

Abb 1 Die neueste Generation von MALDI-Massenspektrometern ist mit automatischer Probenzuführung versehen

Nach Abarbeitung eines Probenellers wird dieser durch den nächsten ersetzt. Das Gerät erlaubt die automatische Analyse von SNP Genotypen rund um die Uhr. In 24 Stunden können rund 100.000 SNP Genotypisierungen durchgeführt werden.



Zusammenfassung:

SNP Genotypisierung mit Massenspektrometern ist mittlerweile eine in der Forschung eingesetzte und anerkannte Methode. Die moderne Medizin ist bestrebt, SNP Genotypisierung als diagnostisches Instrument zur Pharmakogenetik einzusetzen. SNP Genotypisierung mit Massenspektrometern eignet sich zur parallelen Analyse einer Vielzahl von Patientenproben. Vorteile liegen auf der Seite der Genauigkeit und der Geschwindigkeit der Analyse. Analyseergebnisse sind einfach mit Computern zu interpretieren. In den letzten Jahren sind Massenspektrometersysteme zwar wesentlich einfacher geworden, jedoch braucht deren Betrieb derzeit immer noch speziell ausgebildetes Personal. Es ist denkbar, dass die nächste Generation von Massenspektrometern den Schritt in die Arztpraxis schafft.

Schlüsselwörter

SNP, Pharmakogenetik, Massenspektrometrie, single nucleotide polymorphism

Summary

SNP Genotyping by mass spectrometry is a used and accepted method in research. Modern medicine is aiming to introduce SNP genotyping as a diagnostic means for pharmacogenetics. SNP genotyping by mass spectrometry is well suited to the parallel analysis of a large number of patient samples. The advantages of mass spectrometry are in the accuracy and speed of analysis. Results are easily interpreted with computers. Mass spectrometers have become a lot simpler in operation in the last few years, yet their operation still requires specialised staff. It is imaginable that the next generation of mass spectrometers will make the step into the doctors practice.

Keywords

SNP, Pharmacogenetics, Mass Spectrometry, Single Nucleotide Polymorphisms

Genotypisierung, die Untersuchung der genetischen Variabilität verschiedener Individuen, kann unterschiedliche Ziele verfolgen. Pharmakogenetik ist ein Bereich, in dem die Genotypisierung zum Einsatz kommen könnte (McCarthy, 2000). Einige Fälle von Zusammenhängen von Genvarianten und Medikamentenverabreichung sind beschrieben worden. Ein bekanntes Beispiel eines Gens, dessen verschiedene Varianten die Metabolisierung von Medikamenten beeinflussen, ist das Cytochrom P-450. Die Aufnahme von Omeprazole, einem Medikament, das zur Bekämpfung von *Helicobacter pylori* eingesetzt wird, ist stark von der Cytochrom P-450 Variante abhängig (Ibeanu, 1999). Ein weiteres Beispiel ist das ACE (angiotensine converting enzyme) Gen. Bestimmte Allele dieses Gens sind mit einem erhöhten Herzinfarktrisiko in Verbindung gebracht worden (Soubier, 1994). Die zwei hauptsächlich existierenden Allele sind unmittelbar mit unterschiedlich hohen Angiotensinwerten verbunden. Durch Verabreichung von ACE-Hemmern bei Individuen mit dem „schlechten“ Allel des ACE Gens kann entsprechend das Herzinfarktrisiko verringert werden. Diagnostik auf der DNA-Ebene ist verlässlicher als die unmittelbare Mengenbestimmung eines Genprodukts, denn sie ist nicht abhängig von Umweltfaktoren oder der „Tagesform“ des Patienten. In der Zukunft könnte pharmakogenetische Diagnostik verhindern, dass ein Patient falsch behandelt wird, und so einen gezielteren Einsatz der Therapie fördern. Die Lebensqualität eines Patienten würde dadurch wesentlich verbessert und die verfü-

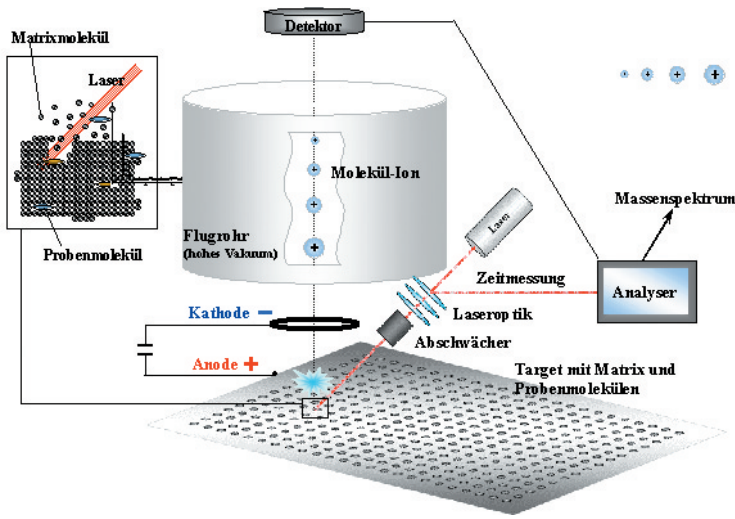


Abb 2 Schematische Darstellung eines MALDI Massenspektrometers
 384 Proben befinden sich auf einem MALDI-Probenhalter. Die Proben werden nacheinander mittels eines kurzen Laserpulses in die Gasphase befördert. Die Massen der Produkte werden durch die Flugzeit bestimmt (Darstellung mit freundlicher Genehmigung von Ole Brandt).

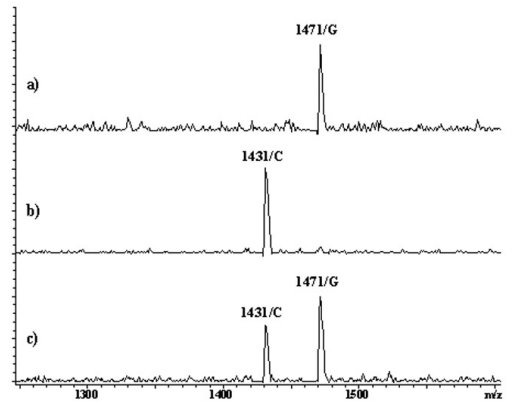


Abb 3 Darstellung der drei möglichen Genotypisierungsergebnisse einer einzelnen SNP Analyse

- a) ist homozygot für das G Allel mit einer Masse von 1471 Da,
- b) homozygot für das C Allel mit einer Masse von 1431 Da, während die DNA in
- c) heterozygot ist.

baren Ressourcen der Krankenversicherungen ließen sich besser nutzen.

Die häufigsten DNA Sequenzvariationen sind single nucleotide polymorphisms (SNP, ausgesprochen „Snip“). Dies sind Positionen im Genom, für die zwei Varianten (Allele) existieren (z.B. C/G an Position X im Genom, ein Individuum kann homozygot für C, heterozygot oder homozygot für G sein). In einer durchschnittlichen Bevölkerung ist das seltenere der zwei Allele häufiger als 1% (in 50 Individuen kommt es mindestens einmal vor). SNPs eignen sich ausgezeichnet, um Genvarianten zu charakterisieren.

Es gibt verschiedene Technologien, um SNPs zu genotypisieren. Die bekanntesten sind: DNA-Microchips, TaqMan, Pyrosequencing, Invader, MALDI-Massenspektrometrie (Gut, 2001). Jede dieser Methoden hat ihre Stärken und ein optimales Anwendungsfeld. Es ist weniger die Frage, welche Methode sich letztendlich durchsetzen wird, sondern diejenige Methode zu identifizieren, die für die jeweilige Fragestellung geeignet ist. Wesentliche Faktoren sind, wie viele SNPs und in wie vielen Individuen diese analysiert werden sollen. Ist ein bestimmter SNP in Millionen verschiedener Individuen oder sind Millionen SNPs in einem einzigen Individuum zu analysieren? Hat das Analyseresultat schnell vorzuliegen?

SNP Genotypisierung mittels Matrix-assistierter Laser Desorptions/Ionisations Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI) ist eine sehr leistungsfähige

Technologie (Ruppert 1998). Für MALDI wird eine zu analysierende Probe (Analyt) zusammen mit einer Träger-substanz (Matrix) auf einem MALDI-Probenhalter eingetrocknet (Abbildung 2). Nach der Einführung des Probenhalters ins Massenspektrometer wird die feste Matrix-Analyt-Mischung durch einen kurzen Laserpuls bestrahlt. Die dabei entstehenden gasförmigen Analytmoleküle werden ionisiert und ihre Masse durch eine Flugzeitanalyse sehr genau bestimmt. Eine einzelne Messung dauert weniger als eine Sekunde. Allelspezifische Produkte werden durch primer extension erzeugt. Eine Erkennungssequenz (Extensionprimer) unmittelbar neben dem zu genotypisierenden SNP wird mit Dideoxynukleotidtriphosphaten und einer DNA-Polymerase verlängert. Entsprechend dem Allel des SNPs wird die komplementäre Base an den Extensionsprimer gebunden. Die Allele des SNPs unterscheiden sich durch die natürliche Massendifferenzen der komplementär eingebauten Basen. Firmen wie Sequenom (Hamburg, D) und Bruker Daltonik (Bremen, D) bieten Systeme an, mit denen mehrere zehntausend SNPs pro Tag mit sehr geringen Fehlerraten analysiert werden können. Um diese Anzahl von Proben bereitstellen zu können, bedarf es einer hervorragenden Logistik und sehr leistungsfähiger Liquidhandlingautomation. Am Centre National de Génotypage wird eine SNP Produktionsstraße mit einer derzeitigen Kapazität von ungefähr 50.000 SNPs pro Tag betrieben. Das System besteht aus einem Liquidhandlingautomaten, zwanzig 384-well PCR Ma-

schinen und einem MALDI Massenspektrometer (Abbildung 1). SNP Genotypisierung mit MALDI Massenspektrometrie hat einige unverkennbare Qualitäten. Die Methode benötigt keine teuren fluoreszenz- oder sonstig markierten DNA Bausteine und die Ergebnisse sind mit dem Computer einfach zu interpretieren, was in der Hochdurchsatzanalytik von großer Bedeutung ist (Abbildung 3). In einer weiteren Hinsicht ist die MALDI Massenspektrometrie zur Genotypisierung von SNP anderen, konkurrierenden Techniken weit voraus. Die Probenvorbereitungssysteme und Massenspektrometer sind praktisch vollständig automatisiert und manuelle Intervention ist nicht notwendig, d.h. eine DNA-Probe kann vorne in eine Produktionsstraße eingespeist werden und das Resultat einige Stunden später vorliegen. Nachteile sind, dass zu analysierende DNA-Fragmente nicht zu groß sein dürfen (< 30 Basen) und die Nachweisempfindlichkeit geringer ist als bei Fluoreszenzmethoden.

Eine SNP Genotypisierungsmethode, die von einer anderen Art Massenspektrometern Gebrauch macht, ist MassCode (Qiagen, Bothell, WA, USA). Ein Electrospray-Ionisations (ESI) Massenspektrometer wird angewendet, um in einer allelspezifischen PCR eingebaute Primer zu identifizieren. Jede Primersequenz ist mit einem Tag einer definierten Masse versehen. In der PCR verwertete Primer werden von nichteingebauten Primern abgetrennt und die Massen der Tags nach Abspaltung vom Primer im ESI MS gemessen. Von den detektierten Tags

Methode	Analyse	Vorteile	Nachteile
MassExtend	MALDI-MS	Komplettlösung, Automation, keine Fluoreszenz	gebunden an Hersteller, Aufreinigung
GOOD Assay	MALDI-MS	einfacher Ablauf, Automation, keine Fluoreszenz	keine Komplettlösung, potentiell toxisches Reagenz
PinPoint	MALDI-MS	Multiplexierung, keine Fluoreszenz	keine Komplettlösung, keine Automation, Aufreinigung
MassCode	ESI-MS	Multiplexierung, keine Fluoreszenz	allelspezifische PCR, beschränkte Alleldiskriminierung
GeneChip	DNA Mikrochip	hochparallele Analyse	Hybridisierung, beschränkte Alleldiskriminierung, keine Automation für die Probenvorbereitung
Invader Assay	Plate Reader	keine PCR, homogenes Format	nur Simplexreaktionen, fluorezenzmarkierte Oligonukleotide
TaqMan Assay	Plate Reader	homogenes Format	nur Simplexreaktionen, fluorezenzmarkierte Oligonukleotide
Molecular Beacons	Plate Reader	homogenes Format	fluorezenzmarkierte Oligonucleotide, Alleldiskriminierung durch Hybridisierung
Pyrosequencing	Plate Reader	Sequenzanalyse, grosser dynamischer Analysebereich	Aufreinigung, keine Automation für die Probenvorbereitung
SNaPshot	Gelanalyse	Multiplexierung	fluorezenzmarkierte Substrate, Gelanalyse, Resultatauswertung

werden auf positive Hybridisierungsereignisse rückgeschlossen und so die vorhandenen Allele der SNPs bestimmt. Ein Vorteil dieser Methode ist, dass aufgrund der Auflösung von single quadrupol ESI MS und isotoopenreinen Tags sehr viele verschiedene Oligonukleotidsequenzen gleichzeitig verwendet werden können, d.h. die parallele Genotypisierung von einigen hundert SNPs ist aus dem Blickwinkel des Massenspektrometer-Einsatz' unproblematisch. Wesentlich schwieriger ist die hochparallele Darstellung der allelspezifischen Tags. Durch unterschiedliche Templatkonzentrationen, Hybridisierungs- und PCR-Effizienz werden Tags mit unterschiedlichen Intensitäten detektiert, was die Allelzuweisung erschwert.

Für ESI Massenspektrometer wird die Ionisation der zu analysierenden Produkte dadurch erreicht, dass eine Lösung der Analyten durch eine elektrisch geladene Düse fein versprüht wird. Dieses Spray wird ins Hochvakuum des Massenspektrometers eingeführt. Auf Grund der Verdampfung vom Lösungsmittel auf dem Weg ins Hochvakuum bleiben letztendlich nur die Analyten in einem hochgeladenen Zustand

übrig. Die Massen der Analyten werden mittels ihrer Abweichung in einem Magnetfeld (Quadrupol) bestimmt. Im Gegensatz zu MALDI Massenspektrometern sind single quadrupol ESI Massenspektrometer preisgünstiger.

Wie sieht die Zukunft der Genotypisierung mittels Massenspektrometrie im Licht der Pharmakogenetik aus? Dies ist eine schwer zu beantwortende Frage. Viele Szenarien einer Medizin der Zukunft sind denkbar. Falls Pharmakogenetik zum Einsatz kommt, wird vor der Verabreichung eines Medikaments ein entsprechendes genetisches Profil erstellt. Angenommen, ein aussagekräftiges Profil würde aus einigen hundert SNPs bestehen, könnte ein solches Profil bei Neugeborenen erstellt werden. Dafür wäre Massenspektrometrie für diagnostische Labore eine gute Wahl. Später könnten Profile bei Bedarf vom behandelnden Arzt abgefragt werden. Falls aber der jeweilig behandelnde Arzt dieses Profil beim Besuch des Patienten erstellt, würde die Wahl wahrscheinlich auf eine andere Methode fallen.

Es gibt einige Bestrebungen der pharmazeutischen Industrie Genotypisierung für die Medikamentenentwicklung einzusetzen. Falls dies gelingt wird die Anzahl der Medikamente auf dem Markt ansteigen. Das einzelne Medikament wird dafür eine geringere Anwendungsbreite haben, weil es für jede Patientengruppe gezielt ein Medikament gibt. Es ist sehr wahrscheinlich, dass Pharmafirmen Medikamente, die in der Vergangenheit keine Zulassung erhalten haben, unterstützt durch Genotypisierung erneut betrachten werden. Es ist denkbar, dass in der Pharmaindustrie dadurch eine Verschiebung der Forschung in Richtung Genomik/Proteomik erfolgen wird. Die Integration der Pharmakogenetik wird auf jeden Fall den verstärkten Einsatz der DNA Diagnostik mit sich bringen.

Investitionen für die Genotypisierung mittels Massenspektrometrie sind beachtlich. Die Massenspektrometer und dazugehörigen Automaten sind groß und müssen von spezialisiertem Personal betrieben werden. Es ist damit zu rechnen, dass in der Zukunft wesentlich kleinere, kompaktere, preisgünstigere und einfachere Massenspektrometer auf dem Markt erscheinen werden. In der gegenwärtigen Form ist es sicherlich nicht eine Technologie, die in der Arztpraxis einsetzbar ist. Aufgrund ihrer Präzision und Schnelligkeit hat die Massenspektrometrie als diagnostisches Instrument jedoch sehr viel zu bieten. Es ist auch denkbar, dass Mikrosystemtechnik zur Probenvorbereitung herangezogen wird. Ein solches System müsste alle notwendigen Reaktionsschritte durchführen, um die entsprechend konditionierten, allelspezifischen Produkte herzustellen und diese in massenspektrometertauglichen Form vorzulegen. Dies würde den Einsatz in der Arztpraxis wahrscheinlicher machen. Derzeit ist SNP Genotypisierung mit Massenspektrometern jedoch noch eine Technologie für Spezialisten, was aber auch für alle anderen SNP Genotypisierungsmethoden gilt. Eine Hürde, die allen SNP Genotypisierungsmethoden noch bevorsteht, ist die Erlangung der behördlichen Zulassung für die diagnostische Anwendung.

Hauptsächliche SNP-Genotypisierungsmethoden, die Massenspektrometer zur Analyse verwenden

MassExtend

Diese von Sequenom (Hamburg) entwickelte und vermarktete Methode verwendet ein primer extension Protokoll zur Herstellung allelspezifischer Produkte. Nach Aufreinigung wird die Masse der allelspezifischen Produkte mit MALDI Massenspektrometrie analysiert. Sequenom hat eigens für dieses Verfahren eine Automatisierung entwickelt. Diese Systeme sind in der Lage ungefähr 30.000 SNPs pro Tag zu vermessen.

GOOD Assay

Diese am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik (Berlin) und am Centre National de Génotypage (Evry) entwickelte Methode ist ebenfalls ein primer extension Protokoll. Es unterscheidet sich von MassExtend und Pinpoint darin, dass es aufgrund einer chemischen Modifikationsstrategie keine Aufreinigung benötigt. Zur Analyse wird MALDI Massenspektrometrie eingesetzt. Am CNG wird dieses Verfahren mit einer entsprechenden Automatisierung betrieben.

PinPoint

Dieses Verfahren wurde von Applied Biosystems (Foster City, USA) entwickelt. Es basiert wie MassExtend und GOOD Assay auf primer extension. Im Unterschied zu MassExtend wird ein anderes Aufreinigungsverfahren eingesetzt. Auch für dieses Verfahren wird MALDI Massenspektrometrie zur Analyse verwendet.

MassCode

Dieses Verfahren ist von Qiagen (Bothel WA, USA) entwickelt worden. Es basiert auf Hybridisierung zur Unterscheidung der verschiedenen Allele. Nur vollständig komplementäre Primer hybridisieren und führen zu der erfolgreichen Bildung eines PCR Produkts. Jeder Primer, der verwendet wird, ist mit einem charakteristischen Massenlabel (Tag) versehen. Die PCR Produkte werden von den nicht hybridisierten Primern getrennt. Die Tags werden photochemisch abgespalten und in einem single quadrupol elec-

tropray Massenspektrometer analysiert. Durch die detektierten Tags wird auf die entsprechenden Oligonukleotidsequenzen rückgeschlossen.

Der Einbezug eines zusätzlichen enzymatischen Reaktionsschritts (primer extension) in die Herstellung allelspezifischer Produkte und deren unmittelbare Massenanalyse gewährleistet bessere Alleldiskriminierung. Dies ist aber mit erhöhten Kosten durch den Preis der zusätzlich benötigten Enzyme verbunden. Der Massenbereich, in dem MALDI-MS eingesetzt werden können, ist wesentlich größer als der für ESI MS. Dadurch werden allelspezifische Produkte selbst mit MALDI-MS analysiert. Die Anforderungen an die Reinheit der Proben ist in ESI MS noch höher als für die MALDI MS. Dafür ermöglicht ESI MS eine wesentlich höhere Auflösung, notwendig vor allem in der Proteinanalytik, weniger in der DNA Analytik.

Literatur

Gut IG (2001) Automation in genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Hum. Mutat.* 17: 475-492.

Ibeanu GC, Blaisdell J, Ferguson RJ, Ghanayem BI, Brosen K, Benhamou S, Bouchardy C, Wilkinson GR, Dayer P, Goldstein JA (1999) A novel transversion in the intron 5 donor splice junction of CYP2C19 and a sequence polymorphism in exon 3 contribute to the poor metabolizer phenotype for the anticonvulsant drug S-mephenytoin. *J. Pharmacol. and Exp. Therap.* 290: 635-640.

McCarthy JJ, Hilfiker R (2000) The use of single nucleotide polymorphism maps in pharmacogenomics. *Nature Biotechnology* 18: 505-508.

Ruppert, A. (1998) Der Einsatz der Massenspektrometrie in der DNA-Analyse und Genomforschung. *medizinische genetik* 10: 500 – 503.

Soubrier F and Cambien F (1994) The angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism: implication in hypertension and myocardial infarction. *Current Opin. Nephrol. Hypertens.* 3: 25-29.

Korrespondenzadresse

Ivo Glynne Gut
 Centre National de Génotypage
 2 rue Gaston Crémieux
 F – 91057 Evry Cedex, Frankreich
 Fax 0033 1 6087 8383
 ivogut@cng.fr