur solche Fehler „verzeiht“ und trotz des Basenaustausches die richtige Aminosäure in ein Protein eingebaut werden kann (→ Was ist eine Mutation? Siehe: silent mutation).

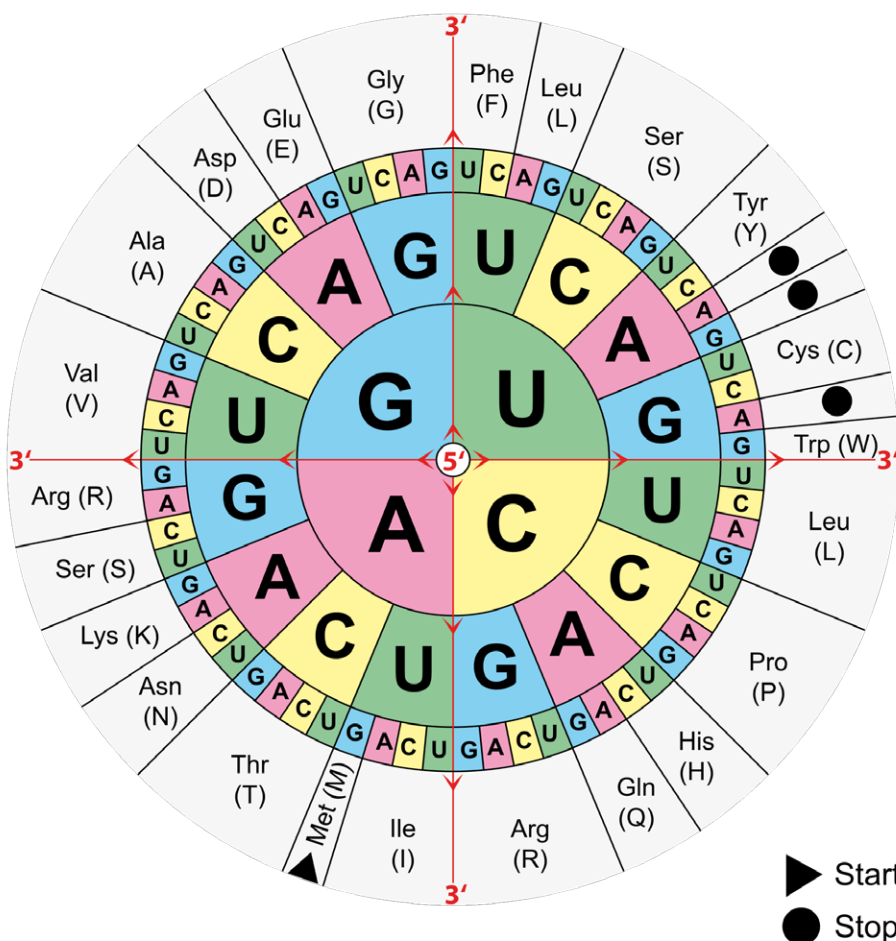


Abb. 5. Der Genetische Code

7. WAS SIND DIE CHROMOSOMEN DES MENSCHEN?

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

- In den menschlichen Zellen findet sich die DNA vorwiegend im Zellkern. Sie liegt dort nicht in freier Form vor, sondern in einem Komplex mit Proteinen, der als Chromatin bezeichnet wird.
- Das Chromatin des Menschen besteht nicht aus einem Stück, sondern aus 46 getrennten Anteilen, die als Chromosomen bezeichnet werden; 23 stammen vom Vater und 23 von der Mutter. Der Chromosomensatz besteht also aus 23 Chromosomenpaaren bzw. aus 46 Einzelchromosomen. Eine Ausnahme bilden die Ei- und Samenzellen, die nur über den halben Chromosomensatz verfügen.
- Bei den Chromosomen unterscheidet man 44 Autosomen und zwei Geschlechtschromosomen, die das Geschlecht eines Menschen bestimmen.
- Die Chromosomen sind relativ groß, haben charakteristische Formen und können im Stadium der Zellteilung mit lichtmikroskopischen Methoden unterschieden werden.

Die Chromosomen finden sich in den Zellkernen und bestehen aus DNA und Proteinen. Die menschlichen Körperzellen enthalten 23 Chromosomenpaare, und zwar 22 Autosomen und je ein Geschlechtschromosom von jedem Elternteil, also insgesamt 46 Chromosomen. Eine Ausnahme bilden die Keimzellen (Eizellen und Spermien), die nur über einen einfachen Chromosomensatz, also über 23 Chromosomen, verfügen.

Der Komplex aus DNA und Proteinen wird als **Chromatin** bezeichnet; die Packungsdichte, also der Zustand des Chromatins, ändert sich in Abhängigkeit von den laufenden Zellfunktionen. Solange sich eine Zelle nicht teilt, liegt das Chromatin in zwei Formen vor, als Euchromatin und Heterochromatin. Im Euchromatin ist die DNA eher lose verpackt und das ermöglicht, dass die in ihr enthaltene Information abgelesen werden kann. Heterochromatin zeigt dagegen eine hohe Packungsdichte und scheint hauptsächlich strukturelle Aufgaben zu haben; es erfolgt keine oder eine nur gelegentlich Ablesung der DNA.

Bei der Zellteilung kommt es gegen Ende der DNA-Replikation (→ Was ist DNA [Desoxyribonucleinsäure]?) zu einer besonders dichten Packung des Chromatins. Dabei kommt die Ablesung der DNA zum Erliegen und die Chromosomen werden lichtmikroskopisch sichtbar. Sie können dann mit verschiedenen Methoden gefärbt, fotografiert und – da sie sich in ihrem Aussehen unter-

scheiden – paarweise angeordnet werden (Karyogramm) (Abb. 6). Die Paare der Autosomen werden nach ihren Nummern geordnet (1–22), bei den Geschlechtschromosomen finden sich entweder zwei X-Chromosomen (bei der Frau) oder ein X- und ein Y-Chromosom (beim Mann).

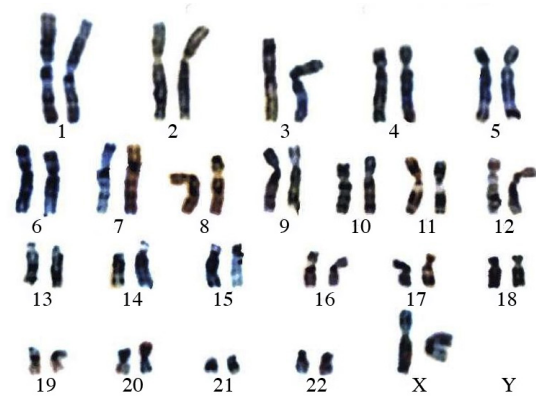


Abb. 6. Karyogramm einer normalen Frau

8. WAS IST DAS HUMANE GENOM?

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

- Die gesamte in der menschlichen DNA gespeicherte vererbte Information wird als humanes Genom bezeichnet.

Unter dem humanen Genom versteht man die gesamte genetische Information des Menschen. Sie ist in Form von DNA gespeichert. Die Hauptmenge der DNA findet sich in den Zellkernen. Mit Ausnahme der Keimzellen (Ei- und Samenzellen) ist die DNA in jeweils 23 Chromosomenpaaren (also in 46 Chromosomen) angeordnet, die insgesamt etwa 3 Milliarden Basenpaare enthalten; ein Chromosom jedes Chromosomenpaares stammt von der Mutter, das andere vom Vater; die Keimzellen verfügen nur über einen einfachen Chromosomensatz (also 23 Chromosomen) und somit über halb soviel DNA.

Abgesehen von den Zellkernen findet sich auch ein kleiner Teil der menschlichen DNA in bestimmten Zellorganellen, den Mitochondrien, die sich in der Zellflüssigkeit (Zytoplasma) befinden. In den Mitochondrien liegt die DNA in zirkulärer Form vor.

9. WAS IST EIN GEN?

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

- Ein Gen ist ein Abschnitt auf der DNA, der die Information für den Aufbau und die Produktion eines bestimmten Proteins oder einer bestimmten RNA enthält.

Die Definition für ein Gen ist nicht einheitlich. Für Lebewesen, deren Zellen einen Zellkern enthalten (Eukaryoten), kann man vereinfacht sagen, dass ein Gen einen bestimmten Abschnitt auf der DNA repräsentiert, der die Information für die Bildung einer biologisch aktiven RNA (→ Was ist RNA (Ribonucleinsäure)?) enthält.

Im einzelnen besteht ein Gen aus jenen DNA-Abschnitten, die die notwendige Information für die Struktur von Eiweißkörpern (Proteine und Peptide) oder für die Bildung verschiedener Ribonucleinsäuren enthalten und weiters aus jenen DNA-Abschnitten, die für die Regulation des Kopiervorganges (Weiterverarbeitung der Information) notwendig sind.

Bei einigen Genen ist die Information ohne Unterbrechung in einem einzigen DNA-Stück enthalten, in den meisten Fällen ist die Information aber durch DNA-Zwischenstücke unterbrochen, die im Rahmen der Bildung der reifen mRNA herausgeschnitten werden. Die DNA-Segmente, die entfernt werden, heißen **Introne**, die Segmente, die verbleiben und die eigentliche genetische Information tragen, nennt man **Exone**.

Das menschliche Genom enthält schätzungsweise 20.000–25.000 Gene.

10. WAS IST EIN ALLEL?

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

- Für jedes Gen werden zwei Baupläne vererbt, einer von der Mutter und einer vom Vater. Sie können identisch oder auch unterschiedlich sein. Jeder dieser Baupläne wird als Allel bezeichnet.
- Bei Allelen, die die genetische Information für die Bildung eines Proteins tragen, kann prinzipiell jedes der beiden zur Proteinbildung herangezogen werden. Werden beide Allele aktiviert, so werden sie als co-dominant bezeichnet. Falls zwei unterschiedliche Allele vorliegen, kann es vorkommen, dass nur eines der beiden Allele aktiviert wird und daher nur jene Eigenschaften zum Tragen kommen, deren Bauplan dieses Allel enthält. In diesem Fall bleibt das zweite Allel stumm. Das Allel, dessen Erbinformation manifestiert wird, bezeichnet man als dominant, das andere als rezessiv.

Bei der Entstehung des menschlichen Organismus kommt es im ersten Schritt zur Verschmelzung einer mütterlichen (Eizelle) und einer väterlichen (Samenzelle) Zelle. Dabei kommt es auch zur Mischung der DNA der beiden Zellen. Somit hat jedes Kind sowohl mütterliche als auch väterliche Informationen in seiner DNA angelegt. Für ein bestimmtes Gen gibt es somit zwei Informationseinheiten, eine mütterliche und eine väterliche. Unter einem Allel versteht man die mögliche Ausprägung eines Gens, das sich an einer bestimmten Stelle auf einem Chromosom (→ Was sind die Chromosomen des Menschen?) befindet.

Da der Mensch einen doppelten Chromosomensatz hat (je ein Chromosom von der Mutter und vom Vater), kann er zwei gleiche oder zwei unterschiedliche Allele für ein bestimmtes Gen haben. In einer Person mit zwei unterschiedlichen Allelen können sich beide manifestieren. Man bezeichnet das als **co-dominant**. Wird z. B. von einem Elternteil das Gen für die Blutgruppe A und vom anderen das für die Blutgruppe B vererbt, resultiert die Blutgruppe AB. Andererseits kann ein Allel auch über das andere „dominieren“. Man bezeichnet dann das Gen, das sich an der betreffenden Person manifestiert, als **dominant**, das andere als **rezessiv**. So hat jemand, dem von einem Elternteil die Erbinformation für braune Augen, vom anderen für blaue Augen vererbt wird, braune Augen. Die Erbinformation für die braune Augenfarbe ist also gegenüber der Information für die blaue Augenfarbe dominant.

11. WAS VERSTEHT MAN UNTER GENEXPRESSION?

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

- Unter Genexpression versteht man die Gesamtheit aller Abläufe, die vom Gen zum Genprodukt führen.

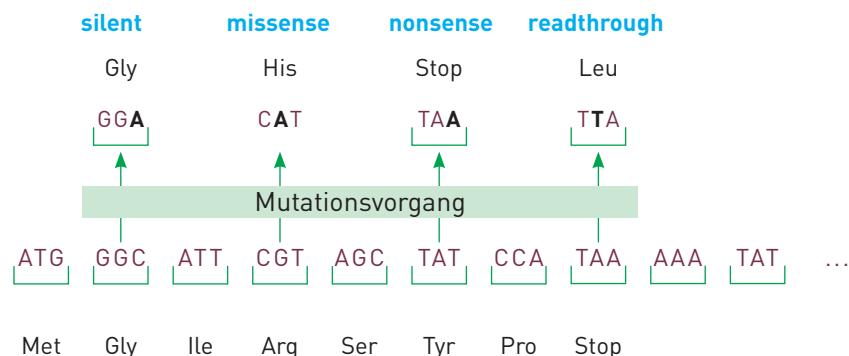
Es gibt eine Reihe von Genen (→ Was ist ein Gen?), die kontinuierlich und mit annähernd gleicher Intensität exprimiert werden; ihre Genprodukte – z. B. bestimmte Eiweißkörper – sind meist für die Aufrechterhaltung essentieller Zellvorgänge notwendig. Solche Gene werden als Haushaltsgene bezeichnet. Die Aktivität der meisten Gene ist allerdings nicht konstant sondern variabel und wird auf mehreren Ebenen gesteuert. Die verschiedenen Steuerungsvorgänge werden als **Genregulation** bezeichnet. Bei den meisten Genen sind dabei die Prozesse am wichtigsten, die bestimmen, ob ein Gen überhaupt abgelesen wird oder nicht, d.h. die Kontrolle des Beginns der Transkription (→ Was ist RNA (Ribonukleinsäure)?). Diese erfolgt durch Bindung von spezifischen Proteinen, sog. Transkriptionsfaktoren, an bestimmte DNA-Regionen, die außerhalb der abzulesenden Genregion lokalisiert sind (Promotoren). Diese Bindung verursacht eine Änderung der räumlichen Struktur der DNA. Bei den Transkriptionsfaktoren gibt es zwei Arten: Aktivatoren und Repressoren. Die Bindung eines Aktivators hat zur Folge, dass sich weitere für die Aktivierung relevante Proteine anlagern können und dadurch letztlich der Ablesevorgang in Gang kommt. Bindet hingegen ein Repressor, wird die Anlagerung weiterer Proteine verhindert und so die Ablesung des Gens blockiert. Für die genannten Abläufe gibt es eine Vielzahl von Steuerungsmechanismen. Die Gesamtheit der Abläufe, die vom Gen zum Genprodukt führen, bezeichnet man als Genexpression.

Mutationstyp

codierte Aminosäuren
Basentriplets mit
mutierter Base (mRNA)

nicht mutierte
Basentriplets (DNA)

codierte Aminosäuren



12. WAS IST EINE MUTATION?

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

- Eine Mutation ist eine dauerhafte Veränderung des Erbgutes.
- Mutationen können spontan – also ohne äußeren Anlass – entstehen oder ausgelöst sein durch Einflüsse, die eine schädigende Wirkung auf die DNA haben, z. B. durch radioaktive Strahlung oder verschiedene Gifte.
- Je nach Art und Lokalisation einer Mutation kann diese eine Erkrankung verursachen, stumm verlaufen oder sogar mit einem biologischen Vorteil verbunden sein.

Unter einer Mutation versteht man eine bleibende Veränderung der Erbinformation. Eine solche kann die Zellen der Keimbahn (Eizelle, Samenzelle) betreffen und wird an die Nachkommen weitergegeben. Sind andere Körperzellen (somatische Zellen) betroffen, wird die Veränderung der Erbinformation nicht weitervererbt. Mutationen können spontan, also ohne erkennbare Ursache, entstehen, z. B. bei Fehlern während der Zellteilung oder aber verursacht sein durch schädigende Einflüsse, z. B. toxisch oder durch radioaktive Strahlung.

Bei den Mutationen unterscheidet man solche, die mehrere oder nur eine Base der DNA betreffen. Ist nur eine Base betroffen, spricht man von einer **Punktmutation**. Liegt eine solche innerhalb eines Gens, kann das folgende Konsequenzen haben (Abb. 7):

- Die Mutation hat keine Auswirkung auf den Aufbau eines Proteins (silent mutation), weil aufgrund der Degeneration des genetischen Codes (→ Was ist der Genetische Code?) trotz des Basenaustausches auf der DNA die richtige Aminosäure in das Protein eingebaut wird,

Abb. 7. Beispiele für Punktmutationen im codierten Bereich der DNA.

- _ Es wird eine falsche Aminosäure in das codierte Protein eingebaut, somit ein abnormales Protein gebildet (missense mutation),
- _ Die Proteinsynthese wird zu früh abgebrochen, weil durch die Mutation ein Stop-Codon entsteht (nonsense mutation),
- _ Die Proteinsynthese wird zu spät abgebrochen (readthrough mutation), weil durch die Mutation ein Stop-Codon eliminiert wird, sodass erst „verspätet“ ein anderes zum Zug kommt.

Punktmutationen, die in der Bevölkerung so häufig vorkommen, dass man sie als Variation eines DNA-Basenpaares ansehen kann, werden als Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) (→ Wie unterscheidet sich die DNA verschiedener Menschen?) bezeichnet.

Fehlen eine oder mehrere Basen auf der DNA, spricht man von Deletionen; sind Nucleotide in „verkehrter“ Richtung angeordnet, spricht man von einer Inversion; sind sie an einer unrichtigen Stelle der DNA-Sequenz positioniert, handelt es sich um eine Translokation. Auch können DNA-Anteile vervielfacht sein (z. B. Duplikationen, copy number variations (→ Wie unterscheidet sich die DNA verschiedener Menschen?)).

Mutationen, die ganze Chromosomen oder größere Anteile eines Chromosoms betreffen, werden als Chromosomenaberrationen bezeichnet.

Manifeste Mutationen können Erkrankungen verursachen, aber auch stumm verlaufen oder von Vorteil sein.

13. WAS SIND DNA-REPARATURMECHANISMEN?

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

- _ Die DNA kann durch äußere Einflüsse, wie z. B. diverse Gifte, UV- oder radioaktive Strahlung, geschädigt werden.
- _ Die menschliche Zelle verfügt über diverse Reparaturmechanismen, die nach eingetretener Schädigung den DNA-Originalzustand wiederherstellen können.
- _ Können eingetretene Schäden nicht repariert werden, kann es zu Fehlfunktionen, z. B. bei der Produktion von Eiweißstoffen, kommen. Die Störungen können u. a. auch den Steuerungsmechanismus der Zellteilung betreffen und so ein ungebremstes Wachstum im Sinne eines Tumors auslösen.

Die DNA unterliegt permanent schädigenden Einflüssen. Dazu gehören normale Stoffwechselprodukte ebenso wie Umwelteinflüsse, z. B. ultraviolette oder elektromagnetische Strahlung oder verschiedene Gifte. Eine Schädigung der DNA ist deshalb kein seltenes Ereignis, sondern im Gegenteil sehr häufig; so schätzt man, dass die DNA jeder Zelle täglich mehrere hunderttausend bis zu einer Million Mal diverse Schäden erleidet. So kann es u. a. zu Brüchen von Einzelstrang- oder Doppelstrang-DNA kommen oder zu abnormalen chemischen Bindungen zwischen DNA-Basen. Bei all diesen Veränderungen handelt es sich um keine Mutationen, denn die Basenfolge der DNA wird nicht verändert.

Die entstandenen Defekte können unterschiedliche Konsequenzen haben: Zum Beispiel können sie dazu führen, dass ein betroffenes Gen (→ Was ist ein Gen?) nicht mehr korrekt abgelesen werden kann oder dass eine Zelle die Fähigkeit verliert sich normal zu vermehren. Um solche permanent eintretenden Schädigungen zu beseitigen, verfügt jede Zelle über eine Reihe effektiver, hochspezialisierter Reparaturmechanismen. So gibt es Reaktionen, die chemische Veränderungen von DNA-Basen direkt erkennen und rückgängig machen. Weiters gibt es Reaktionen, die – falls ein DNA-Einzelstrang beschädigt ist – das defekte DNA-Stück ausschneiden und den normalen komplementären Strang als Vorlage nutzen, um das eliminierte DNA-Segment korrekt „nachzubauen“.

Auch zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen gibt es mehrere Möglichkeiten: so können komplementäre Basenfolgen an den freien Enden der Bruchstücke gepaart und davon ausgehend versucht werden, den ursprünglichen DNA-Doppelstrang wieder herzustellen; ein anderer Mechanismus beruht darauf, dass das homologe Chromosom (das Chromosom des anderen Elternteils) oder das bei der Zellteilung entstandene Schwesterchromatid als Reparaturvorlage herangezogen wird.

Die verschiedenen Reparaturmechanismen sind in den Zellen dauernd aktiv. Allerdings gelingt eine Reparatur nicht immer, sodass sich in der DNA mit der Zeit Fehler anhäufen. Dies kann zum Zelltod oder zur Inaktivierung einer Zelle führen. Da DNA-Defekte und eine fehlerhafte Reparatur auch Grundlage für Fehler bei der DNA-Synthese sein können, sind DNA-Schäden auch eine mögliche Ursache für eine Änderung der DNA-Sequenz und

damit von Mutationen (→ Was ist eine Mutation?). Diese können zu unkontrolliertem Zellwachstum und damit zur Entstehung eines bösartigen Tumors führen. Da sich mit der Zeit in der DNA jeder Zelle Fehler anhäufen, ist die Tumorentstehung auch eine Frage des Alters.

Es gibt eine Reihe angeborener Störungen der Reparaturmechanismen. Sie sind u. a. Ursache für ein erhöhtes Risiko für bestimmte Tumorerkrankungen, für eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber UV-Strahlen und für vorzeitiges Altern.

14. WAS VERSTEHT MAN UNTER EPIGENETIK?

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

- Die Gesamtheit der nicht in der DNA-Sequenz festgelegten Regulationsmechanismen, die die Aktivität von Genen beeinflussen, wird Epigenetik genannt.
- An der Steuerung beteiligt sind chemische Veränderungen an der DNA und an chromosomalen Proteinen, die über biochemische Mechanismen die Transkription beeinflussen und somit einen Einfluss darauf haben, ob und in welchem Ausmaß der Bauplan „aktiviert“ und zur Erstellung der Genprodukte herangezogen wird.
- Manche Gene sind permanent aktiv, da ihre Produkte für die Aufrechterhaltung des Basis-Stoffwechsels der Zellen notwendig sind.
- Andere Gene sind nur aktiv, wenn ihre Produkte zu einem bestimmten Zeitpunkt benötigt werden, und sie werden nach Erfüllen der Aufgabe wieder abgeschaltet.
- Langdauernde äußere Einflüsse, wie z. B. Klima, Sport, Dauerstress, Gefühle, Hunger oder ständige Überernährung, können offensichtlich dazu führen, dass die Genexpression dauerhaft verändert wird; das kann einerseits epigenetisch bedingte Erkrankungen verursachen, bietet aber andererseits auch die Chance, dass potentiell ungünstige Genanlagen blockiert werden können.

Für den Begriff der Epigenetik gibt es eine Reihe von Definitionen. Gemeint sind erbliche Veränderungen, die die Genexpression beeinflussen (→ Was versteht man unter Genexpression?), aber **nicht** durch die DNA-Sequenz festgelegt sind. Epigenetische Veränderungen können durch eine Reihe von Reaktionen zustande kommen. Am besten bekannt sind:

a. Chemische Veränderung der Histone

Die DNA liegt im Zellkern nicht in freier Form vor, sondern ist um Proteine, die Histone, „gewickelt“, von denen es verschiedene Untereinheiten gibt. Vier Paare dieser Untereinheiten bilden jeweils eine „Spule“, um die ein Stück DNA gewickelt ist. Die Einheit aus „Spule“ mit herum gewickelter DNA wird als Nucleosom bezeichnet. Die Nucleosomen sind wie die Perlen einer Kette aneinander gereiht; verbunden sind sie durch einen Faden bestehend aus DNA in Verbindung mit einem bestimmten Histon-Protein. Die Enden der Histone ragen aus dem Nucleosom heraus und sind deshalb für chemische Veränderungen zugänglich. Dabei gibt es chemische Veränderungen, die bewirken, dass die DNA des Nucleosoms „lockerer geschnürt“ wird und deshalb abgelesen (transkribiert) werden kann (z. B. Bindung von Acetylgruppen), es also zu einer Verstärkung der Genexpression kommt. Umgekehrt gibt es Reaktionen (bes. Bindung von Methylgruppen), die das Knäuel „fester schnüren“, sodass keine Ablesung der DNA möglich ist und die Genexpression unterdrückt wird.

b. Methylierung des Cytidin der DNA

Es gibt eine Reihe von Enzymen (Methyl-Transferasen), die Methylgruppen auf Cytosin der DNA übertragen und zwar dann, wenn ein Cytosin-Guanosin-Dinucleotid (also die Basenfolge CG) vorliegt. An so methylierte DNA kann sich Methyl-bindendes Protein anlagern, was in weiterer Folge die Inaktivierung eines Gens auslösen kann.

Alle Zellen eines Menschen tragen in ihrer DNA dasselbe Erbgut. Trotzdem ist unser Körper aus zahlreichen unterschiedlichen Zelltypen aufgebaut. Dass es zu dieser Vielfalt kommen kann, wird durch die Epigenese erklärt. Sie ist dafür verantwortlich, dass embryonale Stammzellen in die verschiedenen Körperzellen differenzieren und dass dann eine Zelle letztlich „weiß“, ob sie z. B. eine Hautzelle oder eine Muskelzelle ist. Davon abgesehen ist die Epigenese für eine Reihe anderer Vorgänge verantwortlich, z. B. für die X-Inaktivierung oder für das sogenannte Imprinting. Mit X-Inaktivierung bezeichnet man den Umstand, dass bei weiblichen Individuen (die ja über zwei X-Chromosomen verfügen) ein X-Chromosom „stillgelegt“ wird, sodass die Gesamt-Expression der X-chromosomalen Gene nicht höher ist als bei männlichen Individuen (die ja über ein X- und ein Y-Chromosom verfügen). Unter Imprinting versteht man den Umstand, dass ein bestimmter Chromosomenabschnitt immer nur

dann aktiv ist, wenn er von der Mutter vererbt wurde, in anderen Fällen nur, wenn er vom Vater vererbt wurde. Die Expression der entsprechenden Gene ist also durch das Geschlecht der Eltern fixiert.

Epigenetische Störungen werden mit Tumoren, mit einer ganzen Reihe anderer Erkrankungen und auch mit Problemen bei der in vitro-Fertilisation in Zusammenhang gebracht. Weiters gibt es experimentelle Daten, die den Schluss zulassen, dass langdauernde äußere Einflüsse, wie z. B. Klima, Sport, Dauerstress, Gefühle, Hunger oder ständige Überernährung dazu führen können, dass die Genexpression dauerhaft verändert wird und dadurch epigenetisch bedingte Erkrankungen entstehen können. So haben Kinder übergewichtiger Mütter ein deutlich erhöhtes Risiko ebenfalls übergewichtig zu werden. Man führt dies unter anderem darauf zurück, dass eine zu hohe Nahrungsaufnahme der Mutter während der Schwangerschaft beim Ungeborenen eine Fehlsteuerung im Bereich der Regulation der Nahrungsaufnahme bewirkt. Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass eine Übernährung des Ungeborenen epigenetische Veränderungen des Regelzentrums für das Hunger- bzw. das Sättigungsgefühl hervorruft. Eine Blockade der für die Produktion von Sättigungsmediatoren verantwortlichen Genregionen führt in diesen Fällen zu abnorm gesteigerter Nahrungsaufnahme.

Schließlich gibt es auch Hinweise, dass erworbene und erlernte Veränderungen sowie bestimmte Verhaltensweisen, die epigenetisch bedingt sind, vererbt werden können. Da bei der Keimzellreifung die epigenetischen Markierungen weitgehend gelöscht werden, ist großteils ungeklärt, wieso epigenetische Information überhaupt an die Nachkommenschaft übertragen werden kann. Allerdings gibt es erste Hinweise aus Tier- und Pflanzenstudien: so kann eine RNA-Form (siRNA) im Zellzyklus zur Zeit der DNA-Replikation (→ Was ist DNA (Desoxyribonucleinsäure)?) aktiv sein und epigenetische Information liefern, bestimmte RNAs können bei der Befruchtung der Eizelle mit dem Sperma übertragen werden und Veränderungen des Verhaltens und des Stoffwechsels an die Nachkommen vererben, und gelegentlich kann auch methylierte DNA dem Reprogrammierungsprozess entgehen.

15. WAS SIND GENETISCHE STÖRUNGEN?

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

- _ Veränderungen des in der DNA festgelegten Bauplans können zum Entstehen von genetisch bedingten Erkrankungen führen.
- _ Genetische Erkrankungen werden durch Defekte eines einzelnen Gens verursacht, während polygenetische Erkrankungen nur dann auftreten, wenn mehrere Gene verändert sind.
- _ Von jedem Gen werden zwei Allele vererbt, eines vom Vater und eines von der Mutter. Wenn ein Gendefekt schon dann zu einer Erkrankung führt, wenn nur ein Allel betroffen ist, spricht man von einem dominanten Erbgang dieses Defekts. Müssen beide Allele betroffen sein, damit die Erkrankung auftritt, spricht man von einem rezessiven Erbgang.

Genetisch bedingte Erkrankungen werden durch spezifische Veränderungen des Genoms (→ Was ist das humane Genom?) verursacht. Es kann sich dabei um angeborene oder erworbene Veränderungen handeln.

Man unterscheidet zwischen rezessiver und dominanter Vererbung.

Bei Erkrankungen mit rezessivem Erbgang erkrankt eine Person nur dann, wenn das entsprechende abnormale Gen von beiden Elternteilen vererbt wird. Wird das abnormale Gen nur von einem Elternteil vererbt, spricht man von einem Träger-Status („carrier“). Die betroffene Person ist in der Regel (weitgehend) gesund, kann das abnormale Gen aber an die Nachkommen vererben. Die meisten Erbkrankheiten werden rezessiv vererbt, gelegentlich ist ein Träger-Status entwicklungsgeschichtlich sogar von Vorteil.

Bei Erkrankungen mit dominantem Erbgang genügt schon die Vererbung des abnormalen Gens von einem Elternteil, um die Erkrankung manifest werden zu lassen.

Monogenetische Erkrankungen werden durch die Störung eines einzigen Gens verursacht. Die Zahl derartiger Erkrankungen wird auf rund 10.000 geschätzt. Allerdings treten die meisten Erkrankungsformen extrem selten auf, und es sind nur einige wenige (z. B. die Sichelzellerkrankung), die weltweit den Großteil der Fälle ausmachen. Etwa 1 % aller Neugeborenen sind von monogenetischen Defekten betroffen. Es ist allerdings meist nicht der Fall, dass eine bestimmte Erkrankung

nur durch einen einzigen Defekt eines bestimmten Gen verursacht werden kann, sondern oft ist es so, dass unterschiedliche Mutationen eines Gens dasselbe oder ein ähnliches Krankheitsbild hervorrufen können. Zum Beispiel sind als Ursache der Cystischen Fibrose über 500 Mutationen bekannt. Das ist auch eine Erklärung dafür, dass bestimmte monogenetische Erkrankungen in verschiedenen Schweregraden auftreten.

Polygenetische Erkrankungen werden durch das Zusammenwirken mehrerer Gene ausgelöst. Oft besteht bei diesen Erkrankungen eine familiäre Häufung. Viele sehr verbreitete Erkrankungen wie die Zuckerkrankheit, Bluthochdruck, Herzerkrankungen, Osteoporose oder Fettleibigkeit werden dieser Erkrankungsgruppe zugeordnet. Dabei ist es meist schwierig zu sagen, in welchem Maße ein bestimmtes der beteiligten Gene bzw. welche Genkombination für die Auslösung der Erkrankung verantwortlich ist. Oft sind es auch Gene und Genkombinationen, die über völlig verschiedene Stoffwechselwege wirken. Hinzu kommt, dass Umweltfaktoren und Lebensstil zum Teil wesentlich darauf Einfluss haben, ob eine bestimmte Person letztlich erkrankt. Zur Zeit werden große Forschungsanstrengungen unternommen, um individuelle Risikoschätzungen für bestimmte Erkrankungen abgeben zu können, sodass bei einer entsprechenden genetischen Veranlagung rechtzeitig gegengesteuert werden kann.

Abgesehen von erblichen Erkrankungen sind auch die meisten Krebsformen polygenetisch bedingt.

Bei **Chromosomenaberrationen** sind ganze Chromosomen (→ Was sind die Chromosomen des Menschen?) oder große, mikroskopisch erkennbare Teile von Chromosomen betroffen. Man unterscheidet zwischen numerischen und strukturellen Aberrationen. Bei der ersten Gruppe sind ganze Chromosomen zu häufig vorhanden oder fehlen. Das bekannteste Beispiel ist das Down-Syndrom (Mongolismus), bei dem drei anstelle der zwei normalen Chromosomen 21 vorliegen (Trisomie 21).

Strukturelle Aberrationen sind durch ausgedehnte Änderung der Chromosomenstruktur charakterisiert. Zum Beispiel können Teile von Chromosomen ihre Position wechselseitig tauschen (Translokation). So ist die häufigste Ursache für eine chronisch myeloische Leukämie die Umwandlung des normalen Chromosoms 22 zum sog. Philadelphia-Chromosom, das durch Austausch von Chromosomenmaterial zwischen den Chromosomen 9 und 22 entsteht.

16. WAS VERSTEHT MAN UNTER GENETISCHER DIAGNOSTIK?

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

- Die Untersuchung des Erbgutes im Hinblick auf einen von der Norm abweichenden Aufbau wird als Genetische Diagnostik bezeichnet.
- Im Rahmen von DNA-Untersuchungen wird überprüft, ob die richtigen DNA-Bausteine, die Nucleotide, jeweils an ihren korrekten Positionen in die DNA eingebaut sind. Falls eine oder mehrere Veränderungen in der Nucleotid-Abfolge festgestellt werden, wird weiters untersucht, ob diese ursächlich mit einer Erkrankung oder mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko verbunden sind.
- Um genetisch bedingte Erkrankungen frühzeitig festzustellen, können bereits an Embryos DNA-Untersuchungen durchgeführt werden (Präimplantations-, Polkörperchen- und Pränataldiagnostik).
- Nach der Geburt werden DNA-Untersuchungen im wesentlichen zur Diagnose schon bestehender Erkrankungen, zur Feststellung des Risikos für das Auftreten von Erkrankungen und in der Vaterschaftsdiagnostik durchgeführt.

Eine genetische Untersuchung kann im Prinzip verschiedene Komponenten des Erbgutes betreffen, doch meint man mit dem Begriff „genetische Diagnostik“ im wesentlichen DNA-Untersuchungen zur Feststellung einer bestimmten Eigenschaft oder Anlage. Die genetische Diagnostik wird für verschiedenste Fragestellungen eingesetzt, z. B. für Abstammungsuntersuchungen, in der Kriminalistik oder für Lebensmitteluntersuchungen. In der Medizin dient die genetische Diagnostik der Feststellung ererbter und erworbener genetischer Erkrankungen und Anlagen. Nach dem Zeitpunkt der Untersuchung ist zu unterscheiden zwischen

Präimplantationsdiagnostik

Unter Präimplantationsdiagnostik versteht man die genetische Untersuchung eines durch in vitro-Fertilisation (Verschmelzung von Ei- und Samenzelle im Reagenzglas) entstandenen Embryos vor der Einpflanzung in die Gebärmutter. Sie wird meist durchgeführt, wenn der Embryo drei Tage alt ist und aus sechs bis zehn Zellen besteht. Es werden dann meist ein bis zwei Zellen zur Untersuchung auf bestimmte Erbkrankheiten entnommen. Es können damit sowohl von der Mutter als auch vom Vater vererbte genetische Merkmale und

Störungen diagnostiziert werden. In die Gebärmutter werden in weiterer Folge nur gesunde Embryonen eingesetzt. Die Präimplantationsdiagnostik zur Feststellung einer Erbkrankheit ist in Österreich seit einer Gesetzesnovelle im Februar 2015 unter bestimmten Umständen erlaubt.

Polkörperchendiagnostik

Bei der Polkörperchendiagnostik werden im Rahmen der in vitro-Fertilisation nach Eindringen des Spermiums in die Eizelle, aber noch vor Verschmelzen des Erbgutes der Keimzellen, die Polkörperchen entnommen, die im Rahmen der Reifeteilung der Eizelle entstehen. Polkörperchen werden gebildet, weil sich die Eizelle bei ihren zwei Reifungsteilungen nicht symmetrisch teilt, sondern jeweils in eine große plasmareiche Zelle und in eine wesentlich kleinere plasmaarme, Polkörperchen genannt. Die Polkörperchen sterben später ab, enthalten aber das gleiche genetische Material wie die „große“ Eizelle und können daher zur Untersuchung auf genetische Defekte der Mutter (aber nicht des Vaters, da kein Spermienmaterial erfasst wird) herangezogen werden.

Pränatale Diagnostik

Hierbei sind heute zwei Verfahren zur Gewinnung des Untersuchungsmaterials üblich, die Amniozentese und die Chorionzottenbiopsie. Die Fetalblutuntersuchung, bei der die Nabelschnur zur Gewinnung von Nabelschnurblut durch die Bauchdecke der Schwangeren unter Ultraschallkontrolle punktiert wird (Cordozentese), ist etwa ab 20. Schwangerschaftswoche möglich, wird heute aber selten angewandt. Alle Methoden sind mit dem Risiko eines Spontanabortes (etwa 0,5–2 %) und mit einer Reihe anderer Komplikationen belastet. Bei der Amniozentese wird die Fruchtblase zur Gewinnung von Fruchtwasser und der darin enthaltenen fetalen Zellen punktiert. Der Eingriff erfolgt in der Regel ab der 14. Schwangerschaftswoche unter Ultraschallkontrolle. Bei der Chorionzottenbiopsie werden Plazentaanteile (Chorionzotten) transabdominal oder transzervikal unter Ultraschallkontrolle entnommen; da die Chorionzotten aus derselben Vorläuferzelle wie der Foetus entstehen, sind sie in der Regel mit diesem genetisch identisch. Die Chorionzottenbiopsie wird meist ab der 10. Schwangerschaftswoche durchgeführt.

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass Bruchstücke der **fetalen DNA im Blut der schwangeren Mutter** zirkulieren. Dieses Material ist durch eine einfache Blutabnahme – also für die Schwangerschaft praktisch risikolos – zu gewinnen. Zur Zeit gibt es eine Reihe kommerzieller Tests auf Chromosomenanomalien, die so gewonnene DNA als Untersuchungsmaterial verwenden.

Postnatale Diagnostik

Als Ausgangsmaterial zur DNA-Gewinnung kann im Prinzip jedes Gewebe dienen, das Zellen mit Zellkernen enthält. Gängige Materialien sind Blut, Speichel, diverse Abstriche oder Haare.

Mit der medizinischen DNA-Diagnostik möchte man im wesentlichen folgendes feststellen:

- _ Die Ursache für eine manifeste ererbte Erkrankung;
- _ Die Prädisposition für eine (möglicherweise zukünftig ausbrechende) Erkrankung;
- _ Den Überträgerstatus für eine genetische Erkrankung;
- _ Genetische Eigenschaften, die medizinisch relevant sind (z. B. für die Stoffwechselung von Medikamenten).

Bei den eingesetzten Untersuchungsverfahren ist zu unterscheiden, ob man gezielt ein bestimmtes Gen untersucht oder eine Vielzahl von Genen.

Bei den monogenetischen Störungen ist zu unterscheiden, ob sie ausschließlich durch eine einzige definierte Mutation verursacht werden oder ob unterschiedliche Mutationen zum selben oder einem ähnlichen Bild führen. Dem entsprechend muss man am Gen eine oder mehrere Positionen gezielt untersuchen; gelegentlich ist es zweckmäßig oder unumgänglich das gesamte Gen zu sequenzieren. Es gibt auch eine Reihe von Methoden, um vor einer möglichen Sequenzierung zu untersuchen, ob der Aufbau eines bestimmten DNA-Segmentes abnormal ist, doch treten diese Methoden wegen des Fortschrittes bei der Sequenzieretechnik eher in den Hintergrund.

Bei den polygenetischen Störungen ist die Situation wesentlich komplexer, da eine Vielzahl von Genen mit teils unterschiedlichen Funktionen untersucht werden muss. So sind z. B. über 50 Allele (→ Was ist ein Allel?) bekannt, die sich auf die Knochendichte auswirken; neben solchen, die mit dem Knochenabbau zu tun

haben, finden sich darunter auch ganz andere, von denen nicht klar ist, auf welche Weise sie auf die Knochenfestigkeit Einfluss nehmen.

Die Möglichkeit polygenetische Störungen rechtzeitig zu erkennen, ist epidemiologisch von großer Bedeutung, da es sich hier – im Gegensatz zu monogenetischen Erkrankungen – um sehr häufige Erkrankungsbilder handelt. Zur Analyse gib es heute Verfahren, die eine große Zahl von DNA-Stücken, bis hin zum gesamten Genom (→ Was ist das humane Genom?) parallel sequenzieren können. Eine wesentliche Herausforderung besteht in der Verarbeitung der generierten sehr großen Datenmengen mit Methoden der Bioinformatik und in der Interpretation des Befundes.

17. WAS VERSTEHT MAN UNTER GENTHERAPIE?

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

– Unter Gentherapie versteht man den Einsatz verschiedener Methoden mit dem Ziel, die Auswirkungen genetischer Defekte auszugleichen. Häufig geschieht das durch Einbringen normaler DNA in Zellen eines Patienten, sodass die Entstehung regulärer Genprodukte ermöglicht wird und die Ursache für bestimmte Erkrankungen wegfällt.

Unter Gentherapie versteht man im Allgemeinen das Einbringen von Nucleinsäuren (DNA, RNA) in Zellen zur Behandlung einer genetischen Störung. Aus ethischen Gründen ist eine solche Therapie bei Keimzellen verboten, sodass vorgenommene Änderungen der Erbgutes nicht an die Nachkommenschaft weitergegeben werden können.

Bis 2010 wurden über 1500 klinische Studien zur Anwendung der Gentherapie genehmigt. Bei der **klassischen Gentherapie** geht es um die Behandlung monogenetischer Erkrankungen. Im Allgemeinen wird dabei versucht, ein defektes Gen durch ein funktionierendes Gen zu ersetzen, das man in Körperzellen einbringt. Dies geschieht meist, indem man dem Patienten Zellen entnimmt, sie genetisch verändert und dann die korrigierten Zellen retourniert. Eine andere Möglichkeit besteht darin, das Einbringen des therapeutisch wirksamen Gens direkt am Patienten durchzuführen.

Für das Einschleusen eines Gens werden oft modifizierte Viren als Träger verwendet, es stehen aber auch

chemische und physikalische Methoden zur Verfügung. Je nach Art der Gentherapie kann die genetische Information in das Erbgut der Zelle dauerhaft eingebaut werden oder nur vorübergehend in der Zelle vorhanden sein.

Eine neue, erst im Versuchsstadium befindliche Therapiemöglichkeit, in der es in erster Linie darum geht, die Expression krankheitsverursachender Gene herabzusetzen oder zu verhindern, beruht auf der sogenannten **RNA-Interferenz**. Man nutzt hier einen natürlicher Mechanismus, durch den mRNA (→ Was ist RNA (Ribonucleinsäure)?) mit Hilfe kleiner RNA-Moleküle (siRNA; small interfering RNA) zerstört oder funktionell gehemmt wird.

Neben der gezielten Hemmung oder Ausschaltung von Genen besteht auch die umgekehrte Möglichkeit, nämlich blockierte Gene mit Hilfe von künstlichen, gegen bestimmte RNA-Moleküle gerichteten kleinen Oligonucleotiden (Antagomiren) zu reaktivieren.

Mit Hilfe RNA-basierter Ansätze hofft man, künftig auch polygenetische Erkrankungen, z. B. Tumorerkrankungen, günstig beeinflussen zu können.

II. SPEZIELLE FRAGESTELLUNGEN

1. WELCHE KLINISCHE KONSEQUENZ KÖNNEN MONOGENETISCHE VERÄNDERUNGEN HABEN?

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

- _ Eine Störung im Aufbau der DNA kann ein bestimmtes Protein-codierendes Gen, also den Bauplan für ein definiertes Protein, betreffen und so Ursache für eine monogenetische Erkrankung sein.
- _ Es sind zwar zahlreiche monogenetische Erkrankungen beschrieben, aber nur wenige sind verbreitet.
- _ Von monogenetischen Veränderungen können auch Proteine betroffen sein, die die Wirkung von Medikamenten beeinflussen. Das kann dazu führen, dass bestimmte Medikamente nicht ausreichend wirksam sind oder in hohem Maße Nebenwirkungen verursachen.

Mit genetisch determinierten Erkrankungen wird allgemein ein weites Spektrum von Störungen bezeichnet, die durch eine oder mehrere (ungünstige) Gen-Eigenschaften verursacht werden. Formal bilden das eine Ende des Spektrums die sogenannten monogenetischen Erkrankungen, auf der anderen Seite stehen komplexe genetische Störungen. Davon abgesehen können Genvarianten Einfluss auf die Verstoffwechselung von Medikamenten und damit auf ihre Wirksamkeit haben.

a. Monogenetische Erkrankungen

Monogenetische Störungen sind auf den Defekt eines einzelnen Gens zurückzuführen; der Defekt bedingt das Auftreten der Erkrankung. Allerdings ist folgendes zu berücksichtigen:

- _ Dieselbe oder sehr ähnliche Erkrankungen können durch unterschiedliche Mutationen ein und desselben Gens verursacht werden, haben also molekularbiologisch verschiedene Ursachen (→ Was sind Genetische Störungen?), und
- _ Ein und derselbe Gendefekt kann bei verschiedenen Menschen ein unterschiedlich schweres Krankheitsbild hervorrufen. Ursache sind u. a. der verstärkende oder abmildernde Einfluss anderer Gene und epigenetische Veränderungen (→ Was versteht man

unter Epigenetik?). Dadurch wird einerseits der individuelle genetische Aufbau jedes Menschen reflektiert (→ Wie unterscheidet sich die DNA verschiedener Menschen?), andererseits sind populationsspezifische Haplotypen (das sind z. B. bestimmte SNP-Muster) bekannt, die trotz identischer Mutation des krankheitsauslösenden Gens den Schweregrad der Erkrankung in einer Bevölkerungsgruppe moderieren; so gibt es z. B. bei der Sichelzellerkrankung Haplotypen (Typ Senegal, Typ Bantu u. a.), die möglicherweise über unterschiedliche Expression von fetalem Hämoglobin (Hb F) den Schweregrad der Sichelzellerkrankung beeinflussen.

Monogenetische Erkrankungen werden also durch einen spezifischen Gendefekt ausgelöst, andere Gene sind eher „zweitrangig“, können aber den Krankheitsverlauf mitbestimmen.

Man kennt rund 10.000 monogenetische Erkrankungen, allerdings sind nur einige wenige verbreitet, die meisten sind selten (→ Was sind Genetische Störungen?).

Abgesehen von der Diagnose von Erkrankungen sind monogenetische Veränderungen auch für das Ansprechen auf bestimmte Medikamente von Bedeutung. Dazu drei Beispiele:

b. Einfluss auf die Medikamentenwirkung

Tamoxifen ist ein Medikament, dass oft bei der Behandlung von Östrogenrezeptor-positivem Brustkrebs eingesetzt wird. Bei dieser häufigen Krebsform bilden die Zellen ein Übermaß an Andockstellen für Östrogen; durch die Östrogenbindung wird das Tumorwachstum angeregt. Tamoxifen wirkt, indem es den Östrogenrezeptor blockiert, dadurch die Bindung von Östrogen verhindert und so das Tumorwachstum hemmt. Allerdings wirkt Tamoxifen nicht direkt, sondern muss nach der Einnahme verstoffwechselt werden. Die dabei entstehenden Produkte (4-Hydroxy-Tamoxifen und 4-Hydroxy-N-Desmethyl-Tamoxifen) sind die eigentlich wirksamen Substanzen. Die Umwandlung in diese aktiven Metaboliten erfolgt vorwiegend in der Leber durch das Enzym

Cytochrom P450 2D6 (CYP2D6). Von diesem Enzym gibt es über 100 genetische Varianten mit teils sehr unterschiedlicher Enzymaktivität (von fehlend bis stark erhöht). Etwa 5–10 % der mitteleuropäischen Bevölkerung zeigen eine deutlich verminderte oder fehlende Verstoffwechselung von Tamoxifen, die teilweise auf CYP2D6-Varianten zurückgeht.

Die Forschungen sind zwar noch im Gang, aber die Datenlage spricht zunehmend dafür, dass die Gen-Typisierung von CYP2D6 sinnvoll ist um Patientinnen zu erkennen, die auf die Standarddosierung von Tamoxifen nicht ausreichend ansprechen, sodass eine alternative Medikation (Aromatasehemmer) oder eventuell eine höhere Tamoxifen-Dosierung gewählt werden sollten.

Clopidogrel (Plavix®) ist ein sehr häufig verschriebenes Medikament, das eingesetzt wird, um die Blutgerinnungsneigung durch Hemmung der Thrombozytenaggregation zu vermindern. Wichtige Indikationen sind u. a. der Herzinfarkt, Stents oder der Schlaganfall. Damit Clopidogrel wirken kann, muss es in der Leber über eine Zwischenstufe in seinen aktiven Metaboliten umgewandelt werden. An diesem Vorgang sind eine Reihe von Enzymen beteiligt, wobei dem Enzym CYP2C19 eine wichtige Rolle zukommt. Von diesem Enzym gibt es an die 30 Genvarianten, von denen einige eine verminderte oder fehlende Stoffwechselaktivität zeigen. Bei diesen Varianten ist die Wirkung von Clopidogrel herabgesetzt und der Behandlungserfolg schlechter. Etwa 25 % der US-Bürger europäischer Herkunft sind Träger solcher Varianten in homozygoter oder doppelt heterozygoter Form. Eine beschriebene Variante zeigt eine erhöhte Aktivität, sodass Clopidogrel hier bei Standarddosierung eine zu starke Wirkung entfalten und damit das Blutungsrisiko erhöhen kann. Mit Hilfe der CYP2C19-Genotypisierung kann man also entscheiden, ob eine Clopidogrelgabe überhaupt sinnvoll ist oder ob andere Präparate eingesetzt werden sollten, aber auch ob das Risiko einer unerwartet starken Medikamentenwirkung besteht.

Statine sind eine Medikamentengruppe, die die körpereigene Cholesterinbildung hemmen und so zu einer Senkung des Cholesterinspiegels führen; daneben wird ihnen auch eine Stabilisierung von atherosklerotischen Ablagerungen (Plaques) über entzündungshemmende Mechanismen zugeschrieben; solche Ablagerungen brechen dann nicht so leicht auf, und dadurch wird das Risiko für einen akuten Gefäßverschluss, z. B. für einen Herzinfarkt, vermindert.

Zu den unerwünschten Wirkungen von Statinen gehören Muskelbeschwerden, die bei etwa 10 % der Patienten auftreten. Dabei handelt es sich meist um leichte bis mäßige Muskelschmerzen und -krämpfe mit einer in Labortests nachweisbaren Muskelschädigung. Es sind aber auch mehrere tausend schwerste Verläufe mit massiver Zerstörung der Skelettmuskulatur und tödlichem Ausgang beschrieben. Seit 2012 hat die amerikanische Gesundheitsbehörde (FDA) deshalb verfügt, dass im Medikamentenbeipack auf die Möglichkeit dieser muskelzerstörenden Nebenwirkung (immune-mediated necrotizing myopathy) hingewiesen werden muss.

Um ihre Wirkung zu entfalten, müssen Statine aus dem Blut in die Leberzellen aufgenommen werden. Dies erfolgt mit Hilfe eines in der Leberzellwand befindlichen Transportproteins (OATP1B1). Der Bauplan für dieses Protein ist durch das SLC01B1-Gen vorgegeben. Von diesem Gen gibt es eine ganze Reihe von Varianten, die jeweils geringe Unterschiede im Aufbau des OATP1B1-Transportproteins bedingen. Besonders eine bestimmte Variante (5*-Variante; Val174Ala; SNP rs4149056), die in der europäischen Bevölkerung mit einer Häufigkeit von etwa 18 % vorkommt, führt dazu, dass die Aufnahme von Statin in die Leber deutlich vermindert wird. Die Folge sind erhöhte Statin-Blutspiegel und somit u. a. eine erhöhte Statin-Exposition von Muskelzellen. Nach heutiger Ansicht ist das die wichtigste Ursache für die beschriebenen Muskelschmerzen und -schäden.

Durch einen einfachen Gentest kann man heute feststellen, ob ein Patient Träger der 5*-Risikovariante ist. Bei Personen, die diese Variante von beiden Elternteilen geerbt haben, ist das Risiko für Muskelbeschwerden und -schädigungen besonders hoch.

Für Patienten mit der 5*-Variante gibt es eine Reihe von Therapieempfehlungen, über initiale Dosisanpassung bis zur Wahl nebenwirkungsärmerer Statine. Dadurch kann zweierlei erreicht werden:

- _ Eine Verminderung des Risikos für – unter Umständen – schwerste Muskelschäden und
- _ Eine bessere Compliance (regelmäßigere Medikamenteneinnahme), da den Patienten ihr erhöhtes Cholesterin oft „lieber ist“ als Muskelbeschwerden in Kauf zu nehmen und sie deshalb dazu neigen, ihr Statin unregelmäßig einzunehmen oder abzusetzen, oft ohne den behandelnden Arzt darüber zu informieren.

2. WIE KÖNNEN SICH POLYGENETISCHE VERÄNDERUNGEN KLINISCH AUSWIRKEN?

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

- _ Bei der Entstehung vieler sehr häufiger Erkrankungen, z. B. bei der koronaren Herzkrankheit, der Zuckerkrankheit, der Osteoporose oder bei Fettstoffwechselstörungen, spielen Veränderungen an mehreren Genen eine Rolle. Diese Erkrankungen haben also einen polygenetischen Hintergrund.
- _ Das tatsächliche Auftreten einer solchen Erkrankungen kann auch durch epigenetische, die Genexpression betreffende Faktoren beeinflusst werden.

Bei polygenetischen Erkrankungen tritt der Einfluss eines einzelnen Gen-Polymorphismus oder einer einzelnen Gen-Mutation in den Hintergrund; das Auftreten der Erkrankung ist Ausdruck des Zusammenspiels zahlreicher Gene und anderer Einflussfaktoren, die sowohl einen krankheitsverstärkenden als auch einen protektiven Effekt haben können. Der Einfluss eines einzelnen Gens auf das Erkrankungsrisiko ist meist gering, sodass mehrere Gene gemeinsam beurteilt werden müssen. Sofern eine Gen-Variante den Aufbau eines Proteins verändert, kann dieses per se nicht als krankheitsauslösend angesehen werden, sondern trägt unter Umständen ein wenig zum Erkrankungsrisiko bei; viele der festgestellten genetischen Veränderungen betreffen überhaupt keine codierenden Regionen, verändern also nicht den Aufbau eines Proteins, sondern dürften über Einflussnahme auf die Genexpression (→ Was versteht man unter Genexpression?) wirken.

Ziel der genetischen Untersuchung bei polygenetisch bedingtem Krankheitsrisiko ist im Allgemeinen nicht die Diagnose einer bereits bestehenden Erkrankung, sondern die Feststellung der Prädisposition für eine bestimmte Erkrankung, um so früh als möglich gegensteuern zu können. Es geht also darum, mögliche „Schwachstellen“ rechtzeitig aufzudecken. Die genetische Veranlagung ist meist nicht schicksalhaft, sondern es besteht oft die Möglichkeit durch Änderung des Lebensstils und Vorsorge das reale Erkrankungsrisiko günstig zu beeinflussen.

Polygenetische Erkrankungen gehören zu den häufigsten Erkrankungen überhaupt: Beispiele sind die Osteoporose, die koronare Herzkrankheit, der Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörungen, Tumorerkrankungen, die Alzheimer-Erkrankung u. a. m.

3. AUF WELCHEN UNTERSUCHUNGEN BASIEREN DIE ANGABEN ZUM GENETISCHEN ERKRANKUNGSRISIKO?

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

- _ Im Rahmen von Assoziationsstudien werden Zusammenhänge zwischen genetischen Veränderungen und verschiedenen Erkrankungen untersucht.
- _ Im „Kandidatengen-Ansatz“ wird untersucht, ob genetische Veränderungen an einem oder mehreren ausgewählten Genen bei Patienten, die an einer bestimmten Krankheit leiden, öfter auftreten als bei Personen, die diese Erkrankung nicht haben.
- _ Im „Genomweiten Ansatz“ werden große Teile der DNA oder sogar das gesamte Genom von Patienten mit einer bestimmten Erkrankung mit dem entsprechenden Erbgut von Gesunden verglichen. Im Gegensatz zum „Kandidatengen-Ansatz“ erfolgt hier keine Vorauswahl bestimmter Gene.
- _ Das Ziel derartiger Studien ist es, einen Zusammenhang genetischer Merkmale mit dem Auftreten von Erkrankungen zu finden und so bestimmte genetische Eigenschaften als Risikofaktoren für das Auftreten von Erkrankungen zu definieren.

Der „klassische“ Ansatz ist die Untersuchung sog. **„Kandidatengene“** (candidate gene approach). Dabei werden Gene gewählt, von denen vermutet wird, dass zwischen ihnen und einer bestimmten Erkrankung (oder einer bestimmten Eigenschaft) eine Beziehung besteht. Es werden dann meist zwei Gruppen gebildet, z. B. gesunde und erkrankte Personen, und es wird untersucht, ob es eine Variante oder mehrere Varianten des untersuchten Gens gibt, die statistisch gehäuft mit der Erkrankung assoziiert sind. Der Vorteil der Methode ist, dass zielgerichtet relevante Gene untersucht werden, der Nachteil, dass eben nur solche Gene einbezogen werden, von denen aufgrund des aktuellen Wissensstandes vermutet wird, dass sie bei der jeweiligen Erkrankung eine Rolle spielen könnten.

In den letzten Jahren werden zunehmend **genomweite Assoziationsstudien (Genome Wide Association Studies, GWAS)** durchgeführt. Das Prinzip dabei ist folgendes:

Die genetischen Unterschiede zwischen den Menschen, somit auch das Risiko bestimmte Erkrankungen zu entwickeln, sind im Erbgut begründet. Wie unterscheidet sich nun das Erbgut, die DNA, zweier Menschen? Wie

erwähnt sind die Unterschiede gering; im Durchschnitt sind nur etwa 0,1–0,5 % der DNA-Bausteine verschieden, das entspricht allerdings über 3 Millionen Basen pro Chromosomensatz (→ Wie unterscheidet sich die DNA verschiedener Menschen?). Zieht man alle Möglichkeiten in Betracht, so gibt es insgesamt an die 30 Millionen Positionen in der DNA des Menschen, die sich in einer der vier DNA-Basen unterscheiden können. Diese Varianten einzelner Basenpaare werden als **Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)** bezeichnet (→ Was ist ein Gen?).

Durch aufwendige internationale Studien (HapMap Project, 1000 Genome Project) war es in den letzten Jahren möglich, einen großen Teil dieser SNPs zu identifizieren und auf dieser Basis genomweite Assoziationsstudien durchzuführen. Dabei handelt sich um großangelegte Untersuchungen mit meist 10.000den Teilnehmern; praktisch sind diese Studien erst seit 2005 möglich und durch den enormen technischen Fortschritt und die massive Kostensenkung bei der Sequen-

zierung großer DNA-Regionen bis hin zum gesamten Genom durchführbar.

Das Studienprinzip ist einfach: es werden zwei Gruppen gebildet, eine Gruppe von Personen, die z. B. eine bestimmte Krankheit haben und eine Vergleichsgruppe, die gesund ist. Die DNA jedes Teilnehmers der beiden Gruppen wird auf das Vorhandensein einer Vielzahl von SNPs getestet und dann wird untersucht, ob sich bestimmte SNPs in der Gruppe der Erkrankten statistisch signifikant häufiger finden als in der Vergleichsgruppe. Abb. 8a zeigt die chromosomale Lokalisation aller bis Ende 2013 identifizierten SNPs, die sich bei verschiedenen Erkrankungen (jede Krankheit in einer anderen Farbe) hoch signifikant häufiger finden als bei Personen ohne diese Erkrankung; Abb. 8b zeigt selektiv die SNPs, die mit kardiovaskulären Erkrankungen in Zusammenhang stehen.

Der Vorteil der Methode ist, dass sie „vorurteilsfrei“ an die Untersuchung herangeht, also nicht im voraus DNA-

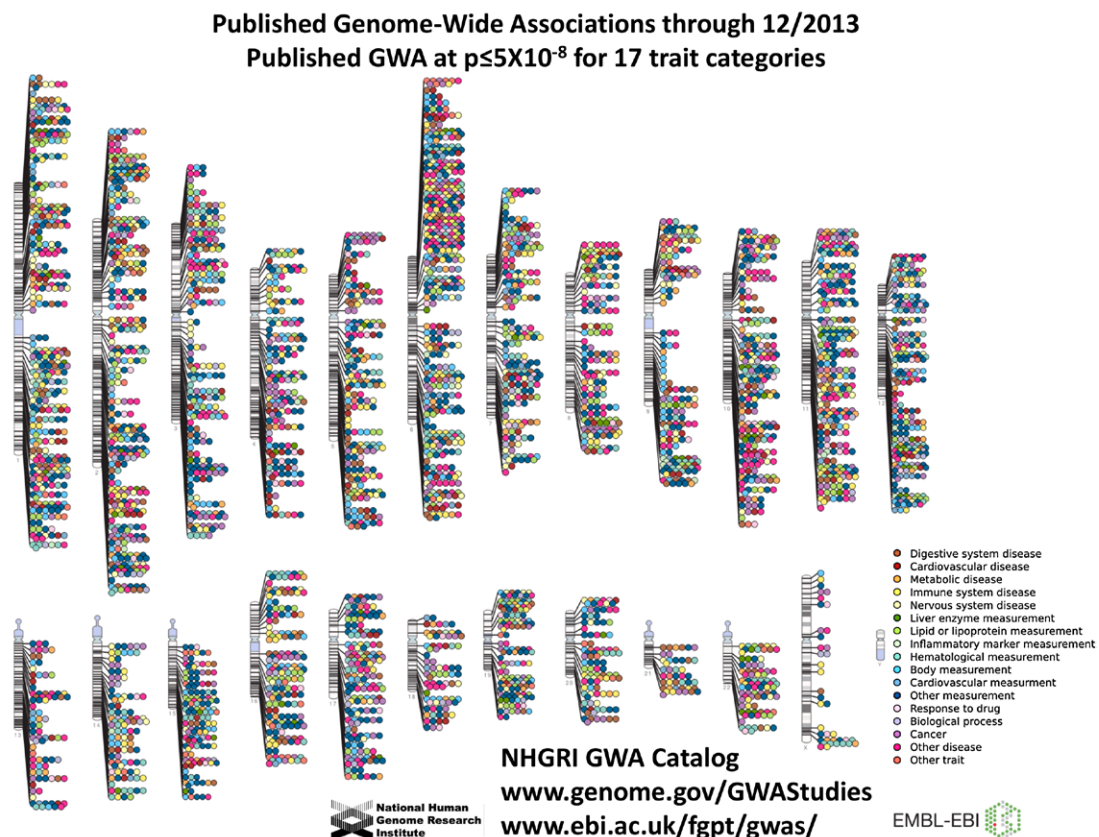


Abb. 8a

Cardiovascular disease GWA



Abb. 8b

Abschnitte ausgewählt werden, deren Untersuchung „logisch“ erscheint. Auf diese Weise wurden Zusammenhänge aufgedeckt, die völlig unbekannt waren. Nachteile sind, dass der Effekt von krankheitsverursachenden, aber seltenen Varianten bei der Auswertung untergehen kann, und dass das gehäufte Auftreten einer bestimmten Variante in der Gruppe der Erkrankten nur aussagt, dass eine Assoziation dieser Variante zur Erkrankung besteht, nicht aber welcher Mechanismus dem zugrunde liegt. Schließlich sind GWAS zur Zeit vorwiegend auf SNPs beschränkt und beziehen andere genetische Veränderungen, z. B. copy number variations, meist nicht ein.

Die Aussagekraft von GWAS kann weiter gesteigert werden, indem die Daten mehrerer solcher Studien gepoolt werden (sog. large-scale meta-analyses). Sobald bestimmte Varianten im Zusammenhang mit einer Erkrankung identifiziert sind, wird oft untersucht, ob diese global oder nur in bestimmten Populationen, z. B. bei Europäern oder Südasianen, statistisch gehäuft vorkommen.

Eine auf GWAS aufbauende Entwicklung sind genomweite Expressions-Assoziationsstudien (eGWAS). Dabei werden die Daten für die unterschiedliche Häufigkeit von SNPs mit den Daten der Expression einer großen Anzahl von mRNAs (→ Was ist RNA (Ribonucleinsäure)?) verglichen, mit dem Ziel festzustellen, welche SNPs bzw. welche Kombination von SNPs Einfluss auf die Expression krankheitsrelevanter Gene haben.

Ein anderes Gebiet sind GWAS zur Feststellung genetischer Unterschiede im Zusammenhang mit der Ausprägung normaler Eigenschaften, z. B. dem Gedächtnis.

4. WIE SICHER IST DER REALE ZUSAMMENHANG ZWISCHEN EINEM SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMUS UND EINER ERKRANKUNG, FÜR DIE IN EINER GENOMWEITEN STUDIE EINE ASSOZINATION MIT DEM BETREFFENDEM SNP GEFUNDEN WURDE?

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

Mathematische Berechnungen machen es äußerst wahrscheinlich, dass (noch) gesunde Menschen, die für eine definierte Erkrankung typische, in genetischen Assoziationsstudien gefundene, genetische Veränderungen aufweisen, ein höheres statistisches Risiko haben diese Erkrankung zu entwickeln als Personen ohne diese genetischen Veränderungen.

Der Zusammenhang ist sehr sicher. Im HapMap-Projekt werden krankheits-assoziierte SNPs nur aufgelistet, wenn ihr p-Wert kleiner 10^{-5} ist, wenn also die Wahrscheinlichkeit, dass der gefundene Zusammenhang nur auf einem Zufall beruht, kleiner als 1:100.000 ist. Vielfach ist der festgestellte p-Wert noch um ein Vielfaches kleiner, die Irrtumswahrscheinlichkeit also um viele Zehnerpotenzen geringer. Hinzu kommt, dass der aufgedeckte Zusammenhang oft durch eine oder mehrere unabhängige Untersuchungen bestätigt ist.

5. KANN MAN DAS PERSÖNLICHE GENETISCHE RISIKO FÜR EINE BESTIMMTE ERKRANKUNG ZAHLENMÄSSIG ANGEBEN?

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

Man kann das persönliche lebenslange genetische Risiko berechnen. Die Angabe erfolgt oft in %, aber auch in Kategorien wie „niedrig“, „mittel“ und „hoch“.

Ja, die Angabe erfolgt im Allgemeinen in Form des **persönlichen** lebenslangen genetischen Risikos und wird dem **durchschnittlichen** lebenslangen genetischen Risiko gegenübergestellt. Die Angabe erfolgt meist in Prozent. Auch kann das Risiko in Kategorien, z. B. „niedrig“, „mittel“ und „hoch“, angegeben werden.

Der Risikowert hängt einerseits von den SNPs ab, die in die Berechnung eingehen und reflektiert somit den aktuellen Wissensstand. Andererseits spielen die mathematischen Modelle eine Rolle; z. B. macht es

einen Unterschied, ob und wie der Einfluss von sich gegenseitig beeinflussender Genvarianten berücksichtigt wird. Weiters kann es eine Rolle spielen, ob sich die Vergleichsangaben auf globale Untersuchungen oder auf Untersuchungen von bestimmten Bevölkerungsgruppen (z. B. von Europäern) beziehen. Zum Teil wird auch versucht, die Risikoschätzung durch Einbeziehung nicht genetischer Daten (Familienanamnese, klinische Veränderungen, blutchemische Werte u. a.) zu verbessern.

Von diesen Berechnungen zu unterscheiden ist die Angabe des genetischen Risikos, das sich durch ein bestimmtes Einzel-Allel (einen bestimmten SNP) ergibt.

6. BEISPIELE FÜR HÄUFIG AUFTRETENDE ERKRANKUNGEN, BEI DENEN NACH DERZEITIGEM WISSENSSTAND EINE POLYGENETISCHE PRÄDISPOSITION EINE WICHTIGE ROLLE SPIELT

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

- Die koronare Herzkrankheit (Verkalkung und Verengung der den Herzmuskel versorgenden Blutgefäße) ist die häufigste Ursache für Herzinfarkte. Osteoporose ist eine Erkrankung, die aufgrund einer Abnahme der Knochenfestigkeit häufig zu Knochenbrüchen führt. Für beide Erkrankungen wurde nachgewiesen, dass es eine Vielzahl möglicher punktueller Veränderungen (Nucleotide) auf der DNA gibt, die – falls vorhanden – mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko verbunden sind. Auch für die Neigung zur Fettleibigkeit (Adipositas) sind zahlreiche genetische Marker bekannt.
- Während jede einzelne dieser genetischen Veränderungen nur eine geringe Auswirkung auf das Risiko hat, nimmt die Wahrscheinlichkeit zu erkranken in Abhängigkeit von der Zahl und Art der vorliegenden Veränderungen laufend zu.
- Labors.at bietet genetische Untersuchungen an, die eine bessere Abschätzung des individuellen Risikos einen Herzinfarkt zu erleiden (GeneView Herzinfarktrisiko) oder an Osteoporose zu erkranken (GeneView Osteoporoserisiko) ermöglichen.
- Besteht ein erhöhtes genetisches Risiko, so gibt es sowohl bei der koronaren Herzkrankheit als auch bei der Osteoporose die Möglichkeit durch medikamentöse Prophylaxe und mit Lebensstil-Modifikationen diesen Erkrankungen vorzubeugen.

a. Koronare Herzkrankheit

Die Prädisposition für die koronare Herzkrankheit und ihre Komplikationen, darunter der Herzinfarkt, ist zu 40-60 % genetisch bedingt. Zum Teil ist das auf den Umstand zurückzuführen, dass der Blutspiegel von koronaren Risikofaktoren wie LDL- und HDL-Cholesterin zu 70 % bzw. 80 % genetisch bedingt ist. Weiters spielen auch bei der Entwicklung des Bluthochdrucks genetische Faktoren eine wichtige Rolle.

Die erste genetische Risikovariante für die koronare Herzkrankheit (9p21) wurde erst 2007 beschrieben, seitdem wurden insgesamt 36 genetische Risikofaktoren entdeckt und in groß angelegten Untersuchungen bestätigt. Überraschenderweise stellte sich heraus, dass über 2/3 dieser Risikovarianten nicht mit bekannten Risikofaktoren wie erhöhten Blutfettwerten, Bluthochdruck, Diabetes mellitus oder Rauchen im Zusammenhang stehen, also auch nicht durch die üblichen Vorsorgeuntersuchungen erfasst werden. Für viele der Varianten ist gesichert, dass es sich um unabhängige Risikofaktoren handelt. Weiters wurde klar, dass diese Varianten sehr verbreitet sind; über 50 % von ihnen kommen in mehr als der Hälfte der Bevölkerung vor, neun von ihnen finden sich bei mindestens 75 % der Bevölkerung. So tragen die Risikovariante 9p21 über eine Milliarde Menschen in homozygoter Form und weitere zwei Milliarden in heterozygoter Form. Bedeutet das nun, dass fast jeder ein hohes koronares Risiko hat? Nein, denn die Erhöhung des relativen Risikos durch einen einzelnen Risikofaktor ist relativ gering und variiert zwischen 6 % und 17 %, sodass es beim Gesamtrisiko auf die Zahl und Art der Risikovariante(n) ankommt.

Genetische Untersuchungen können also ein koronares Risiko für eine Person aufzeigen, auch dann, wenn diese Person keinerlei konventionelle Risikofaktoren aufweist; falls der eine oder andere konventionelle Risikofaktor vorhanden ist, können genetische Untersuchungen helfen zu entscheiden, ob es sich um ein isoliertes Risiko oder „um die Spitze des Eisbergs“ handelt.

Details zur klinischen Anwendung genetischer Untersuchungen im Zusammenhang mit dem Herzinfarkt-Risiko finden sie auf unserer Website www.labors.at → Services → Patienten-Information → Genuntersuchungen Patienten-Information → Patienten-Information GeneView Herzinfarktrisiko.

b. Osteoporose

Das Screening auf Osteoporose bzw. auf die Prädisposition einer Osteoporose-bedingten Fraktur erfolgt im Allgemeinen durch die Knochendichtemessung. Nun ist die Knochendichte im hohen Maße – etwa zu 50–85 % – genetisch determiniert, und es ist richtig, dass eine niedrige Knochendichte ein wesentlicher klinischer Risikofaktor für Knochenbrüche ist. Bei der Mehrzahl von osteoporotischen Frakturen ist allerdings in der Knochendichtemessung keine Osteoporose feststellbar, sodass offensichtlich andere Einflussfaktoren eine Rolle spielen. Die Knochendichtemessung ist also nur bedingt informativ.

Das Risiko für osteoporotische Frakturen ist – zumindest bei Frauen in der Perimenopause – zu über 50 % genetisch determiniert; im hohen Alter geht der genetische Einfluss deutlich zurück. Zur Zeit sind 56 SNPs bekannt, die mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ($p < 5 \times 10^{-8}$) mit der Knochendichte assoziiert sind; einige von ihnen befinden sich bei Genen, deren Rolle für die Knochenphysiologie unbekannt ist. 14 SNPs sind mit dem Risiko für Knochenbrüche assoziiert, davon sechs mit sehr hoher Sicherheit ($p < 5 \times 10^{-8}$).

Wenn man Personen nach einem kombinierten genetischen Knochendichte/Fraktur-Risikoscore in fünf Gruppen unterteilt (Gruppe 1 = niedrigstes Risiko, Gruppe 5 = höchstes Risiko), so ist in Gruppe 5 sowohl die Chance (Odds Ratio) eine erniedrigte Knochendichte zu haben als auch eine Fraktur zu erleiden jeweils etwa viermal so hoch als in der Gruppe 1.

Wenn man bei der Risikobeurteilung für Osteoporose-bedingte Knochenbrüche gezielt solche Erbanlagen berücksichtigt, die mit Knochenbrüchen vergesellschaftet sind, wird eine bessere Gesamt-Beurteilung des persönlichen Risikos für Knochenbrüche möglich. Für Personen mit einem hohen Gesamt-Risiko besteht dann die Hoffnung, dass sie durch frühzeitige Anpassung ihres Lebensstils und durch die Durchführung prophylaktischer Maßnahmen ihre Risikosituation positiv beeinflussen können.

Details zur klinischen Anwendung genetischer Untersuchungen im Zusammenhang mit dem Osteoporose-Risiko finden sie auf unserer Website www.labor.at → Services → Patienten-Information → Genuntersuchungen Patienten-Information → Patienten-Information GeneView Osteoporoserisiko.

c. Fettleibigkeit (Adipositas) und Übergewicht

Übergewicht und die damit verbundenen Folgeerkrankungen sind eines der größten Gesundheitsprobleme der Gegenwart von globaler Dimension. So wurde 2010 geschätzt, dass über eine Milliarde Menschen übergewichtig und mindestens 475 Millionen schwer fettleibig (adipös) waren. Unbestritten ist, dass mangelnde Bewegung, Fehlernährung und Lebensgewohnheiten dabei eine Rolle spielen. Aber schon lange steht im Raum, dass auch die Veranlagung wesentlich ist. Abgesehen davon, dass wohl jeder die eine oder andere Person kennt, die darüber klagt, dass sie schon „vom Hinschauen“ zunimmt während andere beliebig viel essen können, gibt es zahlreiche Studien, die dafür sprechen, dass das Körpergewicht tatsächlich im hohen Maße genetisch bedingt ist. So zeigte schon eine Studie in den 80er-Jahren an über 500 Erwachsene, die als Kinder adoptiert worden waren, dass sie in ihrem Gewicht ihren biologischen Eltern weit ähnlicher waren als den Adoptiveltern. Weiters zeigen Untersuchungen an Zwillingen,

- _ Dass eineiige Zwillinge in ihrem Körpergewicht ähnlicher sind als zweieiige,
- _ Dass es keine Unterschiede im Körpergewicht von eineiigen Zwillingen gibt, die gemeinsam in einer Familie aufwachsen im Vergleich zu solchen, die kurz nach der Geburt getrennt worden waren, oder
- _ Dass verschiedene eineiige Zwillingspaare, die über einen längeren Zeitraum zu viel Nahrung zu sich nehmen (84 Tage lang täglich 1000 kcal über dem bisherigen Bedarf) sehr unterschiedlich zunehmen (zwischen ca. 4 kg und 13 kg), die Gewichtszunahme innerhalb der einzelnen Zwillingspaare aber ähnlich ist.

Und nicht zuletzt sind an die 50 verschiedene monogenetische Erkrankungen und Syndrome bekannt, die mit Adipositas verbunden sind; diese Erkrankungen sind zwar selten, beweisen aber, dass Fettleibigkeit genetisch bedingt sein kann.

In den letzten Jahren hat sich das Wissen über die genetischen Ursachen der Adipositas stark erweitert. Aufgrund von genomweiten Assoziationsstudien konnten über 50 genetische Marker auf der DNA festgemacht werden, die hochsignifikant mit dem Körpergewicht (genauer: dem Body Mass Index) assoziiert sind. Einige davon betreffen Gene, die schon von den monogenetischen Erkrankungen bekannt sind, andere liegen in nicht codierenden Genabschnitten oder überhaupt nicht in Genen.

Heute schätzt man, dass ca. 70 % der Ursachen für Fettleibigkeit genetisch bedingt sind. Das Wissen über die Mechanismen durch die die identifizierten Gene zu Gewichtszunahme führen, ist allerdings sehr unvollständig.

Eine Reihe von Genen scheinen über die Regulation des Hunger- und Sättigungsgefühls zu wirken. Als erstes wurde in den 90er-Jahren das Leptin beschrieben. Dies ist ein Hormon, das hauptsächlich von Fettzellen produziert wird und das Hungergefühl bremst. Der Angriffspunkt sind Rezeptoren im Hypothalamus. Bei Leptinmangel oder Leptinresistenz kommt es zu übermäßiger Kalorienzufuhr und Übergewicht (Abb. 9).

Ein anderes Gen, das bei etwa 2 % bis 5 % aller Personen mit extremem Übergewicht mutiert ist, ist das Gen für den Melanocortin-4-Rezeptor (MC4R). Auch dieser Rezeptor wird im Hypothalamus exprimiert und ist an der Unterdrückung des Hungergefühls beteiligt, und zwar über Stimulation durch ein Peptidhormon das unter Leptinwirkung im Gehirn produziert wird.

Seit einigen Jahren ist das Fat-and-Obesity-assoziierte Gen (FTO-Gen) bekannt. Auch dieses Gen scheint über zentrale Mechanismen zu wirken. In Assoziationsstudien hat sich wiederholt bestätigt, dass Varianten des FTO-Gens, die in der west- und mitteleuropäischen Bevölkerung sehr häufig vorkommen (bei ca. 45 %), bei Homozygoten zu einem im Durchschnitt um etwa 3 kg höheren Körpergewicht führen. Auch SNPs in anderen Genen, die Einfluss auf die zentrale Regulation der Energiebilanz haben dürften (z. B. die Gene für das SHB2-Adaptorprotein 1, den Brain-derived Neurotrophic Factor und Proopiomelanocortin), sind mit einem höheren Körpergewicht assoziiert. Aber nicht nur das Sättigungsgefühl, sondern auch der Geschmack und damit möglicherweise die Lust bestimmte Dinge zu essen, werden von der genetischen Ausstattung mitbestimmt.

Aufgrund der äußerst vielschichtigen Ursachen für die Adipositas ist es zur Zeit wenig sinnvoll Risikoberechnungen zum individuellen genetischen Risiko durchzuführen; dennoch könnten genetische Untersuchungen in manchen Fällen zweckmäßig sein, in erster Linie um Personen mit einem hohen Risiko frühzeitig zu identifizieren, sodass rechtzeitig gegengesteuert werden kann.

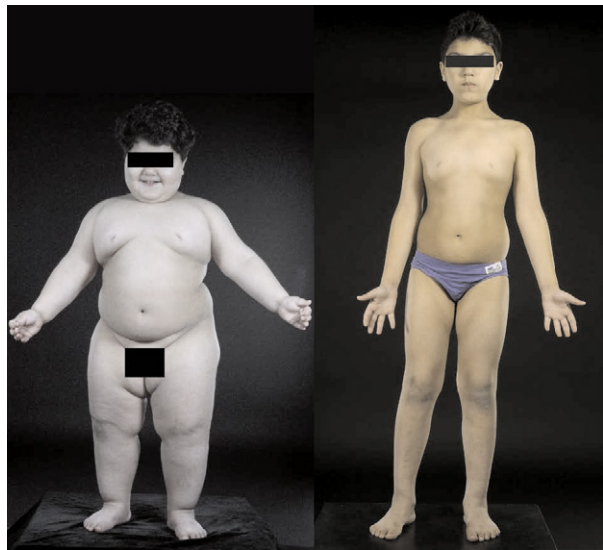


Abb. 9. Patient mit kongenitalem Leptinmangel links vor und rechts nach Substitutionstherapie

III. BIOCHEMISCHE METHODEN DER DNA- UND RNA-UNTERSUCHUNG

WIE KANN MAN DNA UND RNA UNTERSUCHEN?

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

- _ Untersuchungen menschlicher DNA werden im medizinisch-diagnostischen Labor in erster Linie durchgeführt um festzustellen, ob sich in der Basenabfolge der DNA bestimmte Eigenschaften finden, die krankheitsverursachend oder mit einem erhöhten Risiko für bestimmte Erkrankungen verbunden sind.
- _ Um die DNA, die sich im Zellkern befindet, labordiagnostisch untersuchen zu können, muss man sie aus den Zellen freisetzen. Nach biochemischer Aufreinigung und Aufspaltung in Einzelstränge werden Anfang und Ende jenes DNA-Abschnitts, der untersucht werden soll, markiert. Es erfolgt dies durch sogenannte Primer. Das sind künstlich hergestellte Abfolgen aus wenigen Nucleotiden, die an den Anfang und das Ende des gewählten DNA-Abschnitts binden und diesen so gegen den Rest der DNA abgrenzen.
- _ Um den gewählten DNA-Abschnitt mit Standard-Methoden analysieren zu können, muss dieser in ausreichender Menge vorhanden sein. Dazu wird er zunächst millionenfach vermehrt (= amplifiziert). Es geschieht das im Rahmen einer komplex aufgebauten Vervielfältigungsreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR), für deren Steuerung und Ablauf mehrere Komponenten, darunter die Primer, besondere Biokatalysatoren (DNA-Polymerasen) und Nucleotide, notwendig sind. Das Ergebnis der Reaktion ist das amplifizierte PCR-Produkt.
- _ Um festzustellen, ob sich das amplifizierte PCR-Produkt eines Patienten von dem eines Gesunden unterscheidet, stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung (z. B. die Untersuchung mit Hilfe von Restriktionsenzym-Längenpolymorphismen, Hybridisierungsreaktionen oder die Real-Time-PCR). Die Auswertung lässt auch Rückschlüsse darauf zu, ob ein Defekt in heterozygoter (ein Allel betroffen) oder homozygoter (beide Allele betroffen) Form vorliegt.
- _ Die Sequenzierung dient der Bestimmung der Reihenfolge der Nucleotide auf der DNA oder RNA. Neben der früher weitverbreiteten Didesoxymethode nach Sanger stehen heute extrem leistungsfähige Sequenzierverfahren zur Verfügung; diese werden unter den Begriffen „Next Generation Sequencing“ oder „Second Generation Sequencing“ zusammengefasst.

- _ RNA-Untersuchungen dienen häufig der Untersuchung der Genexpression. Man kann dazu mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umschreiben und diese dann mit den Methoden der DNA-Analyse untersuchen oder z. B. RNA-Micro-Arrays verwenden.

1. DNA-ISOLIERUNG

Um DNA (→ Was ist DNA (Desoxyribonucleinsäure)?) zu untersuchen, muss man sie zunächst aus kernhaltigen Zellen freisetzen, z. B. aus Zellen im Blut oder Speichel. Dies geschieht durch Zerstörung der Zellmembran, oft unter Zuhilfenahme von Detergentien (Auflösung der Zellmembran). Im freigesetzten Zellinhalt werden dann zumeist die Proteine (→ Was sind Proteine?) und auch die RNA (→ Was ist RNA (Ribonucleinsäure)?) durch Zusatz geeigneter Enzyme (Proteasen und RNasen) verdaut. Zur anschließenden DNA-Reinigung von den Resten des Zellinhaltes und den zugesetzten Stoffen werden hauptsächlich die zwei folgenden Trennprinzipien genutzt, nämlich Extraktionen und/oder Fällungsreaktionen. Bei der Extraktion wird der Umstand genutzt, dass DNA in verschiedenen Flüssigkeiten (Phasen) unterschiedlich gut löslich ist. Dabei werden oft Wasser und eine Mischung organischer Lösungen benutzt, die sich nach dem Schütteln wieder gut vom Wasser abtrennt (so wie bei einem Gemisch aus Öl und Wasser). Bei der Chloroform-Phenol-Extraktion wird Wasser und ein Gemisch aus Chloroform, Phenol und Iso-Amylalkohol benutzt. Nach Einbringen des Zellinhaltes und Schütteln findet sich die DNA vorwiegend in der wässrigen Phase, Eiweiß in der Grenzschicht, und RNA und Lipide reichern sich in der organischen Phase an. Zur DNA-Gewinnung mit Hilfe von Fällungsreaktionen werden die chemischen Bedingungen so gewählt, dass DNA unlöslich wird und deshalb ausfällt (präzipitiert). Bei der Ethanolfällung wird der Umstand genutzt, dass DNA in einer sauren Ethanol-Lösung die stabilisierende Hydrathülle um ihre Phosphatreste verliert und deshalb präzipitiert.

Extraktions- und Fällungsreaktionen können kombiniert bzw. weitere Reinigungsschritte (z. B. chromatografische Verfahren) angeschlossen werden.

Gewonnen wird gereinigte Doppelstrang-DNA.

2. POLYMERASEKETTENREAKTION

Will man den Aufbau der DNA untersuchen, z. B. um eine Erbkrankheit zu diagnostizieren, muss man feststellen, ob die Reihenfolge der DNA-Bausteine, der Nucleotide, normal oder verändert ist. Dazu werden meist relativ kurze DNA-Fragmente analysiert und es wird ermittelt, ob z. B. innerhalb der DNA-Sequenz eines Gens ein einzelnes Nucleotid ausgetauscht ist oder ob vielleicht ein kurzes DNA-Stück fehlt oder „zu viel“ ist. Eine praktische Schwierigkeit für die Untersuchung besteht darin, vor dem Hintergrund der rund drei Milliarden Basenpaare der menschlichen DNA gezielt jenes kleine DNA-Fragment „herauszugreifen“, in dem der Defekt vermutet wird. Um dieses Fragment im Detail untersuchen zu können, ist es aus analytischen Gründen notwendig, dieses zu vervielfältigen. Dies erfolgt durch das Herstellen zahlreicher Kopien dieses Fragmentes in

einer Reaktion, die Polymerasekettenreaktion (PCR) genannt wird.

Für die Vervielfältigung von DNA-Abschnitten im Rahmen der PCR wird die DNA in Einzelstränge aufgespalten und der zu vervielfältigende DNA-Abschnitt durch sogenannte Primer festgelegt. Primer sind kurze DNA-Stücke, die künstlich synthetisiert werden; sie werden „maßgeschneidert“ so hergestellt, dass sie genau an den Anfang und das Ende des zu untersuchenden DNA-Abschnitts passen und diesen so eingrenzen. Der durch die Primer festgelegte Bereich wird dann vervielfältigt. Dies geschieht durch biochemische Reaktionen an denen Enzyme (hitzeresistente DNA-Polymerasen) beteiligt sind, die die im Reaktionsgemisch enthaltenen Nucleotide entsprechend der Vorlage des zu kopierenden Original-DNA-Abschnittes aneinanderknüpfen. Die Abfolge der einzelnen Schritte der Reaktion wird dadurch gesteuert, dass das Reaktionsgemisch immer wieder verschiedene Temperaturzyklen durchläuft (Abb. 10).

1) **Denaturierung.** Diese dient dem Aufspalten der Doppelstrang-DNA in zwei Einzelstränge. Es geschieht das durch Erhitzen der Probe auf etwa 94–96 °C.

Polymerasekettenreaktion - PCR

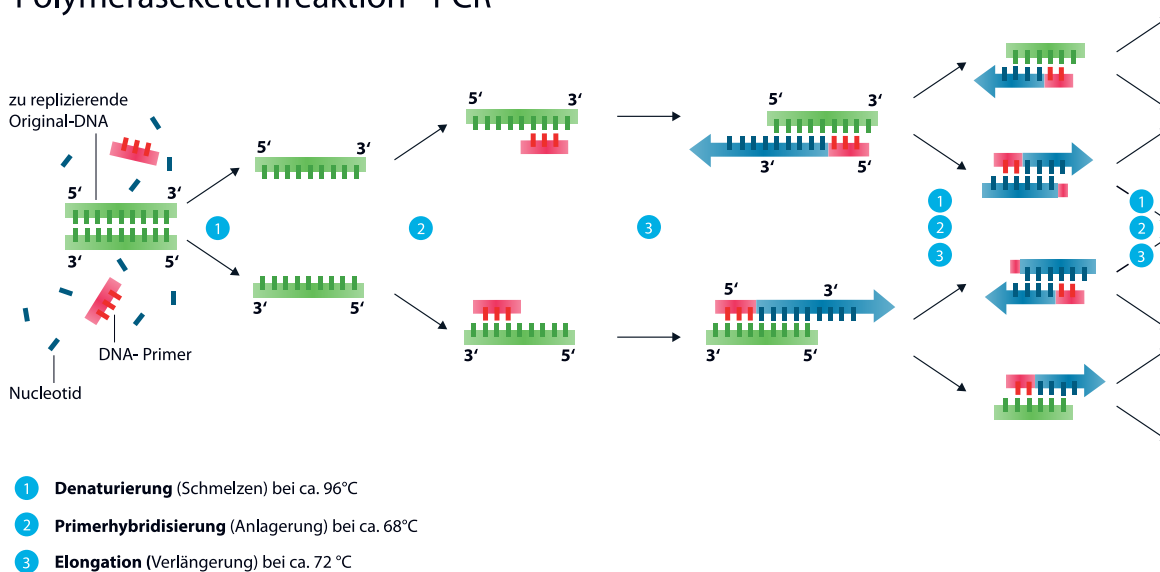


Abb. 10

2) **Hybridisierung.** Bei diesem Reaktionsschritt binden die Primer an die DNA (Annealing). Die dazu notwendige Temperatur hängt vom Aufbau der Primer ab. Meist liegt sie zwischen 55 und 60 °C.

3) **Amplifikation** (Elongation, Polymerisation, Vervielfältigung). In dieser Phase wird der neue DNA-Strang durch die eingesetzte DNA-Polymerase gebildet. Die optimale Temperatur hängt von der Art der verwendeten Polymerase ab und liegt meist zwischen 68–72 °C. Mit jedem Zyklus verdoppelt sich die Zahl der DNA-Moleküle, die Vermehrung erfolgt also geometrisch: aus einem DNA-Molekül werden nach dem 1. Zyklus 2, nach dem nächsten Zyklus 4, dann 8 usw., nach 20 Zyklen hat sich die Zielsequenz um das Millionenfache, nach 30 Zyklen um das Milliardenfache vermehrt.

Nach Abschluss der PCR erfolgt die **Detektion (Auswertung)**. Dabei wird festgestellt, ob sich das Amplifikationsprodukt eines Patienten von dem eines Gesunden unterscheidet. Etwaige Unterschiede können mittels unterschiedlicher Techniken erkannt werden.

Eine ältere Technik ist die Verwendung sogenannter Restriktionsenzym-Längenpolymorphismen. Restriktionsenzyme sind Proteine, die DNA an bestimmten Stellen schneiden. Die Schnittstelle ist je nach Restriktionsenzym unterschiedlich und wird durch eine definierte Reihenfolge von Nucleotiden auf der DNA bestimmt. Wird durch eine Mutation eine Schnittstelle (oder mehrere) auf dem PCR-Produkt einer Proben-DNA eliminiert oder zusätzlich gebildet, entstehen bei Behandlung mit einem geeigneten Restriktionsenzym Fragmente, deren Länge sich zwischen normaler DNA

und mutierter DNA unterscheidet. Die Fragmente können in Abhängigkeit von ihrer Länge auf einem Gel elektrophoretisch getrennt und so die Mutation nachgewiesen werden (Abb. 11).

Eine andere Technik ist die Hybridisierung. Dabei werden künstliche Sonden eingesetzt, die entweder zum normalen oder zum mutierten PCR-Produkt komplementär sind und spezifisch an dieses binden. Kommerziell verbreitet ist die sogenannte reverse Hybridisierung. Dabei sind die relevanten Sonden auf einem Trägermaterial fixiert und werden mit dem PCR-Produkt der Proben überschichtet, sodass es zur komplementären Bindung der passenden Fragmente kommt. Ist eine Bindung erfolgt, stehen verschiedene Methoden der Detektion (Fluoreszenz- oder Farbreaktionen; früher häufig Filmschwärzung durch radioaktiv markiertes Material) zur Verfügung.

Bei einer Sonderform der PCR, der Real-Time-PCR, wird die laufende Vervielfältigung des interessierenden DNA-Abschnittes während des Reaktionsverlaufs aufgezeichnet. Durch Einsatz unterschiedlicher spezifischer Fluoreszenz-Sonden kann dabei z. B. zwischen der Vermehrung (Amplifikation) einer normalen und/oder einer mutierten Probe unterschieden werden. Diese Methode ermöglicht es somit in „Echtzeit“ festzustellen, ob z. B. ein bestimmter DNA-Defekt vorliegt und ob dieser heterozygot oder homozygot ist. Die gängigen Geräte erlauben es weiters auch mehrere Ansätze gleichzeitig beobachten zu können.

Auch zur Quantifizierung der eingesetzten DNA-Menge ist die Methode geeignet.

Abb. 11. Nachweis der Faktor-V-Leiden-Mutation mittels Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen

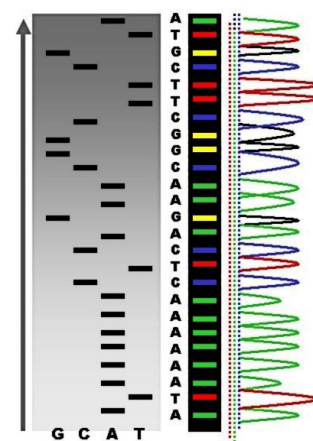
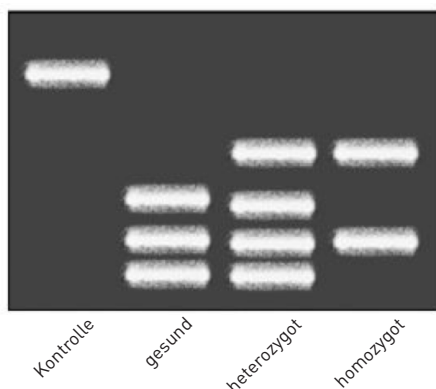


Abb. 12. DNA-Sequenzierung mit der Didesoxymethode (links: mit radioaktiver Markierung, rechts: mit Fluoreszenzmarkierung, Mitte: Nucleotid-Sequenz)

3. DNA- UND RNA-SEQUENZIERUNG

Eine DNA- oder RNA-Sequenzierung wird durchgeführt, um die genaue Abfolge der Nucleotide zu bestimmen. Es gibt zahlreiche Anwendungen, z. B. die Suche nach einer unbekannten Mutation oder die gleichzeitige Untersuchung auf mehrere (mögliche) genetische Veränderungen. Die Sequenzierung kann auch als Alternative zu den oben beschriebenen Verfahren als Untersuchung auf eine bekannte Mutation verwendet werden.

a. Didesoxymethode nach Sanger (Kettenabbruch-Synthese)

Ursprünglich wurden zur DNA- und RNA-Sequenzierung radioaktiv markierte Nucleotide verwendet und vier parallele Ansätze durchgeführt. Alle vier Ansätze enthielten ein Reaktionsgemisch mit den gleichen Primern, DNA-Polymerase und allen vier Basen (A, G, C und T), jede mit einer radioaktiven Markierung; der Unterschied bestand nur darin, dass in jedem Ansatz zusätzlich eine der Basen in geringer Menge in Form eines Didesoxy-Nucleotids zugesetzt wurde. Ähnlich wie bei der PCR wird die Proben-DNA zunächst denaturiert. Es wird nur ein Primer, der den Beginn des Kopiervorganges festlegt, verwendet. Der Primer wird so gewählt, dass er sich an einen definierten Abschnitt der DNA anlagert, von dem aus die weitere Struktur aufgeklärt werden soll. Sodann beginnt die DNA-Polymerase ausgehend vom Primer den neuen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Solange normale Nucleotide dazu herangezogen werden, verläuft die Synthese normal. Sobald aber nach dem Zufallsprinzip ein Didesoxy-Nucleotid an den wachsenden Strang gebunden wird, kommt die Synthese zum Erliegen, weil Didesoxy-Nucleotide über keine OH-Gruppe am 3'-C-Atom der Desoxyribose verfügen und damit die Voraussetzung zur Anknüpfung eines weiteren Nucleotids nicht gegeben ist. Da sich in jedem der vier Ansätze Millionen von DNA-Molekülen befinden, kann man davon ausgehen, dass an allen Stellen, wo sonst ein normales Nucleotid eingebaut würde, gelegentlich ein entsprechendes Dideoxy-Nucleotid positioniert wird und es an dieser Stelle zum Abbruch der Synthese kommt. Im Ansatz mit zugesetzten A-Dideoxy-Nucleotiden ist das an allen Positionen, an denen ein sich ein A befindet, der Fall, im Ansatz mit G-Dideoxy-Nucleotiden an allen Positionen mit G usw. Nach Beendigung der Reaktion werden die Produkte aller vier Ansätze nebeneinander mittels Gel-Elektrophorese nach ihrer Größe getrennt

und durch Autoradiographie (Schwärzung eines Films durch radioaktive Strahlung) sichtbar gemacht. Die Strecke, die ein Produkt im Elektrophoresegel wandert, lässt auf die Anzahl der Nucleotide schließen, aus denen es aufgebaut ist. Je weiter ein Produkt wandert, desto kleiner ist es. Die Bedingungen der Elektrophorese sind dabei so gewählt, dass bereits Produkte, die sich in ihrer Größe nur um ein Nucleotid unterscheiden, anhand der zurückgelegten Wegstrecke unterschieden werden können.

Da man aufgrund der Positionen, an denen es zum Syntheseabbruch gekommen ist, ersehen kann, welches der Nucleotide bei welcher DNA-Länge in den Strang eingebaut wird, kann man die DNA-Sequenz ablesen.

Betrachten wir in Abb. 12 die linke Trennstrecke. Hier sind die Produkte jenes Reaktionsansatzes, der G-Dideoxy-Nucleotide enthielt, aufgetrennt. Die einzelnen Banden in dieser Bahn zeigen die Produkte unterschiedlicher Länge, bei denen es durch Einbau eines G-Dideoxy-Nucleotids zum Syntheseabbruch gekommen ist. Die unterste Bande auf dieser Trennstrecke repräsentiert ein Produkt, das in Summe aus 13 Nucleotiden besteht; das am Gel dargestellte Gesamtprodukt besteht aus 25 Nucleotiden, wobei das letzte ein Adenin ist (unten, 3. Bande von links). Die Basen-Sequenz ist rechts neben dem Gel angeführt.

Von der Dideoxymethode nach Sanger gibt es eine Reihe von Modifikationen; eine heute sehr verbreitete ist die Verwendung von mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierten Dideoxy-Nucleotiden, wobei jedes der vier Dideoxy-Nucleotide (A-, G-, C- und T- Dideoxy-Nucleotid) bei Anregung durch einen Laser Licht einer anderen Wellenlänge emittiert. Bei der oben beschriebenen Methode geben die vier radioaktiv markierten Dideoxy-Nucleotide nur eine einzige Signalqualität. Die Auftrennung muss daher in vier Bahnen erfolgen. Durch unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung der vier Desoxy-Nucleotide wird es ermöglicht, die DNA-Synthese in einem einzigen Reaktionsansatz durchführen, die Reaktionsprodukte dann mittels Kapillarelektrophorese nach ihrer Größe bzw. der Anzahl der Nucleotide, aus denen sie aufgebaut sind, zu trennen und die Nucleotidabfolge aufgrund ihrer unterschiedlichen Fluoreszenzsignale automatisiert zu bestimmen (siehe rechter Teil der Abb. 12).

b. Next Generation Sequencing (Second Generation Sequencing)

In den letzten Jahren haben eine Reihe von Methoden, die meist unter dem Begriff „Next Generation Sequencing“ zusammengefasst werden, die Sequenzier-technologie revolutioniert. Die Verfahren, die zur Anwendung kommen, sind auf vergleichbaren Testprinzipien aufgebaut. Beispielhaft wird im Folgenden die Ion-Torrent™-Technologie der Firma Life Technologies™ beschrieben.

Das gesamte Genom oder interessierende DNA-Sequenzen, die zunächst durch verschiedene Techniken aus der Gesamt-DNA selektiert worden sind, werden in Bruchstücke zerlegt; es kann das z. B. mit Hilfe von Enzymen oder durch Ultraschall geschehen. Dabei entstehen aus den zahlreichen DNA-Molekülen der Probe einander überlappende Fragmente. Jedes dieser Fragmente wird um ein gleichartiges kleines DNA-Stück (einen „Verknüpfer“, auf Englisch: „linker“) verlängert. Danach wird die Lösung, in der sich die DNA-Fragmente befinden, hochgradig verdünnt und in die Millionen von Reaktionskammern (microwells) eines Chips transferiert; die Probenverdünnung ist dabei so gewählt, dass in jede Reaktionskammer möglichst nur ein einziges DNA-Fragment gelangt. In den Reaktionskammern befinden sich Träger, z. B. Kugeln oder eine Glasoberfläche, auf die DNA-Segmente, die zu den oben erwähnten „linkern“ komplementär sind, aufgebracht sind. Bei Kontakt mit den DNA-Fragmenten der Probe werden diese deshalb an das Trägermaterial gebunden. In jeder Reaktionskammer erfolgt dann unter Zugabe einer DNA-Polymerase für jedes der gebundenen Fragmente eine eigene PCR. Dazu werden die vier Nucleotide in definierter Reihenfolge in jede Reaktionskammer eingebracht. Die Lösung mit einem bestimmten Nucleotid verweilt für eine gewisse Zeit in der Reakti-

onskammer und wird danach wieder entfernt. Nur wenn das vorgelegte Nucleotid zur DNA-Sequenz des Fragmentes in der Reaktionskammer komplementär war, wird es von der DNA-Polymerase in den wachsenden neuen DNA-Strang eingebaut. In diesem Fall sinkt der pH-Wert in der Reaktionskammer, da im Zuge des Einbaus des Nukleotids ein H-Ion freigesetzt wird. Diese pH-Wert-Absenkung wird messtechnisch erfasst. Die verwendete Nucleotid-Lösung wird dann entfernt und – der Reihenfolge entsprechend – eine Lösung mit einem anderen Nukleotid eingebracht, usw. So erhält man aus jeder Messzelle laufend Angaben über den Einbau von Nucleotiden in die neu synthetisierte DNA, man kann sozusagen bei der sich im Zuge der PCR zyklisch wiederholenden DNA-Synthese „zuschauen“. Die Einzelinformationen werden mit Hilfe bioinformatischer Algorithmen zur Gesamt-Sequenz zusammengefügt, wobei die Überlappung der DNA-Segmente als „Orientierungshilfe“ dient und durch die automatische Sequenzierung identischer Sequenzabschnitte eine hohe Datensicherheit erzielt wird. Im Gegensatz z. B. zur Dideoxymethode, bei der zuerst die DNA-Synthese und dann die Sequenzanalyse erfolgt, laufen diese Schritte hier parallel. Der wesentliche Technologiesprung liegt in der Miniaturisierung, der parallelen Durchführung von Millionen von PCR-Reaktionen, der simultanen Detektion aller laufenden DNA-Synthesen und dem Zusammenführen der Messdaten zur einer Gesamt-Sequenz mittels geeigneter Computerprogramme. Erst durch diese Methoden wurde es in den letzten Jahren möglich, z. B. das gesamte Genom eines Menschen in einem Tag oder in noch kürzerer Zeit zu analysieren oder genomweite Assoziationsstudien durchzuführen (→ Auf welchen Untersuchungen basieren die Angaben zum genetischen Erkrankungsrisiko?), durch die sich das Verständnis für die Ursachen vieler sehr häufiger Erkrankungen und komplexer Anlagen laufend erweitert.

SEQUENZIERUNG EINES HUMANEN GENOMS			
		Zeitbedarf	Kosten (US \$)
2001	Human Genome Project	12 a	2.700.000.000
2001	Celera	3 a	100.000.000
2007	454 Roche	3 m	1.000.000
2008	ABI SOLID (Life Techn.)	2 w	60.000
2010	Complete Genomics	1 w	1.000
2014 ?	Illumina (HiSeqX)	3 d	1.000
2014 ?	Oxford Nanopore	15 min	≤ 1.000
?	Transistor-mediated	< 10 min	?

c. RNA-Sequenzierung

Bei RNA-Untersuchungen handelt es sich häufig um Untersuchungen zur Genexpression, z. B. um festzustellen, welche Gene von verschiedenen Zellen exprimiert werden, mit welcher Intensität die Expression erfolgt und wie sich das Muster unter bestimmten Bedingungen verändert. Weiters können Veränderungen der mRNA (→ Was ist RNA (Ribonucleinsäure?)) nach der Transkription (posttranskriptionale Modifikationen) analysiert werden; diese sind z. B. dafür verantwortlich, welche mögliche Variante eines in der DNA codierten Proteins realisiert wird (alternatives Splicing).

Wie bei der Isolierung der DNA müssen auch zur Gewinnung von RNA die Zellen lysiert werden. Dazu steht eine Reihe von Methoden zur Verfügung. Eine Besonderheit liegt darin, dass RNA wesentlich empfindlicher ist als DNA und leicht durch Ribonucleasen (RNAsen) des Zytoplasmas abgebaut wird. Deshalb sind bei allen RNA-Isolierungen die Bedingungen so gewählt, dass RNAsen rasch inaktiviert werden. Nach Gewinnung der mRNA wird diese meist in sogenannte komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dazu benutzt man bestimmte Enzyme, reverse Transkriptasen. Diese synthetisieren entlang der einzelsträngigen RNA einen komplementären DNA-Strang und bauen dann den RNA-Anteil ab, sodass ein DNA-Einzelstrang übrig bleibt. Durch DNA-Polymerasen erfolgt die Vervollständigung zum DNA-Doppelstrang. Die cDNA-Sequenz entspricht genau jener, die von der mRNA als Vorlage zur Synthese eines bestimmten Proteins genutzt wird. Für die anschließende Untersuchung der cDNA können alle oben erwähnten Methoden der DNA-Untersuchung herangezogen werden.

4. GENEXPRESSIONS-UNTERSUCHUNG

Für die Untersuchung der Genexpression (→ Was versteht man unter Genexpression?) werden vielfach sogenannte Micro-Arrays („Genchips“) verwendet (Abb. 13). Dabei wird eine große Zahl interessierender DNA-Sonden (z. B. DNA-Abschnitte aus Gensequenzen) an definierten Stellen auf einen Träger (z. B. Glas oder ein Silikon-Film) aufgebracht. Dazu gibt es mehrere Verfahren; so können die DNA-Stücke auf den Träger gedruckt oder direkt auf der Trägoberfläche synthetisiert werden. Ein Chip kann tausende Positionen aufweisen und an jeder der Positionen befinden sich Millionen der gleichen Sonden-Moleküle. Eine typische Anwendung ist der Zwei-Farben-Micro-Array. Dazu wird z. B. die gesamte RNA aus dem Gewebe von Gesunden und aus dem Tumorgewebe eines Patienten isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend werden die cDNA des Patienten und der gesunden Person mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, sodass bei Anregung die cDNA-Moleküle, die aus normalem Gewebe stammen, z. B. grünes Licht emittieren und die aus Tumorgewebe stammenden rotes. Danach werden die beiden cDNAs gemischt und auf den Träger aufgebracht, wo jedes cDNA-Molekül an einer komplementären Sonde hybridisiert. Zur Auswertung wird die Art und Intensität des emittierten Lichts herangezogen. Wird z. B. ein bestimmtes Gen nur im gesunden Gewebe exprimiert, erhält man an der Position der entsprechenden Sonden nur Grünfluoreszenz, wird das Gen ausschließlich von Tumorzellen exprimiert, erhält man nur Rotfluoreszenz, erfolgt die Expression in beiden Geweben, ergibt sich eine Mischfarbe, deren Farbton vom Verhältnis der Gen-Expression der beiden Geweben abhängt. Durch verschiedene statistische Analyseverfahren können mit Micro-Arrays unterschiedliche Zusammenhänge identifiziert werden, z. B. welche Gene interagieren oder wie sich die Genexpression bei verschiedenen Zellarten unterscheidet.

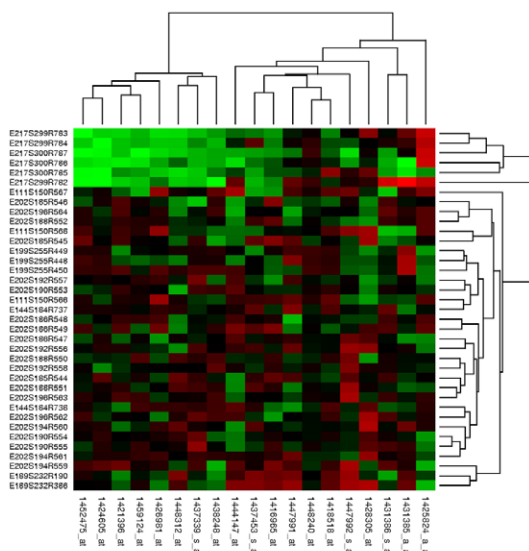


Abb. 13. Micro-Array zur RNA-Expression

IV. GENETISCHE DIAGNOSTIK - ENTWICKLUNGSTENDENZEN UND AUSBLICK

KAPITELZUSAMMENFASSUNG

Der methodisch-technische Fortschritt und die Kostensenkung führen bei der genetischen Diagnostik dazu, dass eine immer größere Zahl genetischer Anlagen, die mit verschiedenen Erkrankungen zusammenhängen oder die beim Ansprechen auf Medikamente eine Rolle spielen, identifiziert werden. Dies erlaubt zunehmend eine verbesserte Diagnostik, das Erstellen individueller Risikoprofile und ebnet den Weg für eine personalisierte Therapie.

Bei der Sequenzierertechnologie geht der Trend zu immer schnelleren und kostengünstigeren Analysen. Dies findet zur Zeit seinen Niederschlag in der explosionsartigen Zunahme von genomweiten Assoziationsstudien (GWAS) (Abb. 14).

Bis August 2014 waren an die 2000 GWAS für ein weites Spektrum verschiedener Erkrankungen und Anlagen publiziert und über 14.000 Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) (→ Wie unterscheidet sich die DNA verschiedener Men-

schen?) beschrieben, die hochsignifikant ($p < 10^{-5}$) mit verschiedenen klinischen Zustandsbildern assoziiert sind. Die Studien ermöglichen nicht nur erbliche Komponenten für eine große Zahl von Erkrankungen zu identifizieren, sondern zum Teil erlauben sie auch das Erstellen bevölkerungsspezifischer Risikoprofile, da nicht alle Risikofaktoren überall auf der Welt gleichermaßen nachgewiesen sind. Neben SNPs werden durch die wachsende Zahl von Sequenzanalysen auch ausgedehntere Mutationen (→ Was ist eine Mutation?), wie Insertionen, Deletionen, copy number variations u.a., zunehmend identifiziert und auf ihren Zusammenhang mit Erkrankungen überprüft. Insgesamt sind in der ClinVar Database zurzeit rund 20.000 Gene genannt und für diese nahezu 125.000 genetische Varianten gelistet. Betrachtet man die Eigenschaften, die auf die Wirkung von Medikamenten Einfluss nehmen, so finden sich in der „Drug Bank“ mit gegenwärtig 7740 erfassten Wirkstoffen zahlreiche Einträge über genetische Varianten (vorwiegend SNPs), die bei verschiedenen Medikamenten entweder unerwünschte Reaktionen auslösen können oder Einfluss auf die Medikamentenwirksamkeit haben.

Published GWA Reports, 2005–6/2012



Abb. 14

Die gewonnenen riesigen Datenmengen haben auch weitreichende Bedeutung für die Grundlagenforschung: Sie erweitern das Verständnis über das Zusammenwirken verschiedener Gene, und – am wichtigsten – es werden bisher völlig unbekannte Zusammenhänge für das Entstehen verschiedener Krankheiten aufgedeckt; das wiederum eröffnet die Möglichkeit für die Entwicklung neuer Medikamente und ebnet den Weg für neue Therapieansätze, darunter solche, die direkt in die Genmaschinerie eingreifen.

Ein ebenfalls schnell wachsendes Gebiet ist die Erforschung und Messung der Genexpression (→ Was versteht man unter Genexpression?) von normalen und mutierten Genen. Dies erlaubt genauere diagnostische und prognostische Aussagen mit der Möglichkeit, durch Änderung des Lebensstils und andere Maßnahmen einem ungünstigen Genexpressions-Muster entgegenzuwirken. Davon abgesehen werden zunehmend Medikamente entwickelt, die in der Lage sind bei manifesten Erkrankungen eine abnormale Genexpression zu hemmen.

Die Zunahme des Wissens und der Umstand, dass umfangreiche Sequenzanalysen in immer kürzerer Zeit und relativ kostengünstig abgearbeitet werden können, führt dazu, dass eine immer größere Zahl genetischer Untersuchungen verfügbar ist und Eingang in die Laborroutine findet (Abb. 15).

So ist es heute in größeren Zentren Standard, die Medikation für Tumorerkrankungen aufgrund des Patienten-spezifischen Mutationsmusters zu wählen und bei neu entstandenen Mutationen entsprechend anzupassen. Ebenso nimmt die Zahl möglicher Untersuchungen auf zahlreiche angeborene Eigenschaften – u. a. auf genetische Risikofaktoren für verschiedene Erkrankungen oder auf Anlagen, die bei der Wirksamkeit oder Verträglichkeit von Medikamenten eine Rolle spielen – laufend zu. Die Entwicklung geht also in Richtung einer zunehmend personalisierten Medizin. Darüber hinaus zeigt sich, dass unsere Erbanlagen auch bei zahlreichen „normalen“ Eigenschaften, z. B. beim Gedächtnis, der Aggressionsneigung oder der mathematischen Begabung, eine Rolle spielen.

In der Praxis gibt es viele Schwierigkeiten zu überwinden. So ist die Interpretation der riesigen Datenmengen, die bei einer ausgedehnten oder genomweiten Sequenzierung anfallen, ein Problem und ganz besonders der Umstand, dass viele Gene einer epigenetischen Regulation unterliegen. Man kann wohl davon ausgehen, dass nur ein kleiner Teil der rasant wachsenden Forschungsergebnisse reale Bedeutung für die Klinik und den Alltag erlangen werden. Dessen ungeachtet ist die Entwicklung aber vorgezeichnet: die Molekularbiologie ist mit zunehmender Geschwindigkeit dabei, weite Bereiche der Medizin und möglicherweise auch andere Bereiche unseres Lebens nachhaltig zu beeinflussen und zu verändern.

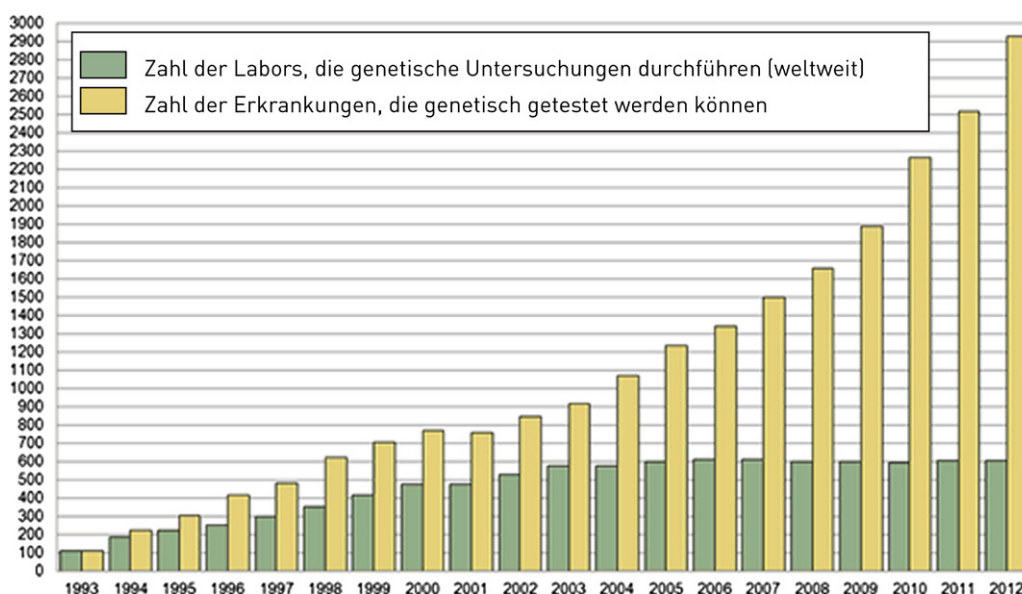


Abb. 15

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1c	1EDP human endothelin1 02	von Wikimedia Commons (Author: Nevit Dilmen, from PDB entry with Cn3D Data Source: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure . Released as Creative Commons under the GNU Free Documentation License)
1d	Structure of Human Transferrin Receptor-Transferrin Complex	erstellt auf http://www.rcsb.org , RCSB Protein Data Bank
2	Chemische Struktur der DNA	von Wikimedia Commons (Author: Madeleine Price Ball. Released as Creative Commons under the GNU Free Documentation License)
3	The tRNA cloverleaf general	von Wikimedia Commons (Author: Yikrazuul. Licensed under the Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported license)
4	Ribosome function	von Wikimedia Commons (Author: National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health. This image is in the public domain.)
5	Aminoacids table	von Wikimedia Commons (This work has been released into the public domain by its author, Mouagip)
6	Mapa genético o cariograma	von Wikimedia Commons (Released as Creative Commons under the GNU Free Documentation License)
8a, 8b	Published Genome-Wide Associations	von www.genome.gov , National Human Genome Research Institute (in public domain)
9	Clinical response to leptin administration in congenital leptin deficiency	aus „Minireview: Human Obesity—Lessons from Monogenic Disorders“ von Stephen O’Rahilly, I. Sadaf Farooqi, Giles S. H. Yeo, and Benjamin G. Challis, <i>Endocrinology</i> 144(9):3757–3764. Copyright © 2003 by The Endocrine Society. Mit freundlicher Genehmigung von Sir Stephen O’Rahilly MD FRS FMedSci.
10	Polymerasekettenreaktion	von Wikimedia Commons (Author: Enzoklop. Released as Creative Commons under the GNU Free Documentation License)
11	FVL PCR	von Wikimedia Commons (Author: Dr. med. Mario Schubert, Heidelberg, Germany. Released as Creative Commons under the Creative Commons Attribution-Share Alike 2.5 Generic license.)
12	Radioactive Fluorescent Seq	von Wikimedia Commons (Author: Abizar Lakdawalla. Released as Creative Commons under the GNU Free Documentation License)
13	Heatmap	von Wikimedia Commons (This image is in the public domain)

- | | | |
|----|--|--|
| 14 | Published GWA Reports, 2005–6/2012 | von www.genome.gov , National Human Genome Research Institute (in public domain), modifiziert |
| 15 | The rise of genome-based diagnostic applications | von www.epmajournal.com , Younesi and Hofmann-Apitius EPMA Journal 2013 4:23, doi:10.1186/1878-5085-4-23 (released under Creative Commons Attribution License 4.0), modifiziert |

Herausgeber & Redaktion:

Mühl-Speiser-Bauer-Spitzauer und Partner_Fachärzte
für medizinische und chemische Labordiagnostik OG
1210 Wien_Kürschnergasse 6b_FN 364646w

Autoren:

Univ.-Prof. DDr. Pierre Hopmeier

Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Speiser

Stand: Jänner 2016

Der vorliegende Leitfaden erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Unter besonderen Umständen können in Einzelfällen auch andere Vorgangsweisen als in diesem Leitfaden empfohlen sinnvoll sein. Die Herausgeber übernehmen keine Haftung für Richtigkeit, Vollständigkeit oder Aktualität der Inhalte.



VIENNA MEDICAL INNOVATION CENTER

Das modernste Labor-Diagnosezentrum Österreichs.

LABORS.AT



Modernste Labormedizin

Telefon_(01) 260 53 – 0

Fax_(01) 260 53 – 500

Mail_mail@labors.at

www.labors.at



ALLE LABORUNTERSUCHUNGEN AUS EINER HAND

Proben

- Blut
- Harn
- Stuhl
- Abstrich
- Spermogramm
- Gerinnungskontrolle, z. B. Marcoumar
- Quantiferon Tuberkulostest
- Lymphozyten-Typisierung
- Genetische Risikofaktoren

Funktionstest / Profile

- Blutzucker-Belastungstest
- Lactose-Belastungstest
- TRH Test

MR Dr. J. Bauer | Univ.-Doz. Dr. G. Endler | Univ.-Doz. Dr. M. Exner | Dr. E. Mühl | Dr. M. Mühl | Univ.-Prof. Dr. W. Speiser | Univ.-Prof. Dr. S. Spitzauer |
Dr. S. Wagner | Dr. P. M. Winter