

Frank Kleinjung

Fraunhofer Institut für
Biomedizinische Technik,
Molekulare Bioanalytik
Bergholz-Rehbrücke

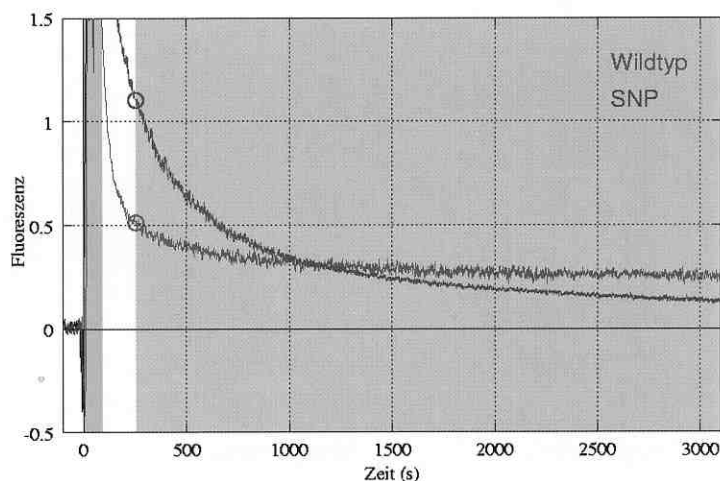


Abb 1 Bindungskinetik von Wildtyp und SNP

In der Hybridisierungsphase (gelb) bindet die Probe. In der Dissoziationsphase (blaugrün) löst sich hybridisierte DNA mit einer charakteristischen Geschwindigkeit. SNP-DNA dissoziiert deutlich schneller als Wildtyp-DNA.

Zusammenfassung

Das bessere Verständnis des Einflusses von SNPs (single nucleotide polymorphisms) auf medizinische Therapien rückt kleine Variationen in Gene-Sequenzen stärker in den Blickpunkt des Interesses.

Wir präsentieren hier eine Nachweismethode, die robust im Sinne veräuschter Daten ist (z.B. variierende Proben-Konzentrationen und/oder interferierende DNA). Die Methode beruht auf der Bestimmung einer charakteristischen biophysikalischen Konstante, der Dissoziationsgeschwindigkeit.

Schlüsselwörter

SNP, DNA, Chiptechnologie, Kinetik.

Summary

Small deviations in gene sequences are coming in the focus of interest since the influence of SNPs (single nucleotide polymorphisms) on medical therapy is better understood. We now present a detection method for SNPs, which is robust in respect to noisy samples, i.e. variation of DNA concentration or interfering DNA. The method is based on the determination of a characteristic biophysical constant, the dissociation rate constant.

Keywords

DNA, chip, kinetic, SNP.

Die Bestimmung und Identifizierung von DNA-Sequenzen ist in vielen Gebieten (z.B. Medizin, Gentechnik, Umweltanalytik) von großem Interesse (1,2). Die Existenz einer bestimmten DNA-Sequenz in einer Probe ist eindeutig und an Aussagekraft unübertroffen, wenn in einer Fragestellung ein kausaler Zusammenhang zu einer phänotypischen Ausprägung hergestellt werden kann. Medizinisch interessant sind Unterschiede zwischen ‚normalen‘ Genen und solchen, die die Pharmakokinetik beeinflussen oder die Anfälligkeit für bestimmte Krankheiten vergrößern. Eine häufige Form der Unterschiede sind SNPs (single nucleotide polymorphisms), eine Abweichung der Sequenzen in nur einer Base. Die vermutete Relevanz der SNPs ist hoch: 80 Amerikaner sollen durch ein Medikament gegen Sodbrennen ums Leben gekommen sein - Unverträglichkeiten sollen nach US-Statistik jeden 4. Tod verursachen. Das Ziel wird von vielen Forschern darin gesehen, dass es unter Kenntnis der Therapie-relevanten SNPs möglich sein wird, individuell angepasster zu behandeln und damit ein besseres Wirkungs-, Nebenwirkungs-Verhältnis zu erzielen. Jedoch müssen wahrscheinlich zehn Millionen individuelle DNA-Variationen untersucht werden, um den Einfluss der SNPs beherrschbar zu machen, meint Francis Collins, der Leiter des amerikanischen Instituts für Humangenomforschung. Die Notwendigkeit geeigneter Messmethoden ist damit evident.

SNPs sind, eben da sie sich nur wenig vom Wildtyp unterscheiden, nämlich

in einer einzelnen Base, schwierige Kandidaten für einen Nachweis. Dies wird an einem Experiment mit zwei verschiedenen PCR-Produkten verdeutlicht, einer Wildtyp-DNA und einer SNP-DNA. Auf der Oberfläche ist ein 13mer DNA-Sonde immobilisiert, das komplementär zur Wildtyp-DNA ist und die Abweichung der SNP-DNA im Zentrum hat. Die Bindungsstärke (KD) der beiden DNA-Typen unterscheiden sich um den Faktor 4 (berechnet aus den in Abbildung 1 präsentierten Daten). Die Bindungskonstanten ändern sich temperaturabhängig. Man kann zwar durch Temperaturerhöhung den Unterschied in den Bindungsstärken vergrößern, verschlechtert dabei aber auch die untere Nachweisgrenze durch eine generelle Verschlechterung der Bindungskonstante. Die Veränderung der Bindungskonstante im obigen Fall wird durch die Änderung der Dissoziationsgeschwindigkeit hervorgerufen, die Assoziationsgeschwindigkeit ist konstant (3). Die maximale Menge, die erwartungsgemäß an den Chip binden kann, ist durch die Formel $S = S_0 / (1 + KD / c)$ gegeben, wobei S das Signal, S_0 das Maximalsignal, KD die Bindungskonstante und c die Konzentration des jeweiligen PCR-Produktes ist (4). Die Konzentration eines PCR-Produktes hat also denselben Einfluss auf das Messsignal wie der Unterschied in der Bindungsstärke.

Wir haben nun eine Methode entwickelt, die unabhängig von der Konzentration SNPs nachweisen kann, indem die Dissoziationsgeschwindigkeit eines PCR-Produktes bestimmt wird.

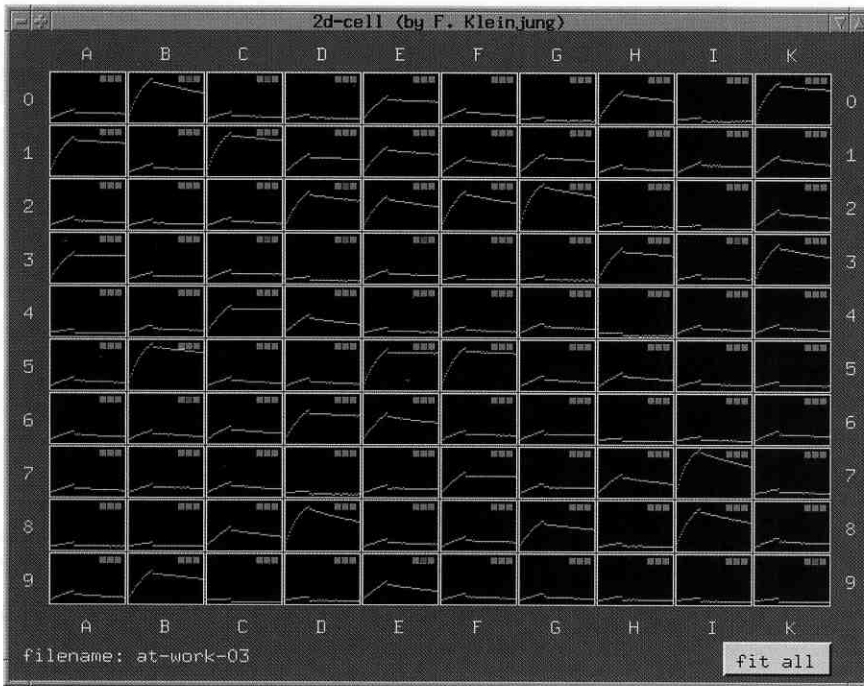


Abb 2 Typisches Messergebnis eines Scan-Vorgangs einer PCR-Probe mit verschiedensten immobilisierten Sonden.

Das ist die Geschwindigkeit, mit der hybridisierte DNA sich natürlicherweise wieder löst. Wildtyp und SNP unterscheiden sich ausreichend in dieser Konstante, sofern die Variation zentral genug liegt. Wir haben daher ein Gerät mit einer Fließzelle auf dem Chip entwickelt, das es erlaubt, Hybridisierung und Dissoziation online zu betrachten. Abbildung 1 zeigt Bindungskurven der beiden PCR-Produkte, in welche an einer invarianten Stelle fluoreszierende Marker hybridisiert wurden.

Bei einer für Hybridisierungsexperimente niedrigen Temperatur, in diesem Fall 25°C, werden die PCR-Produkte in einen Pufferstrom injiziert, der den Chip umspült. Die PCR-Produkte hybridisieren nun an die auf dem Chip immobilisierten DNA-Sonden, im Bild der gelb unterlegte Bereich. Anschließend wird die nicht hybridisierte DNA aus der Messzelle entfernt und der Chip nur von Puffer umspült. Der nicht unterlegte Zwischenbereich in Abbildung 1 charakterisiert die Zeit, in der unspezifisch gebundene DNA entfernt wird. Hybridisierte DNA löst sich von der Oberfläche wieder ab, im Bild der blau unterlegte Bereich. Die Geschwindigkeit, mit der sich DNA natürlicherweise von einem Hybridisierungspartner löst – dissoziiert – ist charakteristisch. Die Geschwindigkeitskonstante wird mit einer Kurvenanpassung auf die Dissoziationsphase bestimmt. In Abbildung 1 ist die Wildtyp-DNA durch eine geringe Abnahme des Fluoreszenz-Signals bereits optisch von der deutlich instabileren SNP-DNA zu unterscheiden. Die

Dissoziationsgeschwindigkeiten von Wildtyp- und SNP-DNA unterscheiden sich deutlich. Damit ist eine Identifizierung auch in unreinen Gemischen verhältnismäßig leicht. Man kann an dem höheren Signal der SNP-DNA zu Beginn der Dissoziationsphase (Kreise) trotz eigentlich schwächerer Bindungskonstante erkennen, dass die Konzentration der SNP-DNA mehr als 20fach größer ist als die der Wildtyp-DNA. (Die Bestimmung über das Gleichgewichtssignal misslingt bei diesen Konzentrationsvorgaben.)

Auf unserem DNA-Chip werden verschiedene Sonden in einem Raster immobilisiert und PCR-Produkte untersucht.

In Abbildung 2 ist eine typische Messung dargestellt, bei der unterschiedlichste Sonden (Länge, Zusammensetzung) immobilisiert sind. Die grünen und roten Punkte geben die Qualität der automatischen Datenverarbeitung wieder. Mit einer geeigneten Datenanalyse-Software lässt sich in jedem einzelnen Punkt die Menge an gebundener Wildtyp-DNA sowie als Summenwert die Menge an SNP-DNA bestimmen. Der Nachweis von SNPs wird damit erheblich erleichtert.

Literatur

- 1) Nature genetics Suppl 1999.
- 2) Chiptechnologie für DNA Diagnostik und Sequenzanalyse, Themenschwerpunkt (1999) medgen 11, 2-32.
- 3) Bier, F. F., Kleinjung, F., and Scheller, F. W. (1997). Real-time measurement of nucleic acid hybridisation using evanescent wave sensors: step towards the genosensor. Sensors and Actuators B, 38-39:78-82.
- 4) Karlsson, R. (1994). Real-time competitive kinetic analysis of interactions between low-molecular-weight ligands in solution and surface-immobilized receptors. Analytical Biochemistry, 221(1):142-151.

Korrespondenzadresse

Dr. Frank Kleinjung
 Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik,
 Molekulare Bioanalytik
 Arthur-Scheunert-Allee 114-116
 D-14558 Bergholz-Rehbrücke
 Tel +49 (0)33200 88 350
 Fax +49 (0)33200 88 452
 frank.kleinjung@mba.berlin.fhg.de