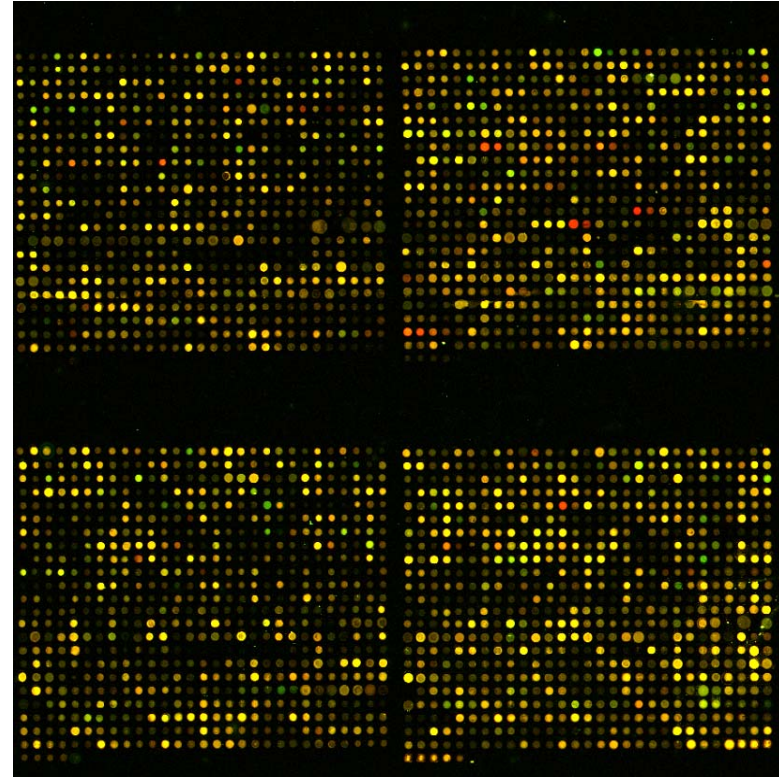


# BioChip-Microarrays: Grundlagenforschung und Chancen für die Krankheitsdiagnostik

Ruprecht Kuner

*Abteilung Molekulare Genomanalyse  
DKFZ Heidelberg*

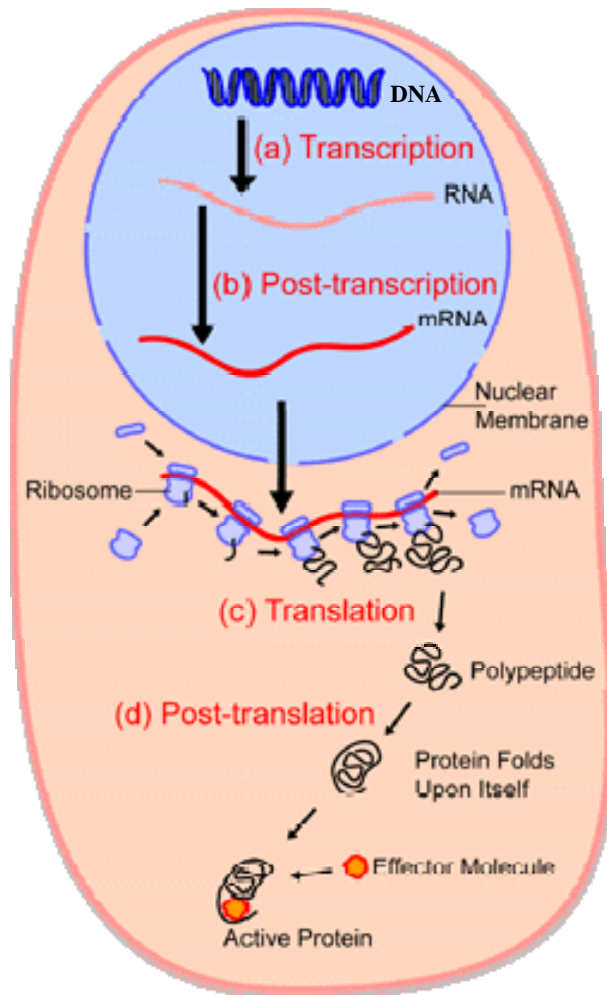


1. **Was ist ein Biochip / Microarray?**
2. **Mögliche Zielmoleküle in der Zelle**
3. **Anwendungsgebiete in der präklinischen Forschung**
4. **Durchführung eines Microarray-Experiment**
5. **Klinische Anwendungen - Nutzen für den Patienten**
6. **Weiterentwicklungen in dieser Technologie**

**Definition:** Miniaturisiertes Werkzeug mit dem simultan sehr viele biologische Moleküle untersucht werden können

Hochdurchsatz-Technologie bzw. „Lab-on-the-chip“

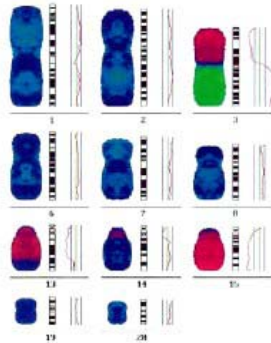
# Quantitative und Qualitative Analysen in der Zelle



- ➔ **DNA-Analyse**  
(Array-CGH, SNP)  
3.2 Gb / 23.-29.000 Gene  
15 Mio SNPs
- ➔ **Transkriptom-Analyse**  
(Oligo-, cDNA Microarrays)  
100.000 Transkripte /  
400.000 Exons  
1500 microRNAs
- ➔ **Protein-Analyse**  
(Antikörper-Arrays, Protein-Arrays)  
20.000 Proteine  
60.000 Varianten  
1 Mio Posttransl. Modifikationen

# Sammelbegriff Biochip

## DNA (Genom)



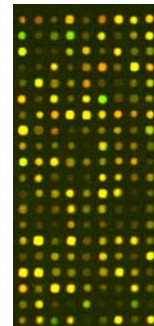
Matrix-CGH



Genotypisierung

Methylierung

## RNA (Genexpression)



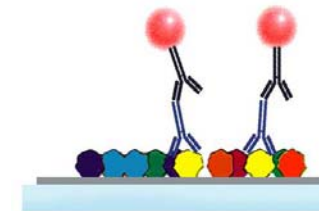
gespottet cDNA  
oder Oligo



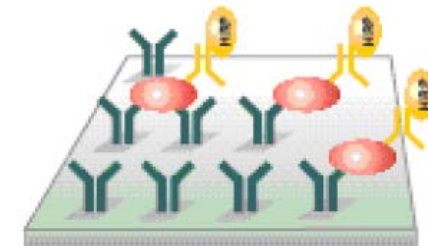
synthetisiert



## Protein

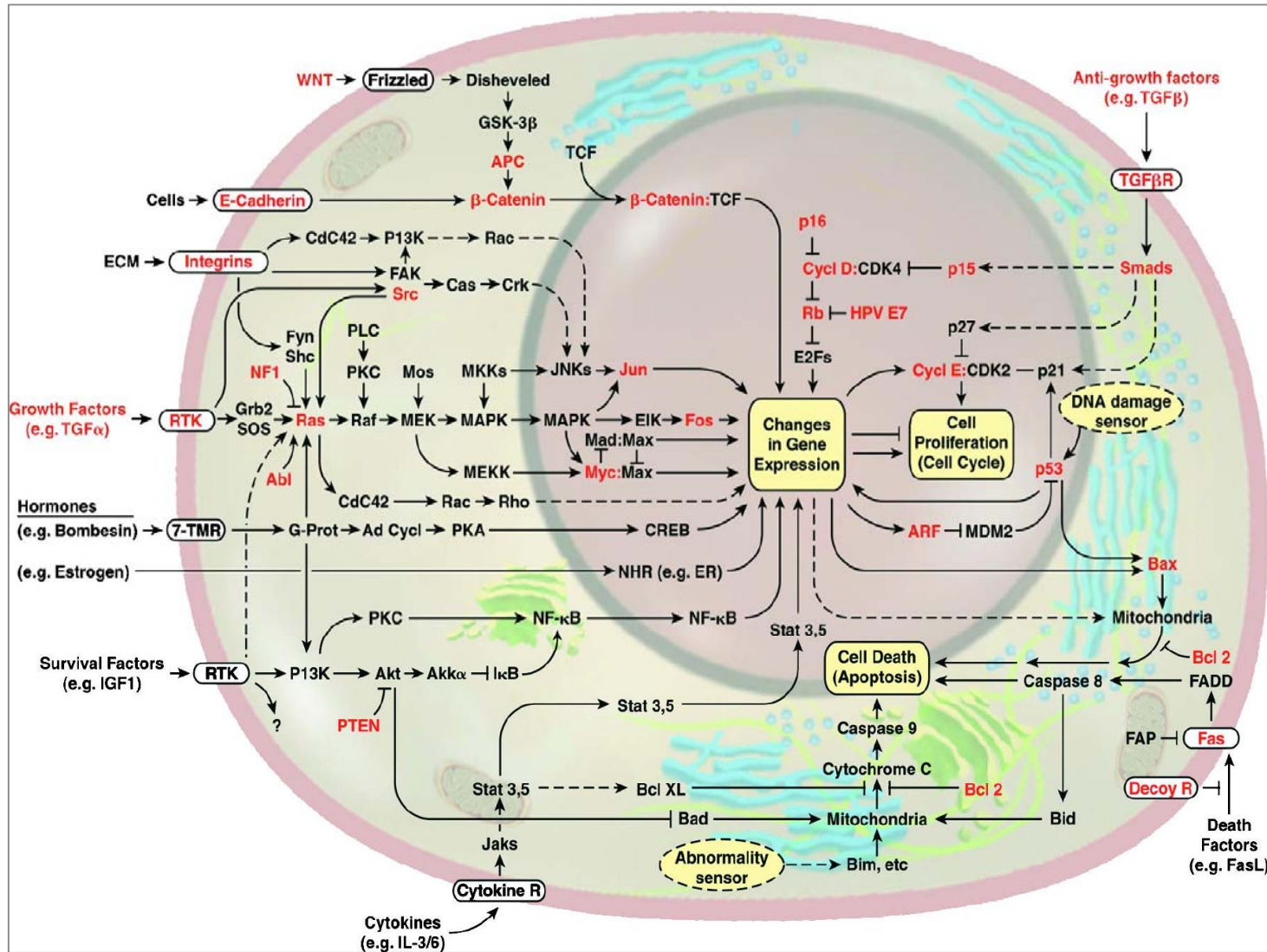


Proteinchip



Antikörperchip

# Krebsentstehung: Veränderungen in Signalwegen und der Genexpression

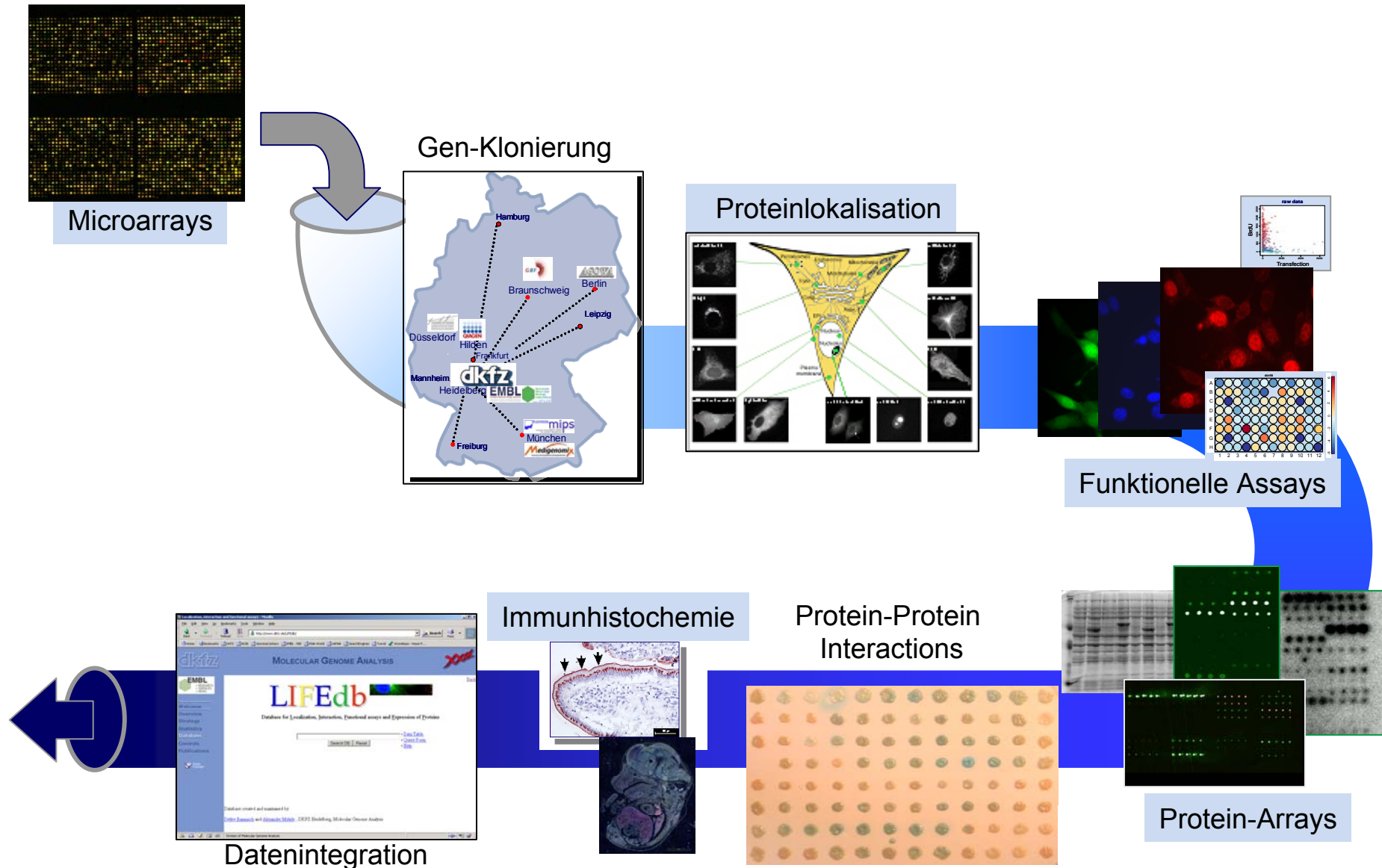


Hanahan and Weinberg, Cell 100, 57-70 (2000)



- **Genexpressionsanalyse menschlicher Zellen und Gewebe**
- **Suche nach Interaktionen und Funktionen von Genen und Proteinen**
- **Assoziation von Veränderungen mit bestimmten Krankheitsbildern (z.B. Tumorentstehung)**
- **Unterscheidung bzw. Vorhersage von klinisch wichtigen Faktoren wie Prognose und Therapieverläufen (“personalized medicine”)**

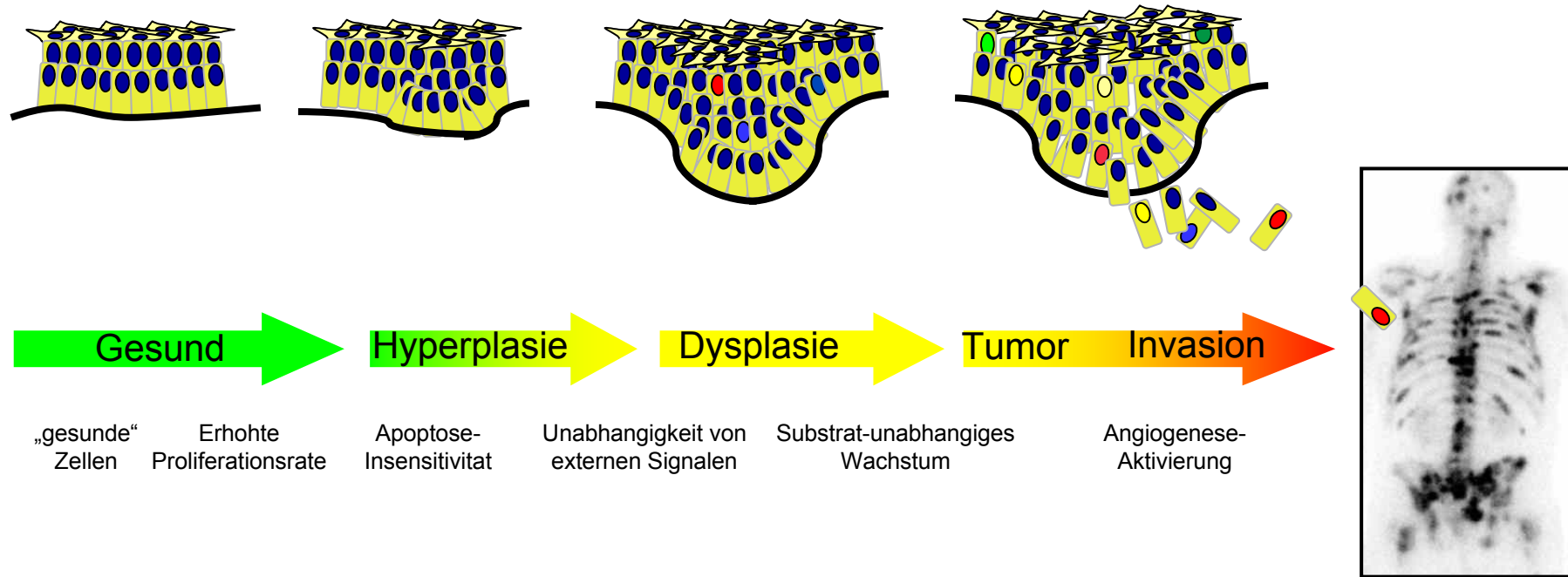
# Microarrays – Startpunkt für Folgeexperimente





1. **Fragestellung (z.B. Unterscheidung von Brusttumoren unterschiedlicher Prognose)**
2. **Auswahl der zu untersuchenden Proben  
(z.B. Patientenkollektiv mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen)**
3. **Probenentnahme, Aservierung und Versendung**
4. **Wahl der Technologie-Plattform (welcher Chip)**
5. **Experimentdurchführung (Laborausstattung)**
6. **Datenauswertung (Hilfe von Mathematikern und Statistikern)**
7. **Beantwortung der Fragestellung**
8. **Folgeexperimente (Validierung der Ergebnisse in unabhängigen Patientenkollektiven)**

# Focus: Tumorentstehung oder Progression



Prävention / Frühe Detektion ... Prognose der Tumorprogression und Metastasierung

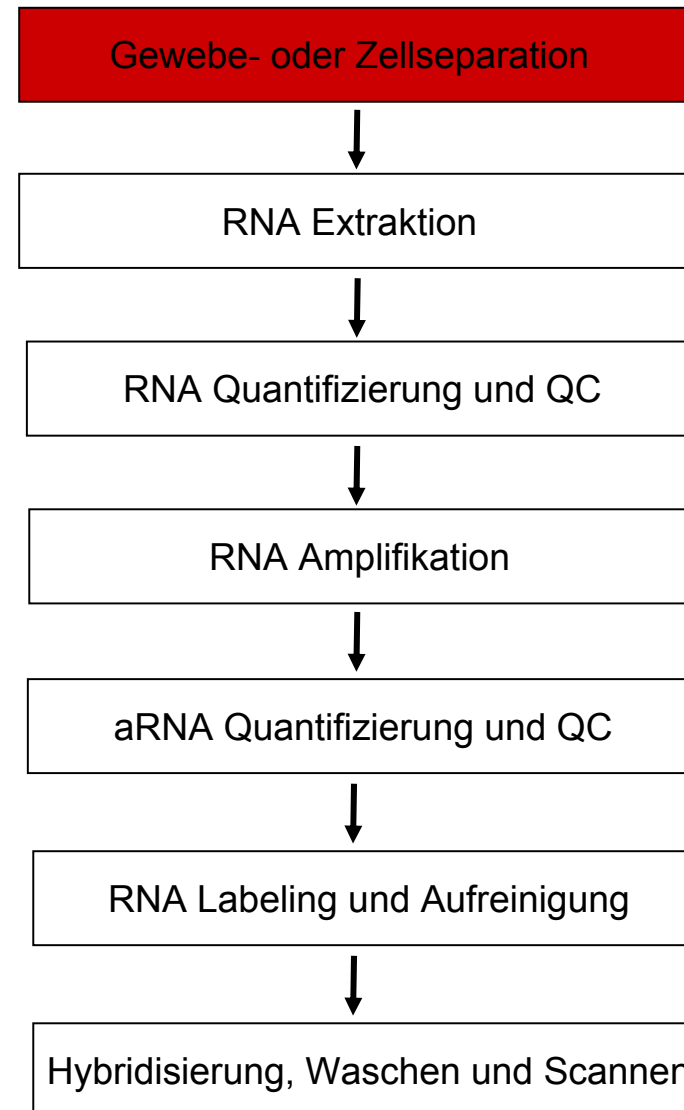
„...weitaus weniger spektakulär als die Therapie könnten neue Entwicklungen bei der Prävention und frühen Diagnose der vielversprechendsten Grund werden, die Zahl der Krebstoten senken...“

Vogelstein and Kinzler, Nature Medicine 10, 789-799 (2004)

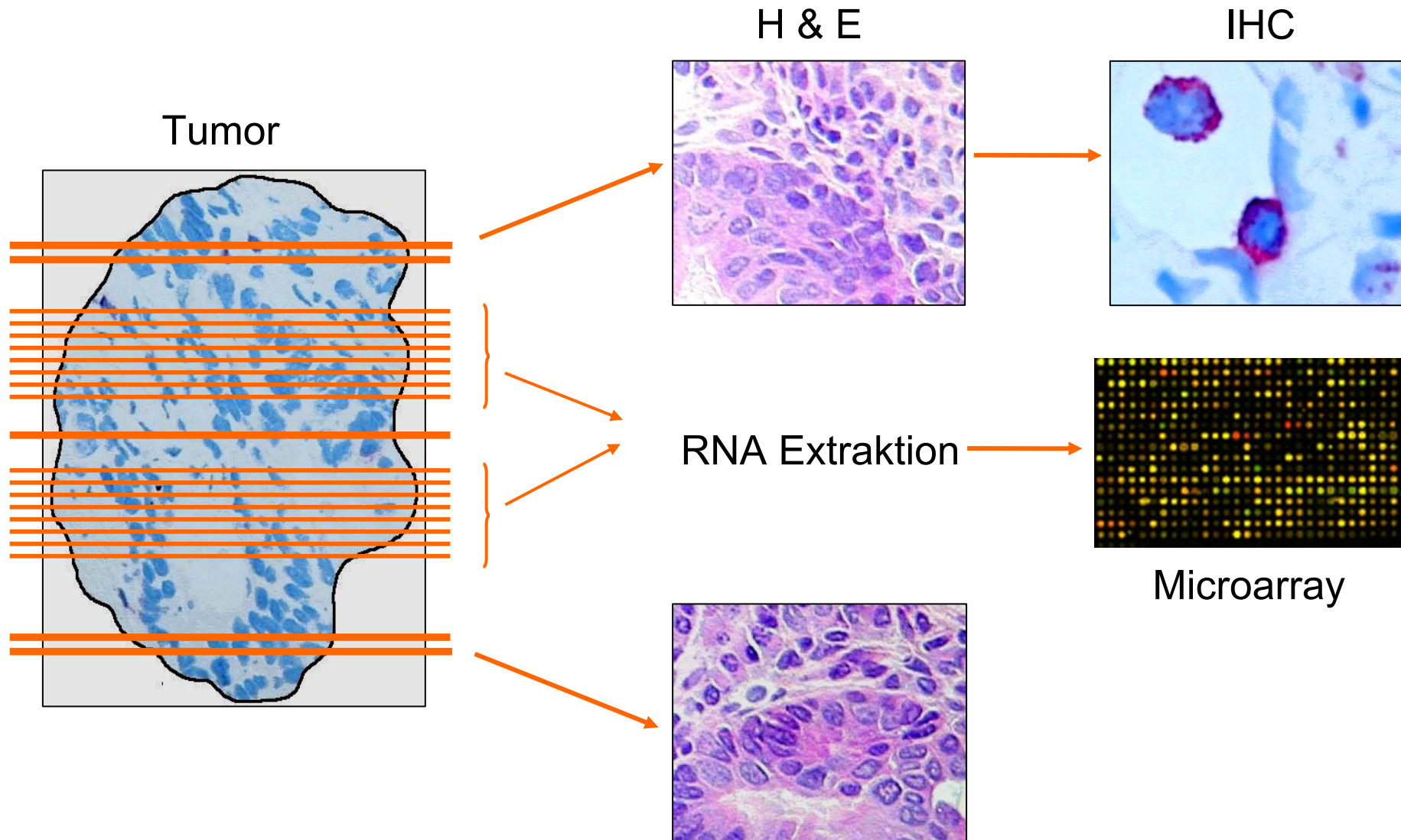
- Subtypen  
invasiv ductal (70%)  
invasiv lobular (15%)  
medullär (5%)  
andere
- Epidemiologie  
47,000 Neuerkrankungen/Jahr (D)  
19,000 Todesfälle/Jahr  
Risikofaktoren (genetische Prädisposition; Hormonstatus)
- Genetische Marker  
chromosomale Veränderungen  
11q13 (Cyclin D cluster)  
17q21 (*ERBB2* cluster)  
*BRCA1*, *BRCA2*
- Therapie  
Operation, Chemotherapie  
Herceptin ( $\alpha$ -*ERBB2*)  
Tamoxifen (**Estrogen Rezeptor** Inhibitor)  
weitere Ansätze in laufenden klinischen Studien

# Präparation der biologische Probe (Biopsien, Zellen)

Folie 11

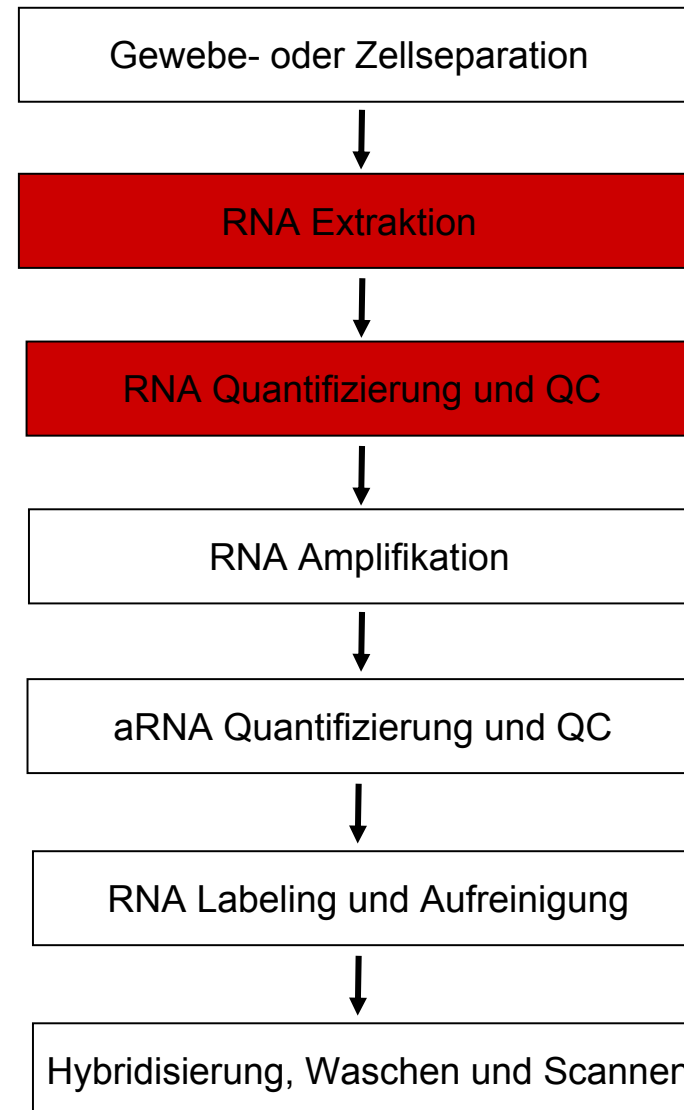


# Dissektion von Tumorgewebe



# Präparation der biologische Probe (Biopsien, Zellen)

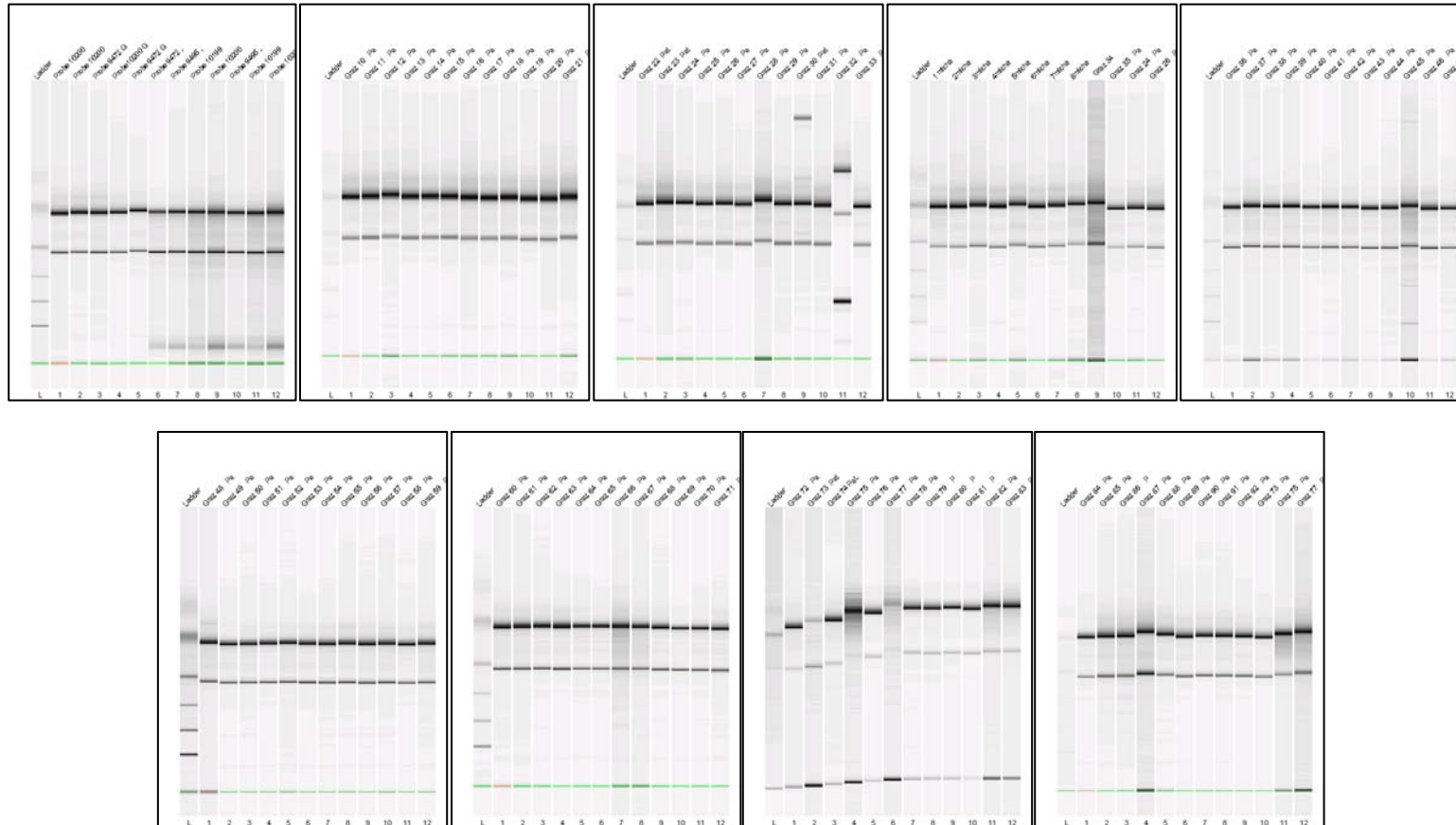
Folie 13





# Qualitätskontrolle der biologischen Probe

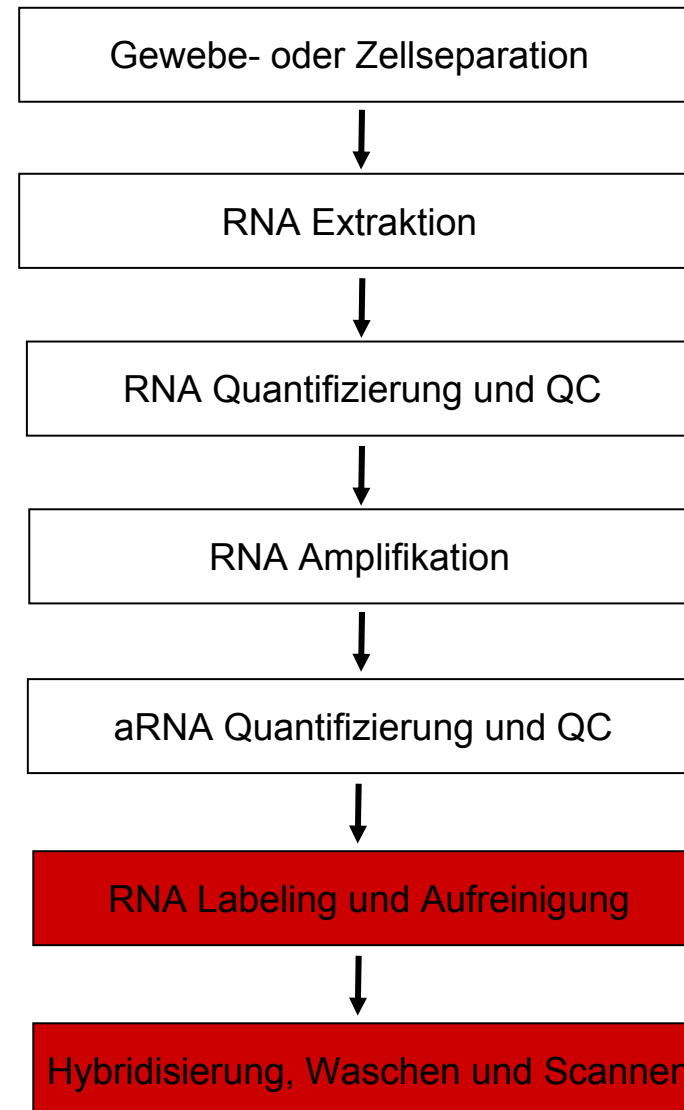
Folie 14



- Analyse der RNA mittels Biochip
- Dokumentation der Elektropherogramme
- Kriterien für RNA Qualität

# Präparation der biologische Probe (Biopsien, Zellen)

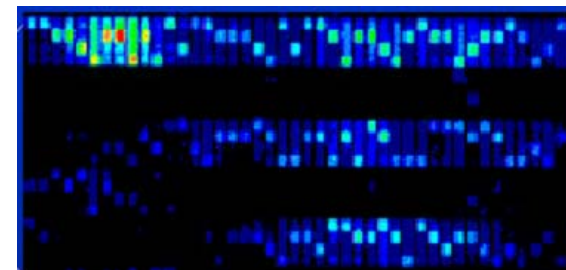
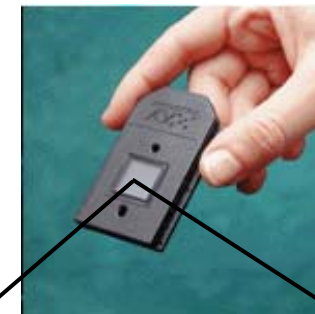
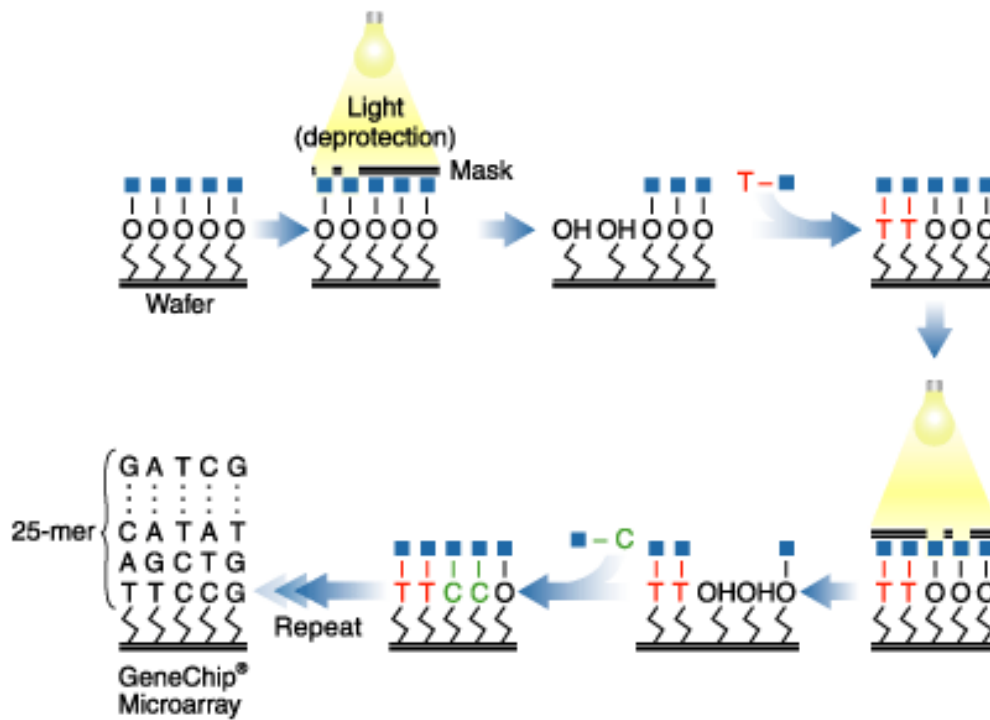
Folie 15



1. Gespottete Microarrays:  
Oligo-Arrays (50-70mers), cDNA-Arrays (500-1000bp)  
max. 50.000 Sequenzen
2. Oligo-Synthese direkt auf Microarray-Oberfläche  
maskengesteuerte Photolithographie (Affymetrix, Febit)  
bis zu 6.5 Mio Sequenzen
3. Weitere Produkte:  
BeadArray-Technologie (Illumina)  
Komplettsysteme (Oligo-Microarray, Real-Time PCR Validierung  
z.B. Applied Biosystem)

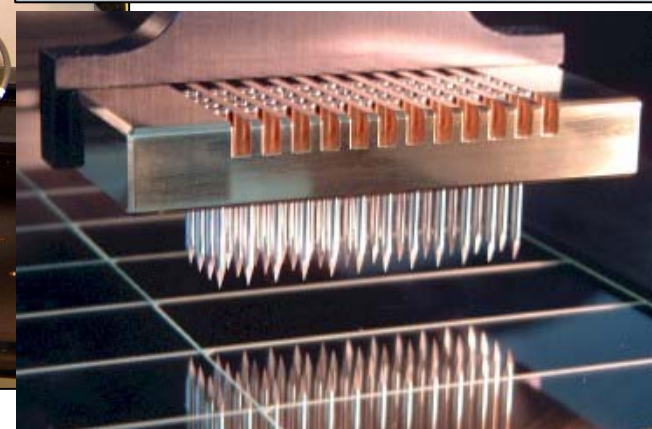
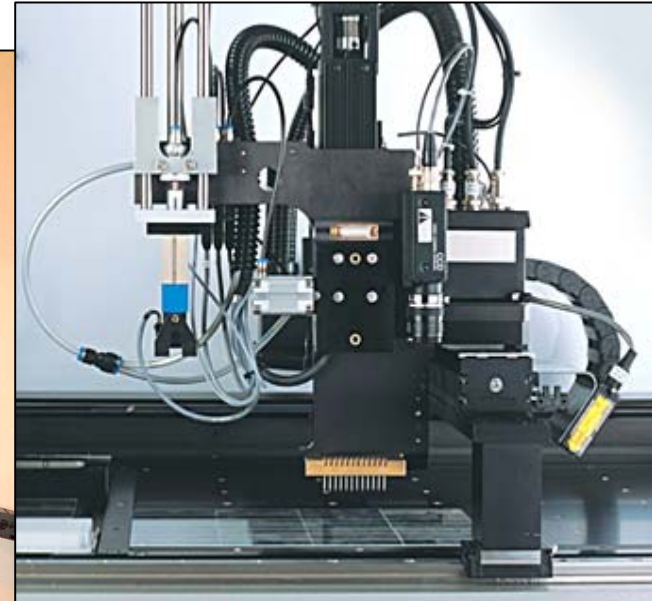
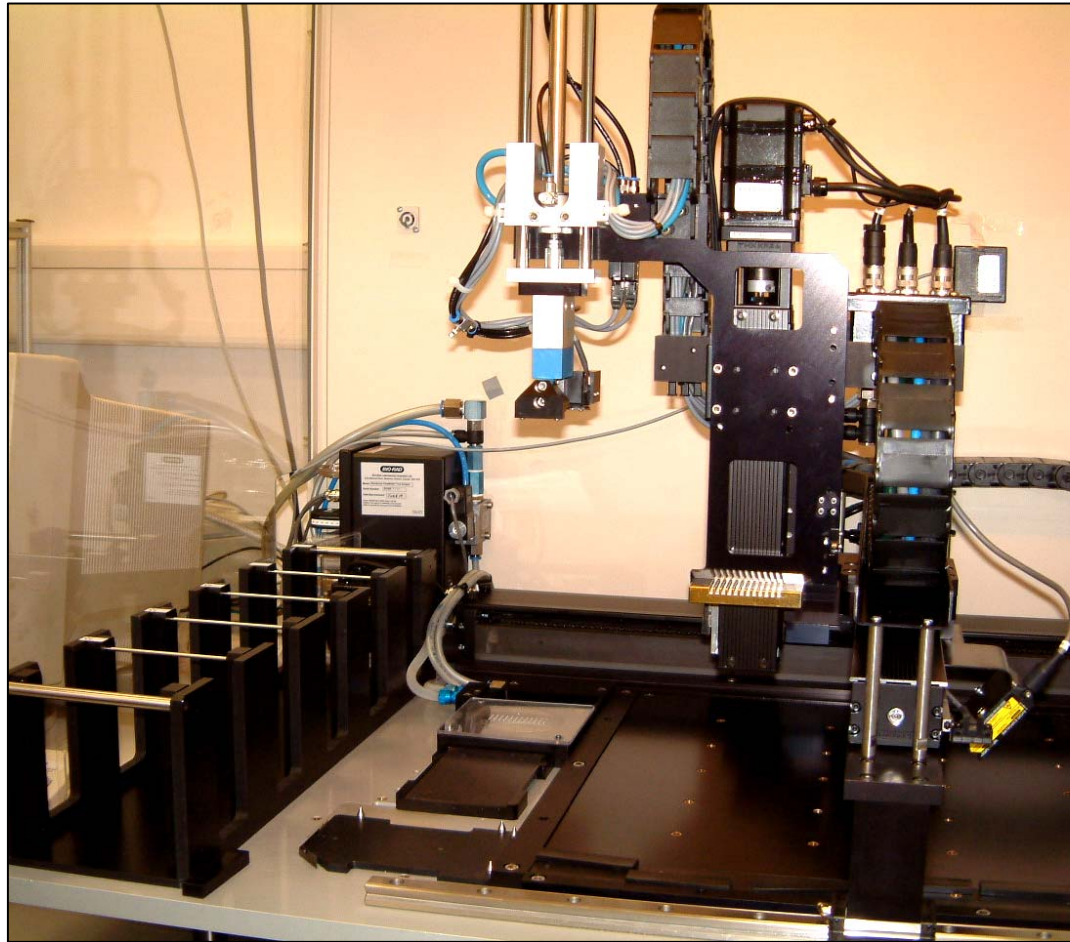
## Photolithographie (z.B. Affymetrix)

- Array-(Probe-) design
- Synthese von  $10^{15}$  25-mer Oligos in 100 Schritten



# Microarray-Produktion: Kontakt Spotting

Folie 18

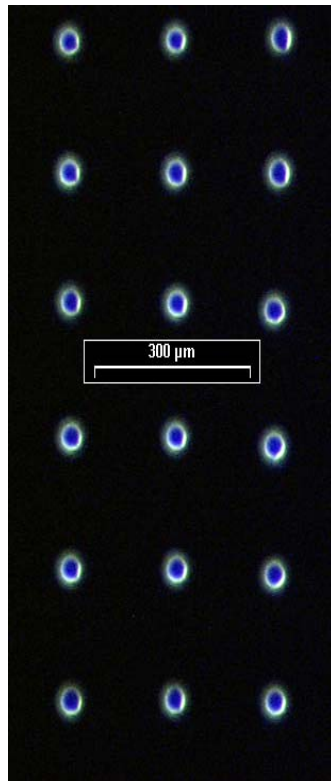




# Microarray Produktion: Qualitätsanalyse

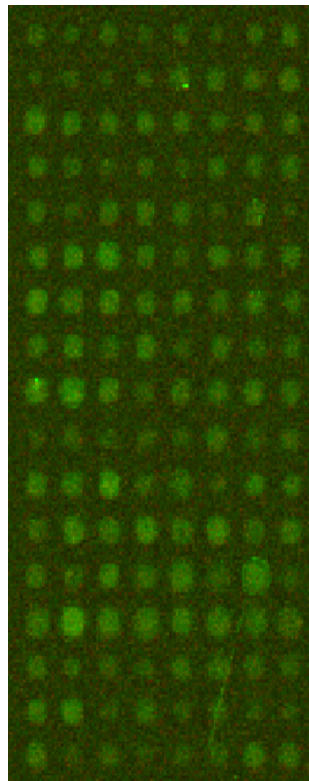
Biorad Versarray: 48 Pins (Telecam) / 108 Slides (Quantifoil)

Spotting Performance



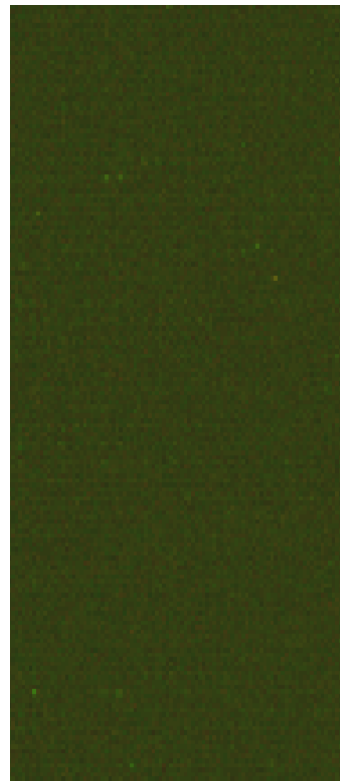
- Spot Morphologie
- Spot Alignment

nach Spotting



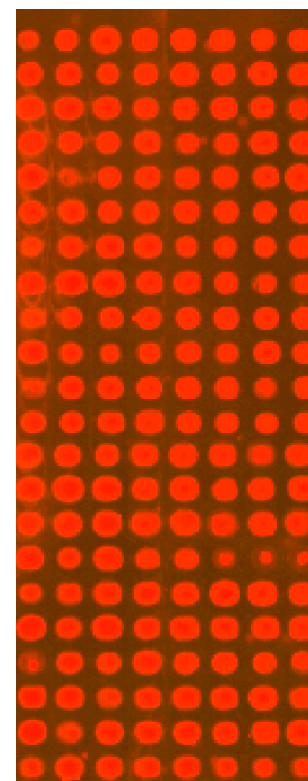
- Spot Präsenz
- Spot Alignment

nach Behandlung



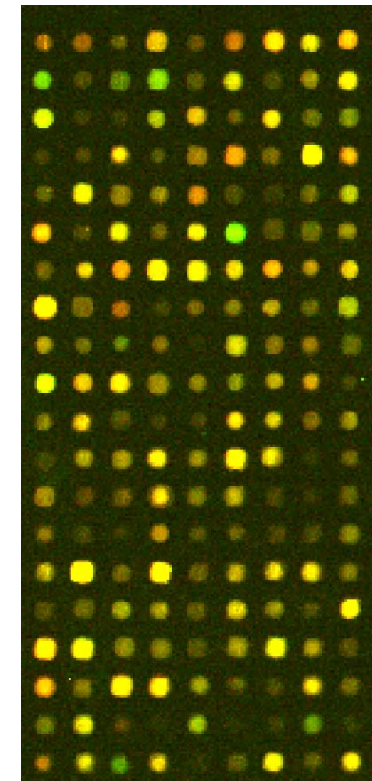
- Hintergrund
- Slide Artefakte

vor Hybridisierung



- DNA Präsenz

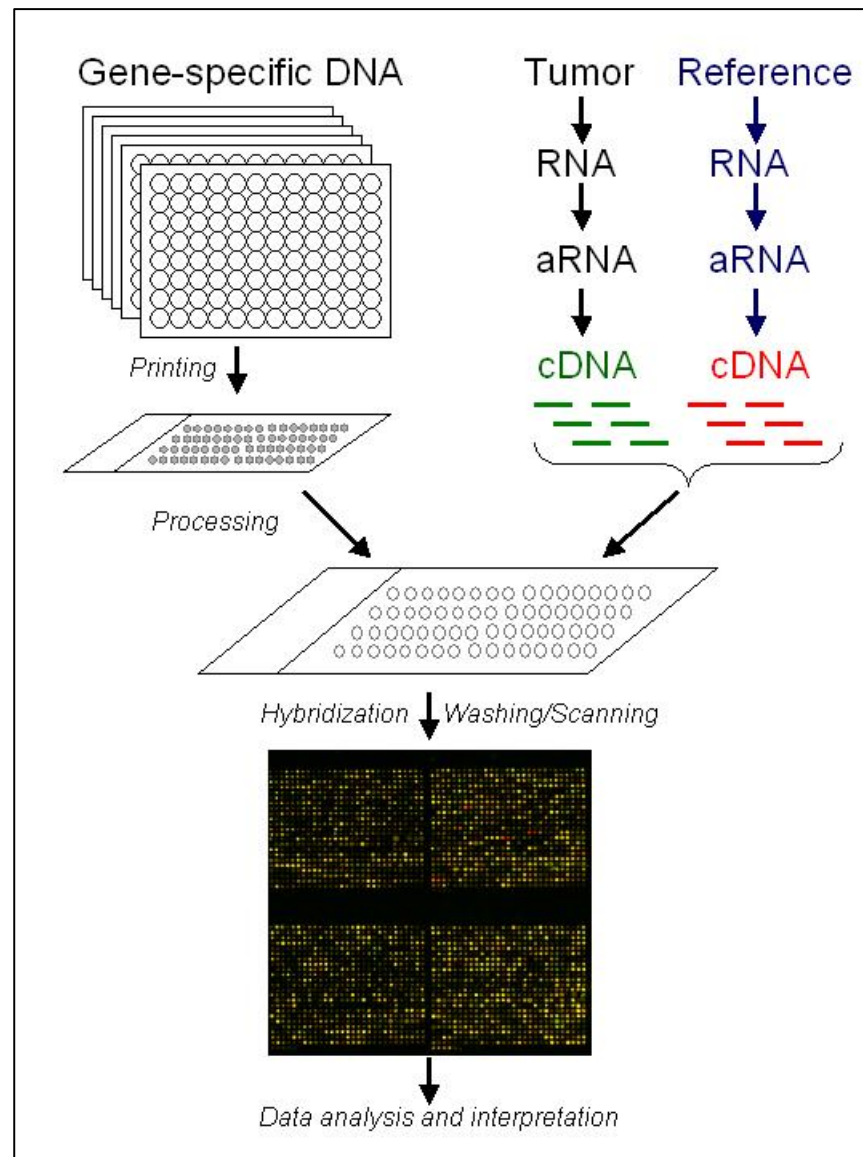
nach Hybridisierung



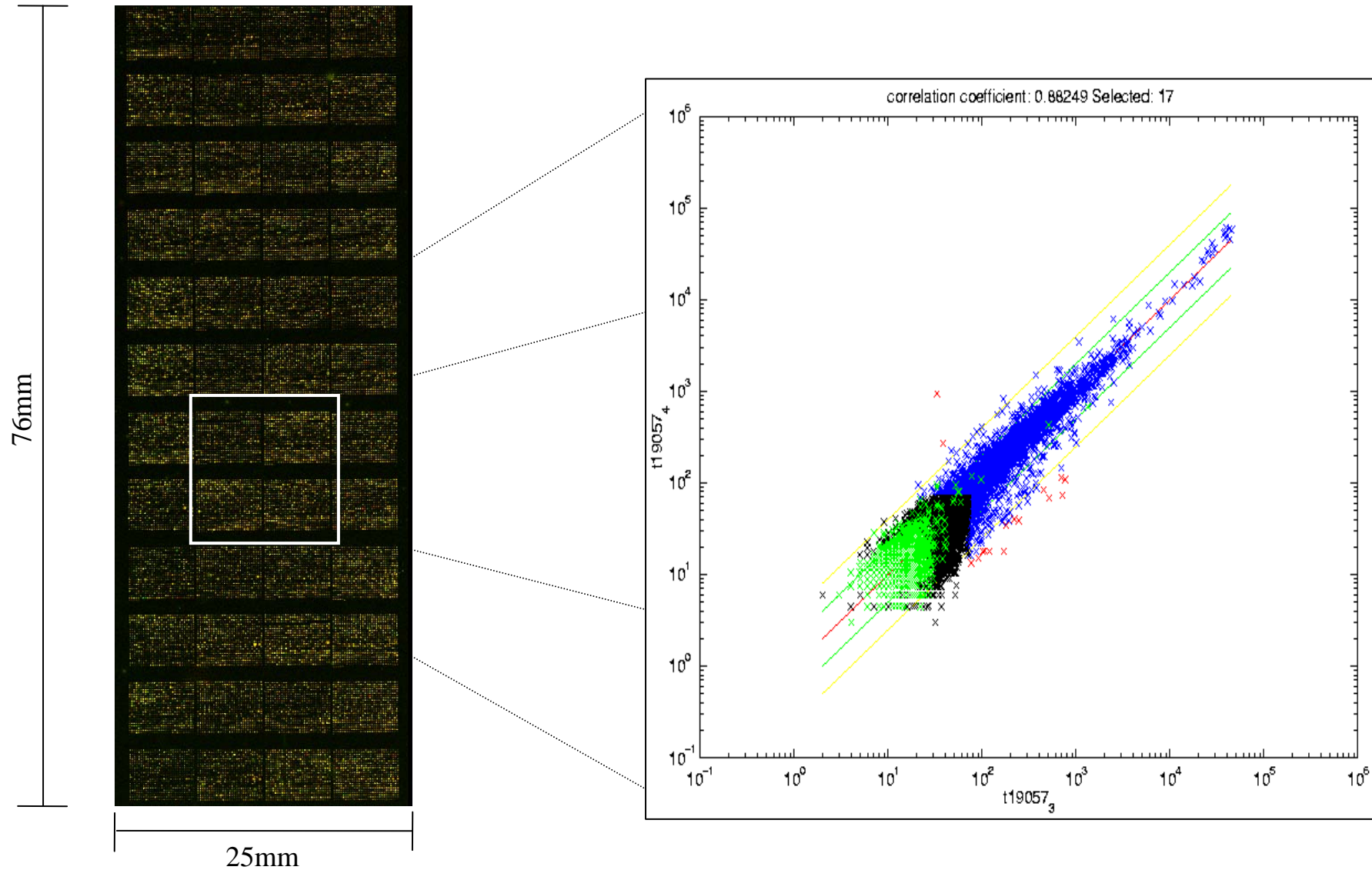
- Signal intensität
- Hintergrund



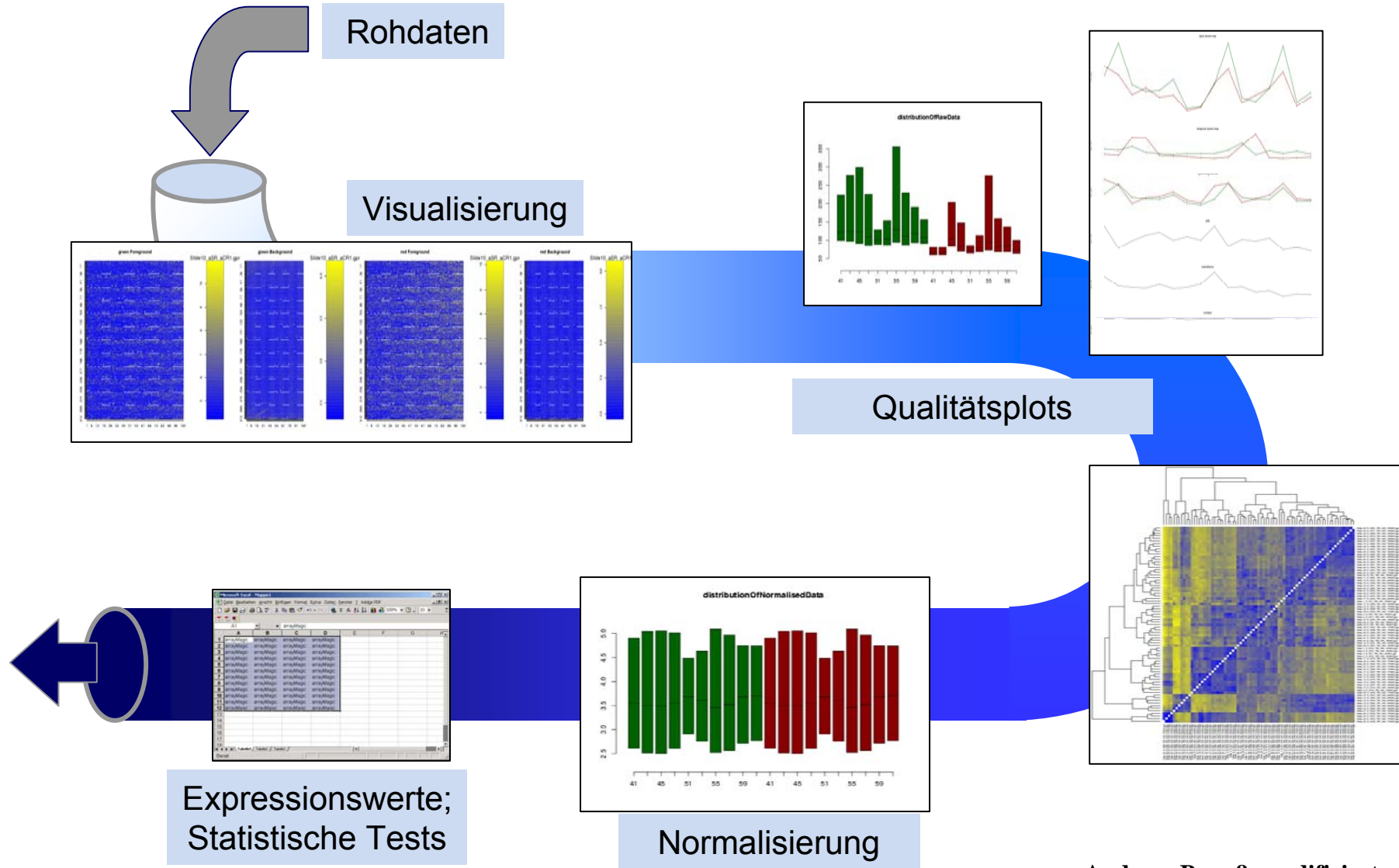
# Microarray-Experiment: wichtigste Schritte



# Datenanalyse und Quantifizierung

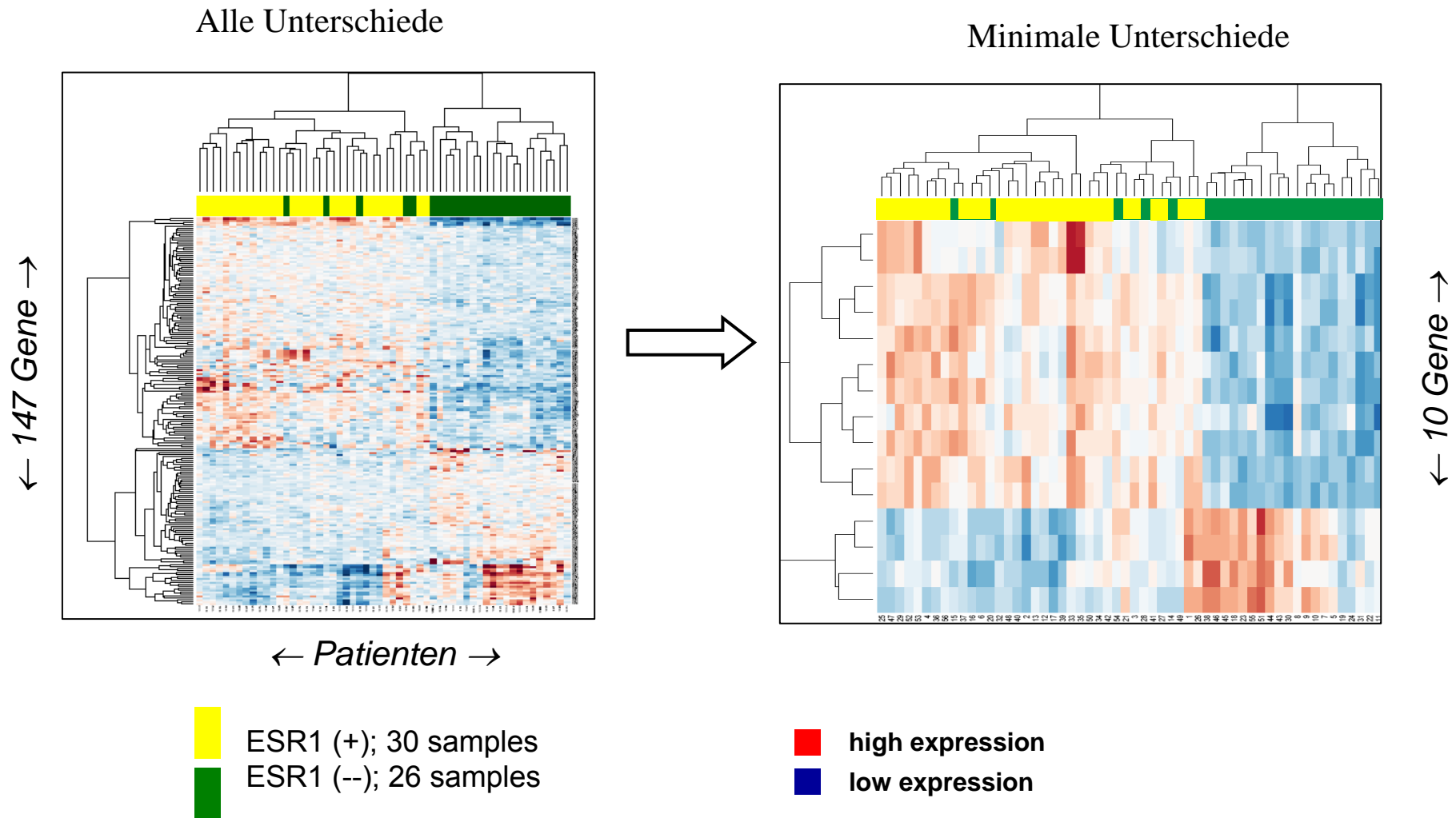


# Vorgehensweise bei der Datenanalyse und Statistik



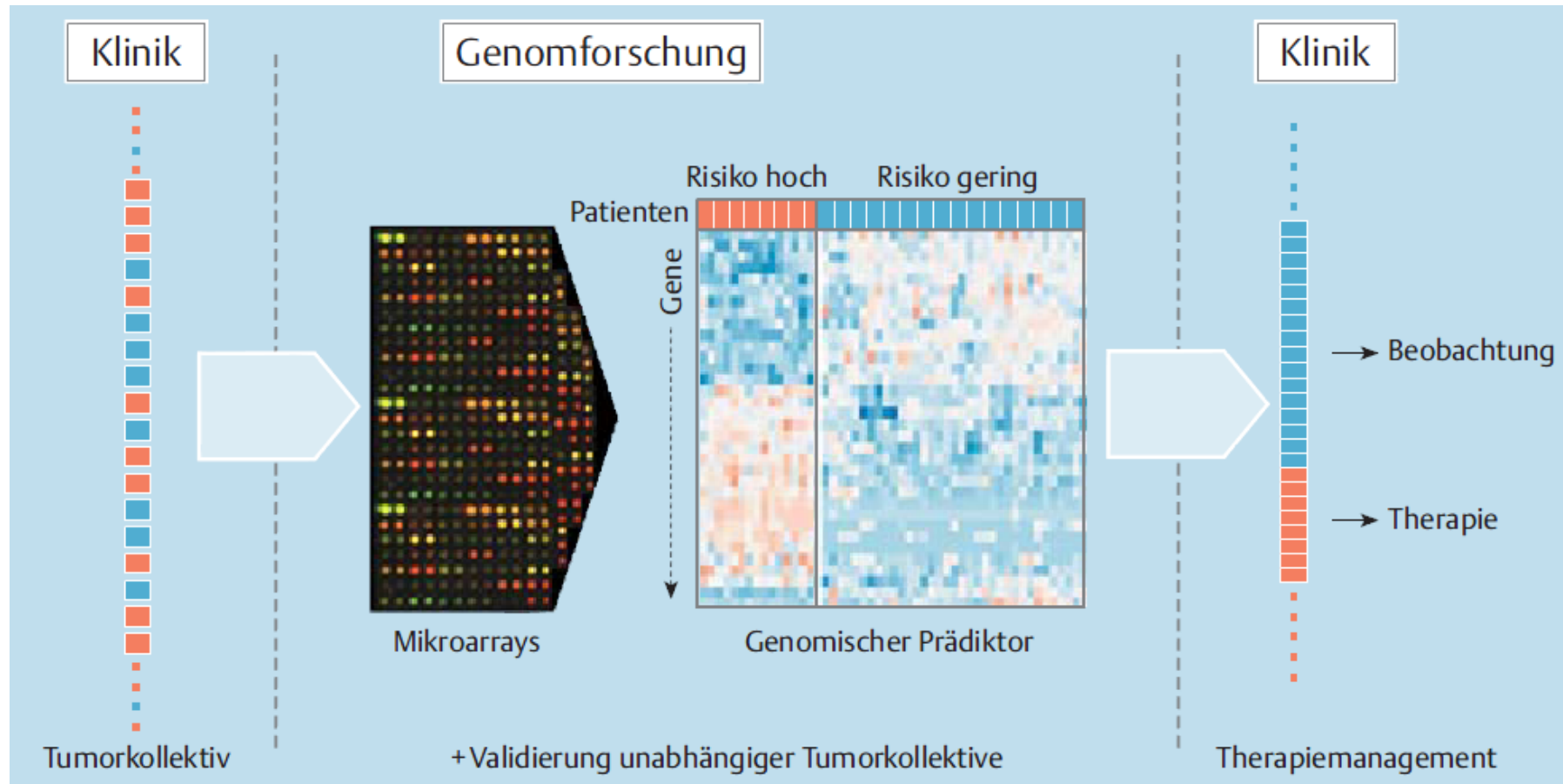
von Andreas Buneß, modifiziert

# Vorhersage der Hormonabhängigkeit beim Brustkrebs



Schneider et al., Int. J. Cancer 2006

# Translationale Forschung: Aus der Forschung in die Klinik



Kuner et al., DMW 2009

## Multiple-laboratory comparison of microarray platforms

com/naturemethods

Rafael A Irizarry<sup>1</sup>, Daniel Warren<sup>2</sup>, Forrest Spencer<sup>3</sup>, Irene F Kim<sup>4</sup>, Shyam Biswal<sup>5</sup>, Bryan C Frank<sup>6</sup>, Edward Gabrielson<sup>7</sup>, Joe G N Garcia<sup>8</sup>, Joel Geoghegan<sup>9</sup>, Gregory Germino<sup>4</sup>, Constance Griffin<sup>10</sup>, Sara C Hilmer<sup>11</sup>, Eric Hoffman<sup>11</sup>, Anne E Jedlicka<sup>12</sup>, Ernest Kawasaki<sup>9</sup>, Francisco Martínez-Murillo<sup>13</sup>, Laura Morsberger<sup>10</sup>, Hannah Lee<sup>5</sup>, David Petersen<sup>9</sup>, John Quackenbush<sup>6,14</sup>, Alan Scott<sup>12</sup>, Michael Wilson<sup>15,17</sup>, Yanqin Yang<sup>2</sup>, Shui Qing Ye<sup>8</sup> & Wayne Yu<sup>16</sup>

## Standardizing global gene expression analysis between laboratories and across platforms

www.nature.com/naturemethods

Members of the Toxicogenomics Research Consortium<sup>1</sup>

To facilitate collaborative research efforts between multi-investigator teams using DNA microarrays, we identified sources of error and data variability between laboratories and across microarray platforms, and methods to accommodate this variability. RNA expression data were generated in seven

guidelines for publishing information about standards<sup>10,11</sup>, these efforts provide mental details and reproducibility

570

Review

TRENDS in Genetics Vol.19 No.10 October 2003



## Comparison and meta-analysis of microarray data: from the bench to the computer desk

Yves Moreau<sup>1</sup>, Stein Aerts<sup>1</sup>, Bart De Moor<sup>1</sup>, Bart De Strooper<sup>2</sup> and Michal Dabrowski<sup>2</sup>

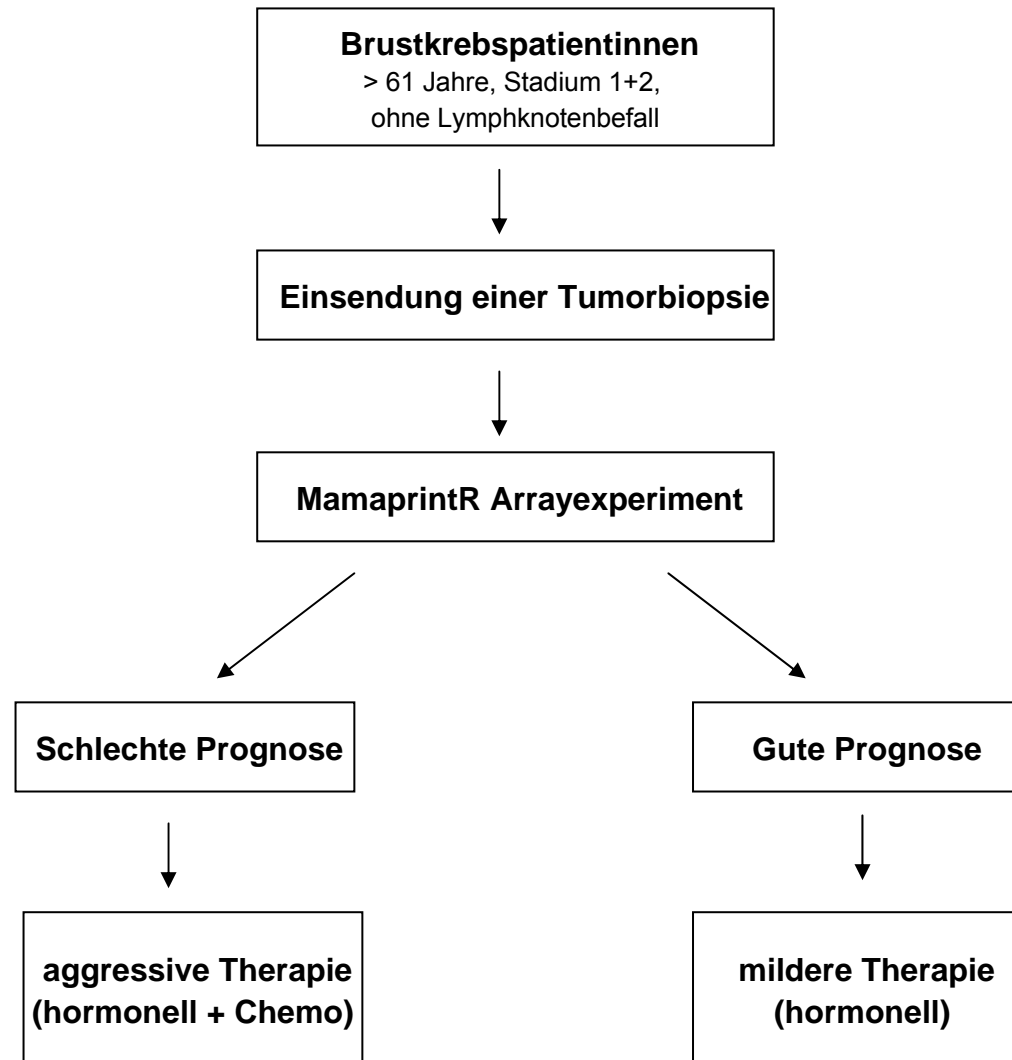
<sup>1</sup>Department of Electrical Engineering ESAT-SCD, Katholieke Universiteit Leuven, Kasteelpark Arenberg 10, 3001 Heverlee (Leuven), Belgium

<sup>2</sup>Laboratory for Neuronal Cell Biology, Center for Human Genetics, Katholieke Universiteit Leuven and VIB (Flemish Interuniversity Institute for Biotechnology), Herestraat 49, 3000 Leuven, Belgium

!!.....Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Labors und Technologien verbessert sich erheblich, wenn standardisierte Protokolle für die RNA Präparation, Microarray-Produktion, Hybridisierung und Datenauswertung angewendet werden.....!!

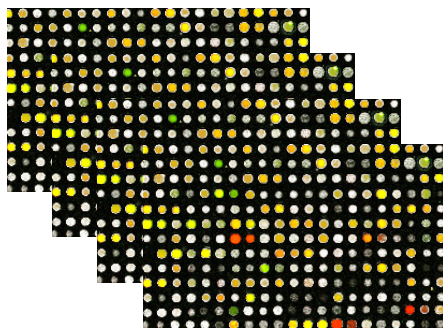


- Brustkrebs: Mamaprint<sup>R</sup> Agendia (DNA-Microarray) zur Risikoabschätzung wiederkehrender Tumorerkrankungen und entsprechender Therapieoptionen
- Brustkrebs: Oncotype Dx<sup>R</sup> (qRT-PCR) gibt Aufschluss über die Wirksamkeit einer Kombinationstherapie (Tamoxifen+Chemotherapie)
- Risikoeinschätzung: Combimatrix Molecular Diagnostics (DNA Microarray); CCL-Risiko, Her2-Status Brustkrebs, Prostatakrebs-Risiko
- Herkunft/Behandlungsschema: Pathwork<sup>TM</sup> Tissue of Origin Test (Microarray) gibt Aufschluss über die Herkunft eines Tumors
- Weitere Systeme befinden sich in klinischen Studien
- Langfristig sollen gezielte, molekulare Screeningmethoden eine verbesserte individuelle Therapie und Nachsorge von Patienten ermöglichen



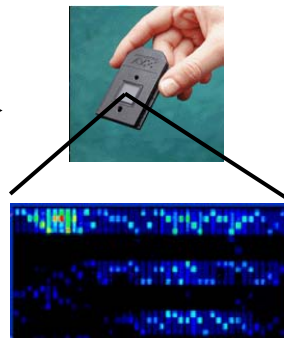
- Brustkrebs: Mamaprint<sup>R</sup> Agendia (DNA-Microarray) zur Risikoabschätzung wiederkehrender Tumorerkrankungen und entsprechender Therapieoptionen
- Brustkrebs: Oncotype Dx<sup>R</sup> (qRT-PCR) gibt Aufschluss über die Wirksamkeit einer Kombinationstherapie (Tamoxifen+Chemotherapie)
- Risikoeinschätzung: Combimatrix Molecular Diagnostics (DNA Microarray); CCL-Risiko, Her2-Status Brustkrebs, Prostatakrebs-Risiko
- Herkunft/Behandlungsschema: Pathwork<sup>TM</sup> Tissue of Origin Test (Microarray) gibt Aufschluss über die Herkunft eines Tumors
- Weitere Systeme befinden sich in klinischen Studien
- Langfristig sollen gezielte, molekulare Screeningmethoden eine verbesserte individuelle Therapie und Nachsorge von Patienten ermöglichen

1990-2000



gespottete Oligo- oder cDNA-Microarrays

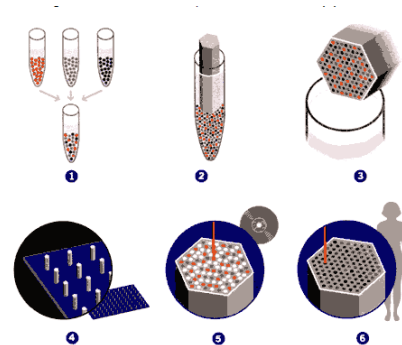
+ Produktion, Flexibilität



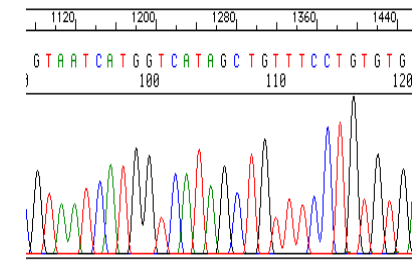
Kommerzielle Systeme mit kürzeren, synthetisierten Oligosequenzen

+ Auflösung, Qualität, Datenintegration

2000-2010



> 2010 ?



RNA Sequenzierung

+ Auflösung,  
Dynamischer Bereich,  
unbekannte Transkripte