Neue Perspektiven in der DNS-Diagnostik von Infektions- und Erbkrankheiten

Autor(en): **Steinmetz, Michael**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Jahresbericht / Schweizerische Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Rapport annuel / Académie Suisse des Sciences Médicales = Rapporto annuale /Accademia Svizzera delle Scienze Mediche = Annual report / Swiss Academy of Medical Sciences**

Band (Jahr): **- (1989)**

PDF erstellt am: **27.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-308352

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

NEUE PERSPEKTIVEN IN DER DNS-DIAGNOSTIK VON INFEKTIONS- UND ERBKRANKHEITEN

MICHAEL STEINMETZ

Seit mehreren Jahren werden DNS-Sonden in Forschungslaboratorien zur Analyse von Infektions- und Erbkrankheiten eingesetzt. Methoden zum Nachweis bestimmter Nukleinsäure-Sequenzen mittels DNS-Sonden wurden bereits vor 20 Jahren entwickelt und beruhen auf der Komplementarität der beiden Stränge einer DNS-Doppelhelix. Die komplementären Stränge können miteinander assoziiert als doppelsträngige Moleküle oder dissoziiert in einzelsträngiger Form vorliegen. Die Dissoziation (Denaturierung) kann auch im Reagenzglas vorgenommen werden, und komplementäre Einzelstränge können durch Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen wieder in doppelsträngige Form überführt werden. Diesen Prozess nennt man Hybridisierung. Wird die Hybridisierung in Gegenwart eines radioaktiv markierten, einzelsträngigen DNS-Moleküls (DNS-Sonde) vorgenommen, das komplementär zur fraglichen Nukleinsäure ist, so erlaubt die Bildung eines doppelsträngigen Moleküls aus DNS-Sonde und Test-DNS den Rückschluss auf die Anwesenheit des zu diagnostizierenden Nukleinsäure-Moleküls im Untersuchungsmaterial.

Im Gegensatz zu klassischen Methoden der Diagnose von Krankheitserregern (morphologische Veränderungen, mikrobiologischer Nachweis, enzymatische und serologische Verfahren) sind DNS-Sonden deshalb interessant, weil sie latente Krankheitserreger erfassen können, die anders gar nicht oder nur schwer identifizierbar sind [1]. Trotz dieses unbestreitbaren Vorteils werden DNS-Sonden für die medizinische Diagnostik in der Klinik heute noch nicht im breiten Massstab eingesetzt. Die wesentlichen Gründe dafür sind methodischer Art und liegen in der Problematik der Aufarbeitung von Nukleinsäuren aus komplexen klinischen Materialien, der technisch anspruchsvollen Methode der Hybridisierung, der langen Testzeit, der Verwendung von radioaktiven Detektionsverfahren, der häufig nicht ausreichenden Sensitivität und der Problematik in der Auswahl geeigneter DNS-Sonden.

Eine neue Methode zur Vervielfältigung spezifischer Nukleinsäuren *in vitro* hat jedoch einige dieser Probleme gelöst [2]. Es handelt sich hierbei um die sogenannte «Polymerase Chain Reaction (PCR)», die 1985 von Wissenschaftlern der Firma Cetus entwickelt wurde. In den wenigen Jahren seit ihrer Verwendbarkeit hat sich diese Methode einen breiten Platz sowohl in der medizinischen und biologischen Grundlagenforschung als auch in der angewandten Forschung erobert.

Die PCR-Technologie ist heute aus dem modernen molekularbiologischen Instrumentarium nicht mehr wegzudenken und ein ebenso wichtiges Werkzeug geworden wie Restriktionsenzyme, Southern blots, radioaktive Isotope und monoklonale Antikörper. PCR erlaubt es, definierte Bereiche der Nukleinsäuren von Viren, Bakterien, Parasiten oder von menschlichen Genen selektiv in wenigen Stunden millionenfach im Reagenzglas zu vermehren. Bis auf bestimmte Ausnahmen abgesehen, waren solche Vervielfältigungen bisher nur durch mehrere Tage dauernde Klonierungsexperimente in Bakterien möglich und damit zu aufwendig, um für diagnostische Zwecke eingesetzt zu werden. PCR ist sensitiv genug, um ein DNS-Molekül, also etwa 10^{-18} g DNS, zu sichtbaren Mengen, etwa 10^{-7} g DNS, zu amplifizieren.

Zum Einsatz der PCR-Technologie muss ein Teil der zu amplifizierenden DNS-Sequenz bekannt sein. Diese Sequenz wird benötigt, um zwei sogenannte «Oligonukleotid-primer», also kurze Stücke einzelsträngiger DNS, chemisch zu synthetisieren, die die Neusynthese der gewünschten DNS-Sequenz unter geeigneten Reaktionsbedingungen einleiten. Gewöhnlich werden diese «Oligonukleotid-primer» so gewählt, dass sie nur einige wenige hundert Basenpaare voneinander entfernt an die komplementären Stränge der zu amplifizierenden DNS-Sequenz hybridisieren. Zugabe von DNS-Polymerase und Nukleotidbausteinen zu dem Reaktionsgemisch führt zur Synthese von zwei neuen DNS-Strängen. Denaturierung der so entstehenden Doppelstrangbereiche durch Erhöhung der Temperatur und erneutes Starten der Reaktion durch Temperaturerniedrigung in Anwesenheit eines Überschusses an «primer» und Nukleotiden führt im zweiten Schritt bereits zur Synthese von vier neuen DNS-Strängen. Die folgenden Reaktionszyklen führen zur Synthese von 8, 16, 32 usw. neuen DNS-Strängen, also zu einer exponentiellen Zunahme der synthetisierten DNS und zu einer starken Anreicherung eines doppelsträngigen DNS-Fragments, dessen Länge durch die Position der beiden «primer» bestimmt wird. Das so amplifizierte DNS-Fragment kann anschliessend aufgrund seiner definierten Länge oder über Hybridisierung mit DNS-Sonden nachgewiesen werden, die komplementär zu internen Sequenzen der amplifizierten Region sind.

Gerade für die medizinische Diagnostik besitzt die PCR-Methode erhebliche praktische Bedeutung, die sich von der Erfassung von Infektionskrank-

heiten, Erbkrankheiten, Risikoallelen und Krebs bis hin zu gerichtsmedizinischen Aspekten, wie der Aufklärung von Vaterschaftsverhältnissen und der Analyse von biologischem Beweismaterial erstreckt. Eine Reihe von Anwendungsbeispielen wurde in der wissenschaftlichen Literatur in den vergangenen vier Jahren beschrieben.

Im Januar 1989 wurde ein exklusives Abkommen zwischen Cetus und Hoffmann-La Roche geschlossen, das vorsieht, die neuartige PCR-Technologie zur Erforschung, Entwicklung und Vermarktung von in vitro-Reagenzien und Dienstleistungen im Bereich der Humandiagnostik einzusetzen. Der Übergang der PCR-Technologie von ihrer Anwendung als Forschungswerkzeug im Labor zur breiten Anwendung in der medizinischen Diagnostik wird sich stufenweise vollziehen. Zunächst werden Service-Laboratorien (Roche Biomedical Laboratories) die PCR-Technologie als Dienstleistung für die Erfassung bestimmter Infektions- und Erbkrankheiten anbieten. Erst später, wenn die Methode ausreichend automatisiert ist, denkt man daran, in vitro-Reagenzien mit den entsprechenden Instrumenten für die medizinische Diagnostik auf dem Markt anzubieten.

1 Steinmetz, M.: DNS-Sonden in der medizinischen Diagnostik. Ärztl. Lab. *34*, 307–313 (1988).
2 Steinmetz, M.: Neue Perspektiven in der DNS-Diagnostik von Infektions- und Erbkrankheiten. Therapiewoche Schweiz, im Druck.