

1 Einführung

(Th. Mothes)

Das Fachgebiet der *Klinischen Chemie* (Synonym: Klinische Biochemie) beschäftigt sich mit der Erforschung chemischer Aspekte des menschlichen Lebens in Gesundheit und Krankheit (*Pathologische Biochemie, Pathobiochemie*) und der Entwicklung chemisch-analytischer Methoden für Diagnose und Therapiekontrolle (*Labordiagnostik*). Die Pathobiochemie befaßt sich mit der Untersuchung der molekularen Ursachen von Krankheiten (*Ätiologie*) sowie der Kausalkette von den Ursachen bis zur klinischen Symptomatik (*Pathogenese*).

Eine Krankheit liegt vor bei objektivem oder subjektivem Bestehen körperlicher oder geistig-seelischer Störungen bzw. Veränderungen. Die Schwierigkeit der Definition des Krankheitsbegriffs liegt unter anderem in der Frage begründet, worin und innerhalb welcher Grenzen ein Normalzustand (Gesundheit) besteht. In der Dynamik des Stoffwechselfgeschehens sind die Begriffe Gesundheit und Krankheit als fließender Übergang zu sehen.

Das Altern selbst ist ein zumindest partiell beeinflussbarer Prozeß, der von der Konzeption bis zum Tode reicht und einen gesetzmäßigen Wandel von Struktur und Funktion in Abhängigkeit von der Zeit bedeutet.

Krankheiten können durch endogene und / oder exogene Faktoren verursacht werden. Endogene Faktoren bestehen in Veränderungen der DNA (Mutationen), die als Gendefekte über die Keimzellen an die nächste Generation weitergegeben werden. Diese DNA-Veränderungen können unterschiedlichen Krankheitswert besitzen, je nachdem, wie stark die Struktur und Funktion des kodierten Genprodukts von der Mutation beeinflusst wird. Neben den Mutationen kommen genetische Polymorphismen vor, die häufig für sich allein keine oder nur eine geringe pathogene Bedeutung besitzen, aber in Zusammenarbeit mit exogenen Faktoren Krankheitswert erlangen können. Exogene Faktoren können sowohl physikalischer, chemischer oder biologischer Natur sein. Exogene Faktoren können z. B. als Mutagene auf die DNA, als Antigene auf das Immunsystem, als Sinnesreize auf die Sinnesorgane, als Energieträger auf die Regulation des Körpergewichts oder als Liganden auf Konformation und Funktion spezifischer Bindungspartner wirken.

Mit der Aufdeckung physikalischer, chemischer oder biologischer Ursachen für Erkrankungen ist oft noch nicht der erste Auslöser beschrieben. So werden zum Beispiel Ethanol bzw. die Inhaltsstoffe des Tabakrauchs häufig als wichtige (chemische) Ursachen für Leberzirrhose und Pankreatitis bzw. für Lungenkrebs beschrieben, ohne entsprechende in der Kausalkette weiter vorn liegende soziale Ursachen mit in Betracht zu ziehen.

Klinisch definierte Krankheiten stellen in den meisten Fällen keine Entitäten dar, sondern sind, pathobiochemisch betrachtet, heterogen. So kann ein genetischer Defekt durch verschiedene Mutationen ausgelöst worden sein, die für eine unterschiedliche Ausprägung der Krankheit verantwortlich sind. Im Falle der Mucoviscidose, die eine durch einen einzigen Gendefekt bedingte (monogene) Krankheit darstellt, wurden über 400 verschiedene Mutationen gefunden, die unterschiedliche klinische Muster bedingen. Am 8. Juli 2002 waren über 13.761 monogene Defekte bekannt (Datenbank Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM, Natio-

nal Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, Bethesda, USA, 2002). Daneben werden jedoch viele Krankheiten polygen-multifaktoriell (z. B. Atherosklerose) ausgelöst. Diese Krankheiten haben eine hohe Komplexität und Variabilität (unterschiedlicher Anteil der einzelnen Faktoren bei verschiedenen Patienten), was die Erforschung ihrer Ätiopathogenese erschwert. Selbstverständlich sind auch maligne Tumore pathobiochemisch nicht einheitlich. Der Prozeß der malignen Transformation von Zellen ist das Ergebnis von mehreren Mutationen, die dieselbe Zelle treffen müssen, wobei die Kombination der einzelnen Mutationen unterschiedlich sein kann.

Durch den Wechsel von Umweltbedingungen können auch die Ursachen von Krankheiten wechseln. Während bis in die jüngere Vergangenheit Hunger, Raubtiere und Infektionskrankheiten häufige Bedrohungen darstellten, spielen heute in der westlichen Welt chronische Erkrankungen, die sich aus der Lebensweise und dem höheren Alter ergeben (zum Beispiel Atherosklerose, Krebs, nicht insulinabhängiger Diabetes, Adipositas) eine entscheidende Rolle. Einige Störungen stellen Kompromisse zwischen Vor- und Nachteilen dar: So resultiert Gicht aus dem hohem Spiegel an Harnsäure im Blut, die gleichzeitig als hochwirksames Antioxidans und damit als Radikalfänger fungiert. Eine starke Immunabwehr richtet ständig geringfügige Schäden im Gewebe an und könnte so zum Altern beitragen. Träger verschiedener Mutationen (Sichelzellanämie, Mucoviscidose) besitzen im heterozygoten Zustand unter bestimmten Umweltbedingungen (Malaria, Typhus) Vorteile, während der Defekt im homozygotem Zustand schwere Schäden hervorruft.

Nicht jede Störung muß, unter gegebenen Umweltbedingungen, Krankheitswert besitzen. Die Rot-Grün-Farbenblindheit, eine X-chromosomal vererbte Störung, wird im allgemeinen nicht als Krankheit betrachtet, da sie nur mit geringen Nachteilen behaftet ist. Deshalb tritt sie auch sehr häufig auf (8 % aller männlichen und 0,4 % aller weiblichen Personen). Eine Störung kann jedoch bei Änderung der Umweltbedingungen zum Nachteil werden (man stelle sich zum Beispiel eine nichtangekündigte nächtliche Umstellung der Verkehrsampeln vor). Die Veranlagung zu guter Nahrungsverwertung ist in der westlichen Welt heutzutage – unter unrestringierter Nahrungszufuhr – ein Nachteil (Adipositas), während sie unter Bedingungen chronischen Nahrungsmangels in der Vergangenheit einen Vorteil darstellte.

Mit den zunehmenden Möglichkeiten diagnostischer Verfahren können nicht nur Krankheiten erkannt werden, die eine ausgeprägte Symptomatik besitzen, sondern auch schwächer verlaufende Formen, die für die betroffenen Personen subjektiv teilweise nur gering oder überhaupt nicht spürbar sind. Ein Beispiel dafür sind Personen mit pathologischer Glucosetoleranz ("impaired glucose tolerance", IGT). Diese Personen können mit dem oralen Glucosetoleranztest erfaßt werden. Personen mit IGT haben ein erhöhtes Risiko, nichtinsulinabhängigen Diabetes zu entwickeln. Unabhängig davon besteht bei IGT ein erhöhtes Risiko für makrovaskuläre Erkrankungen. Man stellt sich deshalb viele Erkrankungen als Eisberge vor, von denen nur die Spitze klinisch sichtbar ist. Es hat sich aber gezeigt, daß auch die milden Formen (der Teil des Eisbergs unter der Wasserlinie) Krankheitswert besitzen, obwohl sie subjektiv nicht spürbar sind. Deshalb kommt es darauf an, auch die milden Formen zu entdecken, damit sie behandelt werden können. Das Eisbergkonzept ist inzwischen für viele Krankheiten akzeptiert. Mit der Aufdeckung milder Krankheitsformen nimmt die Krankheitshäufigkeit scheinbar zu: Auf einen Patienten mit klinisch manifester Zöliakie (1:1000), einer Unverträglichkeit von Eiweißen aus Weizen und verwandten Getreiden, kommen mindestens drei Personen mit sogenannter silenter Zöliakie, die aufgrund eines erhöhten Malignomrisikos diagnostiziert wer-

den sollten. Die hereditäre Hämochromatose ist eine Eisenspeicherkrankheit, die sich erst mit fortschreitendem Alter manifestiert. Mit der vor kurzem erfolgten Entdeckung des gestörten Gens wird es möglich sein, Personen, die den Defekt tragen, klinisch aber (noch) nicht manifest sind, zu identifizieren und eine Behandlung zu ermöglichen, die die normale Lebenserwartung wiederherstellt.

Krankheiten stellen Modellbeispiele für veränderte Stoffwechselsituationen dar. Die Aufklärung der Ursachen von Krankheiten tragen deshalb zur Verbesserung des Verständnisses normaler Lebensprozesse dar. So konnten die Mechanismen des Chlorid- und Wassertransports über Zellmembranen besser verstanden werden, nachdem das bei Mucoviscidose defekte Gen und sein Genprodukt, der "cystic fibrosis transmembrane regulator" (CFTR), ein Chloridkanal, gefunden wurde. Die Aufklärung des bei hereditärer Hämochromatose mutierten Gens verspricht neue Einsichten in die Regulation des Eisenstoffwechsels.

Entsprechend der Komplexität der Ätiopathogenese der verschiedenen Krankheiten ist es nicht möglich, diese systematisch so darzustellen, daß es für die Beschreibung jeder Störung jeweils einen definierten Platz gibt. Dementsprechend sind viele unterschiedliche Gliederungen möglich (organbezogen, stoffgruppenbezogen, funktionell usw.) und Überschneidungen zwischen den einzelnen Kapiteln unvermeidbar. So könnten die Störungen beim Altersdiabetes im Zusammenhang mit anderen endokrinologischen Erkrankungen, dem Kohlenhydratstoffwechsel, aber auch dem Stoffwechsel anderer Stoffgruppen (Lipide usw.) oder z. B. organbezogen im Zusammenhang mit dem Pankreas dargestellt werden.

Die Darstellung in diesem Buch folgt der Gliederung nach dem Gegenstandskatalog. Notwendigerweise auftretende Überschneidungen sollen dem Leser Anlaß sein, interessante Querverbindungen aufzufinden.

2 Nukleinsäuren

(Th. Mothes und Th. Köhler)

Die DNA ist der Träger der genetischen Information. Das menschliche Genom enthält 3 Milliarden Basenpaare, von denen jedoch nur etwa 1,5 % Information für etwa 30.000 Gene tragen. Treten infolge von Mutationen Veränderungen des genetischen Materials in den Keimzellen auf, können genetisch bedingte Erkrankungen (monogen, polygen-multifaktoriell) entstehen. Mutationen sind außerdem die Ursache der malignen Transformation (siehe Kap. 3). Bei einer Reihe von Tumoren können auch vererbte Mutationen nachgewiesen werden. Die meisten Gene treten in mehreren allelen Formen auf (genetischer Polymorphismus), die, meist im Zusammenwirken mit Umwelttoxinen, unterschiedlichen Krankheitswert besitzen können. Unter den Störungen des Nukleinsäurestoffwechsels besitzen Defekte des Abbaus von Purinen eine große Bedeutung (Hyperurikämie, Gicht).

2.1 Genetische Defekte

Genetisch bedingte Erkrankungen können durch Ausfall eines einzigen Gens hervorgerufen werden (monogene Defekte). Von den zur Zeit mehr als 13.000 bekannten monogen bedingten Erkrankungen sind aber noch nicht alle molekular aufgeklärt. Neben den monogenen Defekten spielen polygen bedingte Erkrankungen, häufig in Zusammenwirkung mit Umweltfaktoren, eine große Rolle. Die für Gendefekte verantwortlichen Mutationen können durch Fehler bei der DNA-Replikation und -reparatur, energiereiche Strahlung, Chemikalien, Viren und transponierbare Elemente ausgelöst werden. Bei manchen Mutationen macht sich eine Unterfunktion im Phänotyp bereits bemerkbar, wenn im heterozygoten Zustand noch 50 Prozent der normalen Produktmenge gebildet wird (dominante Mutation). In einigen dominanten Mutationen kommt es durch Zunahme repetitiver Trinukleotidsequenzen in codierenden oder nicht-codierenden (Fragiles X-Syndrom) Genabschnitten von Generation zu Generation (Antizipation) zu Hyperstabilität der gebildeten mRNA (Chorea Huntington) bzw. mitotischer Instabilität des Genlocus (Fragiles X-Syndrom). Andere Mutationen wirken sich auf den Phänotyp erst aus, wenn Menge oder Funktion des gebildeten Genprodukts auf unter fünf bis zehn Prozent absinkt (rezessive Mutation). Auch innerhalb eines Gens sind Mutationen mit unterschiedlicher Lokalisation und unterschiedlicher Auswirkung auf Expression und Funktion des entsprechenden Genprodukts möglich. Treten bei einem Patienten beim gleichen Gen auf beiden Chromosomen unterschiedliche Mutationen auf, spricht man von Compound-Heterozygotie, bei der die Symptomatik sehr unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann. Es ist zu beachten, daß nicht nur der Ausfall von Genen, sondern auch eine Genüberdosis pathologische Folgen haben kann (Morbus Down und balancierte Robertson-Translokation). Ist die Mutation auf dem X-Chromosom lokalisiert, erfolgt die Weitergabe des Defekts geschlechtsgebunden. Dabei sind nur Männer phänotypisch betroffen. Frauen tragen den Defekt normalerweise heterozygot und treten dann als Konduktorinnen auf. Nur im seltenen Falle der Homozygotie sind auch Frauen klinisch betroffen. In Tabelle 2/1 sind einige wichtige genetische Defekte aufgeführt.

Tab. 2/1: Beispiele für monogen bedingte Erbkrankheiten

Krankheit	Gendefekt	Häufigkeit	Erbgang	Symptome
Hämophilie A	Gerinnungsfaktor VIII	1:10.000	X	Gerinnungsdefekt
Hämophilie B	Gerinnungsfaktor VII	1: 60.000	X	Gerinnungsdefekt
Sichelzellanämie	β -Kette des Hämoglobins A	1:700 (Schwarze)	AR	Homozygot hämolytische Anämie mit Kapillarverstopfung, heterozygot Malariaresistenz
Kongenitale hämolytische Anämie	Glucose-6-phosphat-dehydrogenase Typ A ¹	400 Mill. (Schwarze)	X	Arzneimittelinduzierte Hämolyse, heterozygot Malariaresistenz
	Glucose-6-phosphat-dehydrogenase Typ B ² (Favismus)	Mittelmeerraum regional 2-7 %	X	Arzneimittelinduzierte Hämolyse, heterozygot Malariaresistenz
Phenylketonurie*	Phenylalaninhydroxylase	1:10.000	AR	Geistige Behinderung
Glycogenspeicherkrankheiten	Typ Ia: Glucose-6-phosphatase	1:100.000	AR	Hypoglykämie, Laktatazidose, Hyperlipidämie
Adrenogenitales Syndrom	21 β -Hydroxylase ³	1:7.500	AR	Virilisierung, häufig auch Salzverlustsyndrom
Mukoviszidose (Zystische Fibrose)	Cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) ⁴	1:2.500	AR	Störung der Chlorid- und damit der Wassersekretion, zähflüssige Sekrete
Chorea Huntington	Huntingtin ⁵	1:2.500	AD	Hirnatrophie, Demenz
Fragiles X-Syndrom	Produkt des fragilen X-Mental-Retardation-1-Gens ⁵	1:2.500	X	Häufigste bekannte Ursache mentaler Retardierung nach dem Down-Syndrom
Familiäre Hypercholesterolämie	LDL-Rezeptor	1:500 (Heterozygote)	AD	Erhöhtes Atheroskleroserisiko
Faktor-V-Leiden	Faktor-V ⁶	1:20 (heterozygot)	AD	Häufigste Ursache für venöse Thrombosen
Hereditäre Hämochromatose	HFE-Protein	1:400 (Homozygote)	AR	Eisenspeicherung in Leber und anderen Organen, Zirrhose, heterozygot Schutz vor Eisenmangel
Lesch-Nyhan-Syndrom	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase ⁷	?	X	Hyperurikämie, Gicht, neurologische Symptome

AR: autosomal rezessiv, AD: autosomal dominant, X: X-chromosomal, *siehe Kapitel 3, 1: Genaktivität 15 %, 2: Genaktivität < 1%, 3: neben den klassischen Formen kommen mit größerer Häufigkeit auch milde Defekte vor, 4: ca. 400 verschiedene Mutationen, 5: Trinucleotid-Expansion, 6: die prokoagulatorische Aktivität dieser Faktor-V-Variante ist unverändert, aber infolge einer Punktmutation schlechtere proteolytische Inaktivierung durch Protein C, 7: Restaktivität des Enzyms nur 1,5 %, beim Kelley-Seegmiller-Syndrom höhere Restaktivität von 8 %

2.2 Genetische Polymorphismen

Unter genetischen Polymorphismen versteht man die Existenz von mehr als einer Form eines bestimmten Gens, wobei die Häufigkeit der seltenen Allele mindestens 1 % beträgt. Ein bekanntes Beispiel sind die HLA-Gen-Polymorphismen. Die verschiedenen polymorphen Formen eines Gens können allein oder zusammen mit Umweltfaktoren Krankheitswert besitzen oder zu Krankheiten prädisponieren (Tab. 2/2). Die Zahl bekannter Polymorphismen mit Krankheitswert wird immer größer.

Im Mittel findet man im humanen Genom alle 1000 Basen einen Polymorphismus, bedingt durch den Austausch einer einzelnen Base ("single nucleotide polymorphism" oder SNP). Diese Polymorphismen müssen nicht selber Krankheitswert besitzen, können aber als Marker für benachbarte, mit Krankheiten assoziierte Genabschnitte verwendet werden. Insgesamt ist mit Millionen unterschiedlicher SNPs zu rechnen, jeder Mensch ist heterozygot für etwa 30.000 SNPs. Nach der Aufklärung des genetischen Codes des Menschen kommt es jetzt darauf an, eine große Zahl humaner Gensequenzen miteinander zu vergleichen und eine Bibliothek humaner SNPs zu erstellen, die dann zur Identifizierung krankheitsrelevanter Gene eingesetzt werden können.

Tab. 2/2: Beispiele für genetische Polymorphismen mit pathobiochemischer Bedeutung

Polymorphes Genprodukt	Funktion	Krankheitsassoziation	Umweltfaktor
Cytochrom P450-Familie	Biotransformation	Tumorprädisposition	Kanzerogene
Acetaldehydehydrogenase	Umwandlung von Acetaldehyd (aus Ethanol) in Acetat	Alkoholsensitivität	Ethanol
Pseudocholinesterase	Spaltung von Cholinestern	Verzögerung des Abbaus von Muskelrelaxantien	Arzneimittel (Succinylcholin)
UDP-Glucuronyltransferase	Glucuronidierung von Bilirubin	Gilbert-Syndrom	
α_1 -Antitrypsin	Proteaseinhibitor	Hepatitis, Lungenemphysem	Rauchen
Apoprotein E	Abbau Cholesterolanreicherter Apolipoprotein-Partikel	Atherosklerose	Ernährung

2.3 Methoden der Nukleinsäure-Diagnostik

Mit Hilfe der klassischen Zytogenetik lassen sich unter Nutzung geeigneter Färbemethoden strukturelle Chromosomenveränderungen im Megabasenbereich (größere Deletionen, Inversionen, Translokationen) bereits lichtmikroskopisch erfassen (Metaphase-Chromosomen). Dabei werden veränderte Bänderungen der Chromosomen nachgewiesen. Kleinere Mutationen bis hin zur Punktmutation lassen sich ausschließlich molekulargenetisch diagnostizieren.

Zur Diagnostik ist die Gewinnung von DNA aus fötalen Zellen (Chorionvillus- oder Amnionzellen) sowie zum Vergleich aus dem Blut von Eltern und Geschwistern erforderlich. Die gewonnene DNA wird mittels Restriktionsendonukleasen verdaut, die Bruchstücke elektrophoretisch aufgetrennt und auf die Oberfläche von Nylonmembranen gebロットet ("Southern blot"). Der Nachweis von DNA-Fragmenten, die spezifische Sequenzen enthalten, kann durch Oligonukleotidsonden erfolgen, die komplementär zur nachzuweisenden Sequenz sind und sich deshalb an diese binden ("Hybridisierung") (Abb. 2/1).

Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR, siehe PKCH 12) können aus minimalen DNA-Mengen oder revers transkribierter mRNA (sog. cDNA) bestimmte Fragmente gezielt mit sequenzspezifischen Primer-Oligonukleotiden und einer thermostabilen DNA-Polymerase zur weiteren Analyse amplifiziert werden.

Besteht Verdacht auf weniger häufige bzw. unbekannte Neumutationen, ist eine DNA-Sequenzierung (Analyse der Basensequenz) zur genauen Identifizierung und Lokalisation der Mutation unumgänglich.

2.3.1 Indirekte Methoden

Erbkrankheiten, bei denen die entsprechende Genmutation noch nicht bekannt ist, müssen indirekt diagnostiziert werden. Indirekte Methoden beruhen auf Ergebnissen sog. Kopplungsanalysen. Dazu werden "informative" polymorphe DNA-Abschnitte untersucht, die in der Nähe des mutierten Genabschnitts (innerhalb oder außerhalb des Gens) liegen und deshalb gekoppelt mit der Krankheit in der gleichen Familie weitervererbt werden. Von Interesse für die indirekte DNA-Analytik sind solche Polymorphismen, die im Bereich der Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen liegen. Der Polymorphismus entscheidet dann, ob eine spezifische Restriktase die DNA schneiden kann. Das Auftreten unterschiedlich langer DNA-Fragmente nach Restriktasebehandlung wird als Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) bezeichnet. Nach Restriktasebehandlung, Elektrophorese und Blotten auf Nylonmembranen werden die DNA-Fragmente mit einer Gensonde detektiert, die komplementär zu einer DNA-Markersequenz ist, die in den zu analysierenden Fragmenten auftritt. Die Länge der mit den Sonden nachweisbaren DNA-Fragmente ist hierbei gekoppelt an das Auftreten der nachzuweisenden Mutation (Abb.2/1). Voraussetzung für die indirekte DNA-Diagnostik ist, daß sowohl gesunde als auch und von der Krankheit betroffene Familienmitglieder zu Vergleichsuntersuchungen verfügbar sind. An diesen läßt sich erkennen, welche Fragmentlänge in der betreffenden Familie an die Krankheit "gekoppelt" ist. Aufgrund von Rekombinationsprozessen ("crossing over") kann es aber zur Aufhebung der Kopplung kommen. Indirekte DNA-Analysen sind deshalb Wahrscheinlichkeitsanalysen. Je weiter der Marker vom mutierten Genabschnitt entfernt ist, umso größer wird die Wahrscheinlichkeit einer Fehldiagnose (10 cM entsprechen 5 % Rekombinationshäufigkeit). Deshalb werden zunehmend direkte Nachweismethoden bevorzugt.

2.3.2 Direkte Methoden

Ist die Lokalisation einer Mutation in der DNA-Sequenz des krankheitsverursachenden Gens bekannt, können diese in fraktionierten DNA-Abschnitten nach Elektrophorese, Blotten und nachfolgender Hybridisierung mit allelspezifischen Oligonukleotiden direkt nachgewiesen werden. Allerdings kommen bei vielen genetischen Defekten unterschiedliche Mutationen im gleichen Gen vor, so daß mit allelspezifischen Oligonukleotiden häufig nicht alle, sondern nur die häufigsten Mutationen nachgewiesen werden können. Durch den Nachweis der vier wichtigsten Mutationen im Gen des CFTR können nur etwa 63 % aller Mukoviszidosepatienten diagnostiziert werden. Insgesamt wurden aber mehr als 300 verschiedene Mutationen im CFTR-Gen beschrieben! Die Suche nach weiteren Mutationen mittels direkter DNA-Analyse ist nicht sinnvoll, weil diese sehr selten sind. Zur Diagnose der restlichen Patienten muß deshalb des RFLP-Muster untersucht werden.

Alternativ können Gensonden auch zur Darstellung intakter Chromosomen eingesetzt werden. Hierzu werden speziell behandelte Zellen des Patienten auf einem Objektträger aufgebracht und mit einer fluoreszenzmarkierten DNA-Sonde, die komplementär zu einem Abschnitt des entsprechenden Ziel-Chromosoms ist, inkubiert. Mit dieser sog. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH-Technik) lassen sich Target-Chromosomen selektiv markieren. Vorteil der Methode ist, daß hiermit auch Interphase-Chromosomen dargestellt werden können. Unterliegt die Zielsequenz beispielsweise einer Deletion, kann die Sonde nicht am entsprechenden Chromosom binden und demzufolge kein Hybridisierungssignal liefern. Die FISH-Technik wird diagnostisch hauptsächlich zur Detektion von tumorassoziierten Chromosomen-Translokationen eingesetzt. So wird u. a. das Philadelphia-Chromosom [t(9;22)] nachgewiesen, das zu > 90% zur Pathogenese und Chemotherapieresistenz der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) und zu 25 % der Adulten Lymphoblastischen Leukämie (ALL) beiträgt.

An die Stelle der technisch sehr aufwendigen Hybridisierungstechniken treten aber zunehmend In-vitro-Amplifizierungstechniken, mit deren Hilfe mutierte Genabschnitte in großer Zahl aus geringsten Mengen von Untersuchungsmaterial hergestellt werden können. Sind die synthetisierten Abschnitte bereits per se informativ (d. h. Deletionen bzw. Insertionen führen zu nachweisbarer Veränderung der Größe der Fragmente), kann mit nachfolgender Elektrophorese direkt der Genotyp (homozygot/heterozygot) ermittelt werden (Abb.2/1). Wenn mehrere bekannte Mutationen in einem Gen gleichzeitig detektiert werden sollen, können auch mehrere, den verschiedenen Loci komplementäre Primerpaare simultan eingesetzt werden (sog. Multiplex-PCR). Zum Nachweis einfacher Basenaustausche wird häufig auf einen der Elektrophorese vorgelagerten Verdau des Amplifikats mit einer Restriktionsendonuklease zurückgegriffen, sofern die Mutation mit einer Veränderung einer enzymespezifischen Erkennungssequenz einhergeht. Anhand des erhaltenen Spaltmusters ist dann eine sichere Zuordnung des Genotyps möglich.

Moderne Analyse-Geräte erlauben sowohl Amplifikation als auch simultan ("Real-Time") die quantitative Messung von Wildtyp und mutierten DNA-Fragmenten direkt im Amplifikationsansatz.

Sollen einzelne Genombereiche auf unbekanntem Mutationen untersucht werden, kann die Heteroduplex-Analyse eingesetzt werden. Bei der Heteroduplex-Analyse werden zwei markierte Sonden eingesetzt, die entweder komplementär zur Wildtyp- oder zur mutierten DNA sind. Diese werden mit der zu untersuchenden DNA-Probe gemischt und hitzedenaturiert. Nach Abkühlen des Ansatzes entstehen Hybride zwischen Sonden und Zielsequenz, die vier verschiedene Kombinationsmöglichkeiten (2 Homo- und 2 Heteroduplices) erlauben. In der nachfolgenden Elektrophorese sind die Homo- und Heteroduplices aufgrund ihrer unterschiedlichen Schmelztemperaturen und damit unterschiedlichen Mobilität in Gel unterscheidbar (denaturierende Gradientengelelektrophorese, DGGE). Durch Untersuchung des "single-strand conformational polymorphism" (SSCP) werden hitzedenaturierte, einzelsträngige Ziel-DNA-Stränge analysiert. Da bereits einzelne Basenaustausche zu Konformationsänderungen im Molekül führen, sind die Wildtyp- und die mutierten Stränge aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsverhaltens in Polyacrylamid-Gelen klar abgrenzbar.

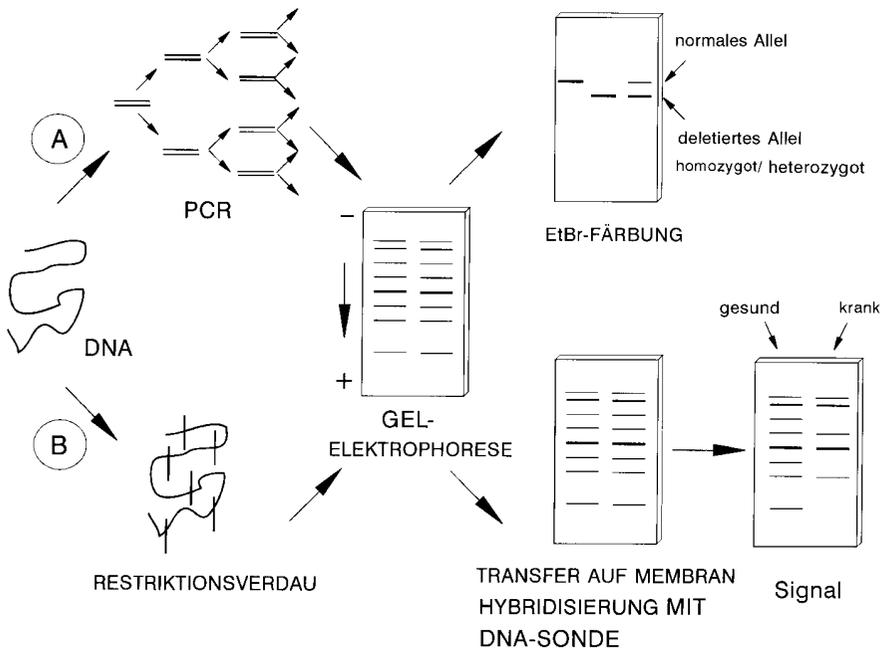


Abb.2/1: Nachweis genetischer Defekte.

(A) Amplifikation von DNA-Abschnitten, die gehäuft bekannten Mutationen unterworfen sind, mittels PCR: Deletionen innerhalb der untersuchten Sequenz führen zu verkürzten oder ganz fehlenden Amplifikationsprodukten;

(B) nach Fraktionierung der DNA, Elektrophorese und Transfer auf eine Trägermembran erfolgt der Mutationsnachweis nach Hybridisierung mit einer für den kritischen Bereich spezifischen Sonden (direkter Nachweis) oder einer Mutations-unspezifischen Sonden gegen einen familienspezifischen Kopplungsmarker (indirekter Nachweis).

2.3.3 Funktionelle Genomanalyse

Ziel der funktionellen Genomanalyse ist es, Expressionen von Genen (d.h. mRNA-Konzentrationen) in krankhaften menschlichen Geweben oder aus Erkrankungen simulierenden Tiermodellen mit der Expression in gesunden Geweben zu vergleichen. Neben klassischen molekulargenetischen Techniken, wie Northern-Blot Analyse oder quantitativer PCR wird der sog. DNA-Chip Technologie eine große Zukunft prophezeit, da mit dieser Technik parallel bis zu mehreren tausend aktive Gene (sog. Transkriptom) gemessen werden können. Herzstück der Genchip-Technologie sind hochintegrierte biomolekulare Arrays, auf denen eine Vielzahl verschiedener, jeweils ein Target erkennender DNA-Sonden angeordnet sind. Bereits heute ist es möglich, mit Hilfe von Photolithographie oder "Micro Printing" mehr als 10^6 verschiedene Sonden-Spots bei einem Miniaturisierungsgrad von $< 1 \mu\text{m}$ auf nur 1cm^2 Fläche (z. B. Siliziumchip oder Nylonmembran) unterzubringen. Derart miniaturisierte Analysensysteme stellen enorme Anforderungen an Detektion und Auswertesoftware und sind daher noch recht teuer. Dessen ungeachtet bestehen in der Zukunft vielversprechende Anwendungsmöglichkeiten in der molekularen Diagnostik von Infektionskrankheiten, beim chemisch-biologischen Screening, in der Resistenzanalyse von Tumoren sowie in der präklinischen und klinischen Pharmaka-Testung. Weiterhin wird es möglich sein, mit derselben Technologie universelle Polymorphismen-Analysen mit Hilfe von sog. "Resequencing-Chips" zu erstellen. Mit diesen hochintegrierten Arrays ist es heute schon möglich, beispielsweise das gesamte humane Mitochondriengenom mit Hilfe nur eines einzigen DNA-Chips zu sequenzieren.

2.4 Störungen des Purinstoffwechsel, Hyperurikämie und Gicht

Ausgangspunkt für Störungen des Basenstoffwechsels können einige seltene genetische Defekte sein. Im Purinstoffwechsel kommt es beim Mangel an Adenosindesaminase zum schweren kombinierten Immundefekt. Mangel an Orotsäurephosphoribosyltransferase bewirkt Rückstau von Orotsäure und verminderten Bildung von Pyrimidinen, die für die DNA-Synthese benötigt werden (megaloblastäre Anämie sowie körperliche und geistige Retardierung).

Eine wichtige Störung des Purinstoffwechsels ist die Hyperurikämie. Diese liegt bei einer Harnsäurekonzentration im Serum von mehr als $387 \mu\text{mol/l}$ vor. Der Harnsäurepool wird gespeist aus den Purinen der Nahrung sowie der Harnsäuresynthese. Harnsäure entsteht beim Abbau von Purinen aus Nukleinsäuren und Nukleotiden, kann aber auch ausgehend von Phosphoribosylpyrophosphat und Glutamin synthetisiert werden (siehe Abb. 2/2). Im Gegensatz zu anderen Tierarten kann beim Menschen Harnsäure oxidativ nicht zu weniger kritischen (besser löslichen) Abbauprodukten (Allantoin, Harnstoff) gespalten werden, sondern muß über den Gastrointestinaltrakt (20 %) und die Niere (80 %) ausgeschieden werden.

Harnsäure liegt im Blut (pH 7,4) im wesentlichen in der dissoziierten Form als Urat vor. Bei saurem pH-Wert, zum Beispiel im Harn, steigt der Anteil der undissoziierten Harnsäure (bei pH 5,7 beide Formen im Verhältnis 1:1). Die Löslichkeit der Harnsäure ist gering. Bei physiologischem pH-Wert und 37°C beträgt die Löslichkeitsgrenze $387 \mu\text{mol/l}$. Der Referenzbereich für Urat im Serum liegt zwischen 180 und $387 \mu\text{mol/l}$, also unmittelbar an der Löslichkeitsgrenze. Die Häufigkeit der Hyperurikämie beträgt in Deutschland mindestens 1 %. Hyperuri-

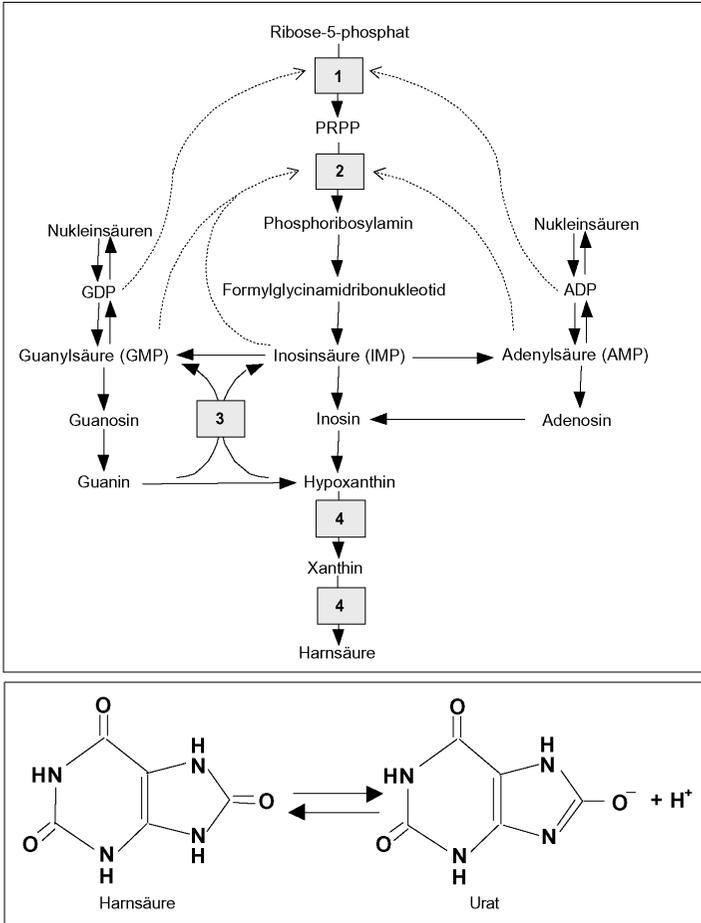


Abb.2/2: Synthese der Harnsäure:

Die ersten zwei Reaktionen (Bildung von Phosphoribosylpyrophosphat, PRPP) und nachfolgend von Phosphoribosylamin werden durch zwei Enzyme (1: Phosphoribosylpyrophosphat-synthetase, 2: Glutamin-phosphoribosyl-pyrophosphat-amidotransferase) katalysiert, die allosterisch regelbar sind (1: Hemmung durch ADP und GDP, 2: Hemmung durch AMP, IMP und GMP, siehe gestrichelte Pfeile). Durch die Hypoxanthin-guanin-phosphoribosyltransferase (3) können bereits oxidierte Basen geborgen werden, d. h. wieder in Purinmonophosphate rückgeführt werden ("salvage pathway"). Für diese Reaktion ist PRPP notwendig. Mangel an (3) führt über das Absinken der Konzentration von Purinmonophosphaten sowie von GDP und AMP zur verringerten Hemmung von (1) und (2) und damit zur verstärkten Produktion von Harnsäure. Die Mutation von (1) bewirkt entweder eine Überexpression dieses Enzyms oder daß dieses Enzym nicht mehr durch ADP und GDP gehemmt werden kann, was ebenfalls in erhöhter Harnsäurebildung resultiert. Die Xanthinoxidase (4) katalysiert sowohl die Umwandlung von Hypoxanthin in Xanthin als auch die weitere Reaktion zu Harnsäure. Die medikamentöse Hemmung von (4) kann bei Hyperurikämie therapeutisch ausgenutzt werden. Das sich rückstauende Hypoxanthin kann problemlos ausgeschieden werden.