

Phänomenale Leistung mit Hilfe modernster Technologie

Krebsforschung auf kleinstem Raum

Der Microarray oder Biochip hilft den Wissenschaftlern bei der Suche nach der sprichwörtlichen Nadel im Heuhaufen

VON LIZA GLESENER

Als Francis Crick am 28. Februar 1953 behauptete, er habe das Geheimnis des Lebens entdeckt, übertrieb er nicht. Das Wissenschaftlerduo Crick und Watson revolutionierte die moderne Biologie: Zum ersten Mal beschrieben sie die Struktur der Bausteine des Lebens, die DNA-Doppelhelix. Ohne dieses Grundwissen würde heute weder das Microarray-Center des Centre de recherche public (CRP) Santé bestehen, noch würden seine Angestellten und Partner unter der Leitung von Dr. Laurent Vallar an molekularbiologischen Vorgängen in unseren Zellen forschen.

Um die Arbeit des Teams um Vallar zu verstehen, ist ein gewisses Grundwissen erforderlich: Willkommen im Zellkern! In jeder menschlichen Zelle (Geschlechtszellen ausgenommen) findet sich unsere gesamte Erbinformation, geschrieben auf 23 Chromosomenpaare, unterteilt in schätzungsweise 24 000 Gene und bestehend aus DNA, die vereinfacht, aus zwei komplementären Strängen mit vier als A, T, G und C abgekürzten Basen zusammengesetzt ist.

Klingt kompliziert, ist jedoch brillant in seiner Simplizität: A ist am gegenüberliegenden Strang immer mit T verbunden, G immer mit C. Mit nur vier Teilen liefert die DNA den Schlüssel zur Herstellung von Proteinen, die nahezu alle biochemischen, strukturellen und ordnenden Funktionen unseres Körpers bestimmen.

Proteine entstehen aber nicht direkt am DNA-Strang, sondern erst am Ende einer längeren Kette von Ereignissen, beginnend mit der Transkription. An gewissen Stellen in der DNA löst sich die Verbindung zwischen den A-, T-, C- und G-Basen, die Doppelhelix öffnet sich. Auch für diesen Vorgang sind Proteine verantwortlich, in diesem Fall RNA-Polymerase II.

Nun beginnt an einem der DNA-Stränge die eigentliche Transkription. Die Polymerase baut ein Boten-RNA oder mRNA genanntes Molekül zusammen, einen langen Strang aus Basen, vergleichbar mit der DNA. Hier zeigt sich die Wichtigkeit der Komplementarität: Für jedes G im DNA-Strang setzt die Polymerase in den neu gebildeten RNA-Strang ein C, für jedes C ein G, für jedes T ein A und - kleine Ausnahme - für jedes A ein U.



Das Projekt von Dr. Vallar sucht nach auf Lungenkrebszellen beschränkten mRNA-Spleißformen, die sich nicht nur potenziell zu einer vorzeitigen Diagnose, sondern insbesondere für eine gezielte Therapie eignen könnten.

Die mRNA ist der Bauplan der Proteine: Jeweils drei Basen kodieren für eine von 20 Aminosäuren, den Bausteinen der Proteine. Ist z. B. die Sequenz der mRNA CUU-AAG-GUG ... werden die Aminosäuren Leucin, Lysin, Valin ... verbunden. Fertig ist das Protein!

Aufbau verschiedener Proteine

Etwas komplizierter ist es trotzdem, denn die anfängliche Annahme, dass jedes Gen für nur ein Protein kodiert, ist falsch: Je nach Zelle und Entwicklungsstadium bestimmt das gleiche Gen den Aufbau verschiedener Proteine. Ein vielzitiertes Beispiel ist das DSCAM-Gen: Es kodiert für insgesamt 38 000 Proteine.

Wie ist das möglich, bleibt doch die DNA immer die gleiche? „In der DNA folgen sogenannte Exon- und Intron-Sequenzen aufeinander, Erstere kodieren für Proteine, Letztere nicht. Bei der Bildung von

mRNA werden zuerst beide kopiert, dann wird die mRNA gespleißt: Die Introns werden entfernt und die Exons verbunden. Erst dann beginnt der Bau der Proteine“, erklärt Vallar.

Doch es wird noch komplexer, denn viele Zellen betreiben alternativen Spleißens. So kann für eine bestimmte mRNA z. B. der Exon 4 zusätzlich zu den Introns weggeschnitten werden, in einer anderen aber die Exons 6 und 7. Ändert sich die Reihenfolge der Basen in der mRNA, ändert sich auch die Sequenz der Aminosäuren, und somit die Struktur und die Funktion des entstehenden Proteins.

Gestörter natürlicher Prozess

In Krebszellen ist dieser natürliche Prozess gestört. Hier werden manche mRNAs falsch zusammengespleißt; es folgt eine Vielzahl von außergewöhnlichen Proteinen, mit

zum Teil verheerenden Funktionen. Einen solchen Prozess untersucht das Team um Vallar, genauer: „Unser Projekt sucht nach auf Lungenkrebszellen beschränkte mRNA-Spleißformen, denn diese könnten sich nicht nur potenziell zu einer vorzeitigen Diagnose, sondern insbesondere für eine gezielte Therapie eignen“, so Vallar.

Dabei untersucht das Team im CRP Santé verschiedene Aspekte: Zuerst wird die mRNA aus bei Operationen isolierten menschlichen Krebszellen mit der von gesunden Lungenzellen verglichen. Dann werden Krebszellen in Mäuse implantiert, wo sie weiter wachsen. Dann werden sowohl die Krebszellen als auch die sie umgebenden Maus-Zellen entnommen und analysiert, um Einflüsse des Umfelds auf die Krebsgeschwülste zu bestimmen. Bei jeder Probe müssen Abertausende verschiedener Spleißformen identifiziert und

verglichen werden. Diese phänomenale Leistung kann nur mit Hilfe modernster Technologie gemeistert werden: dem Microarray oder Biochip. Einen „simplen“ Chip kann man sich folgendermaßen vorstellen: Auf eine ungefähr 2 cm² messende Fläche werden 44 000 Mini-Tropfen aufgesetzt. In jedem dieser Tropfen, genannt Sonden, befinden sich speziell bearbeitete DNA-Fragmente. Sie bestehen aus nur einem Strang, gebildet aus Teilssequenzen eines spezifischen Gens. Auf kleinstem Raum befinden sich nun Proben des gesamten menschlichen Genoms.

Auch die zu untersuchende mRNA wird speziell präpariert. In einer enzymatischen Reaktion wird aus den Zellen extrahierte mRNA vervielfältigt und mit fluoreszierenden Stoffen verbunden. Chip und mRNA-Mischung kommen einige Stunden lang in einen Inkubator, in dem sich die mRNA mit der ihr komplementären DNA auf dem Chip verbindet.

Nun wird die Fluoreszenz analysiert: Je stärker eine spezifische Sonde leuchtet, umso mehr mRNA wurde an der ihm zugehörigen Sonde gebunden. Das Leuchtsignal ergibt also eine quantitative Bestimmung der relativen Menge jeder Art mRNA, die in spezifischen Zellen erhalten war. Dies wiederum erlaubt einen Rückschluss darauf, wie viel mRNA an einem bestimmten Gen hergestellt wurde.

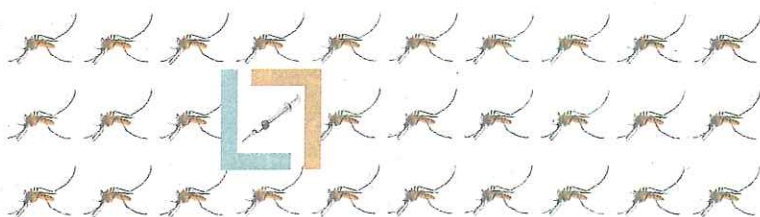
Aussagekräftige Chips

Die in Vallars Studie genutzten Chips sind noch aussagekräftiger: Sie haben nicht nur eine Sonde pro Gen, sondern bis zu vier verschiedene Sonden pro Exon, insgesamt 6,5 Millionen Sonden auf einer Fläche von weniger als 2,2 cm²! Die Analyse der mRNA in einem solchen Microarray erlaubt den Wissenschaftlern nicht nur, herauszufinden, welche Gene in der Zelle aktiv waren, sondern auch, welche Spleißformen produziert wurden.

Um die Komplexität dieses Prozesses zu illustrieren, reichen folgende Werte: Das Team benötigt zwei Tage, um die erforderliche RNA zu präparieren, braucht jedoch Wochen für die Computeranalyse der Resultate. Der Aufwand ist enorm, man sucht die sprichwörtliche Nadel im Heuhaufen. Doch sollten im Endeffekt auch nur einige wenige relevante mRNAs gefunden werden, könnte dies doch ein großer Schritt für die Lungenkrebsforschung sein.



Dr. Laurent Vallar (2.v.r.) und sein Team. (FOTOS: FNR)



D'Fuerschung zu Lëtzebuerg.
Fir lech. Fir Äert deegtecht Liewen.

Fonds National de la
Recherche Luxembourg

www.fnr.lu

INVESTIGATING FUTURE CHALLENGES