

2. BIOSENSOR SYMPOSIUM

TÜBINGEN 2001

<http://barolo.ipc.uni-tuebingen.de/biosensor2001>

Echtzeitdetektion von Punktmutationen mit DNA-Chips am Beispiel des SULT1A1*213-SNP

Nejad Gajovic-Eichelmann, Andrea Griep, Eva Ehrentreich-Förster, Frank F. Bier

Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (FhG-IBMT), A-Scheunert-Allee 114-116, 14558

Bergholz-Rehbrücke

Tel. 033200-88350

<mailto:gajovicn@ibmt.fhg.de>

Registriernummer der Online-Anmeldung: 263

Poster

Der Identifizierung von Punktmutationen im menschlichen Genom kommt eine hohe Bedeutung zu. Die Entdeckung einer Vielzahl von SNPs ("single nucleotide polymorphisms"), also Mutationen einzelner Basen, die definitionsgemäß bei mehr als 1% der Bevölkerung auftreten, und die Erkenntnis, dass SNPs die Nebenwirkungen von Medikamenten determinieren können, führte zu der Vision einer "personalisierten Medizin": Der Patient erhält nach einer Genotypisierung das für ihn verträglichste Medikament verschrieben.

Notwendige Bedingung für das neue Paradigma ist eine schnelle und hochdurchsatzfähige DNA-Analytik. Da bis zu 3 Millionen von SNPs beim Menschen vermutet werden (www.snp.cshl.org), ist das etablierte Verfahren mittels PCR-Amplifikation, Restriktionsenzymverdau und Elektrophorese nicht praktikabel. Neben den zum Massenscreening geeigneten, spezialisierten MALDI- (z.B. Sequenom ®) und Primer-Extension-Verfahren (z.B. Orchid Biocomputer ®) wird insbesondere die DNA-Chip-Technologie als vielversprechende Methode für mittlere bis hohe Durchsätze und Vor-Ort-Anwendungen angesehen.

Der Einsatz dieses Verfahrens zum SNP-Screening wird am Beispiel des SULT1A1*213-SNPs demonstriert. Das SULT1A1-Gen beim Menschen kodiert für eine cytosolische, thermostabile Phenol-Sulfotransferase (P-PST, EC 2.8.2.1), die in der Leber durch Sulfonierung von phenolischen Substraten Biosynthese und Entgiftungsfunktionen ausübt. Bisher wurden drei Punktmutationen in diesem Gen entdeckt (Raftogianis 1997). Die Variation *213Arginin nach *213Histidin, die bei ca. 37% der (kaukasischen) Bevölkerung auftritt, führt zu einem deutlich verschiedenen Phänotyp (geringere Aktivität, geringere Thermostabilität, Engelke 2000) und wird mit Übergewicht in Zusammenhang gebracht.

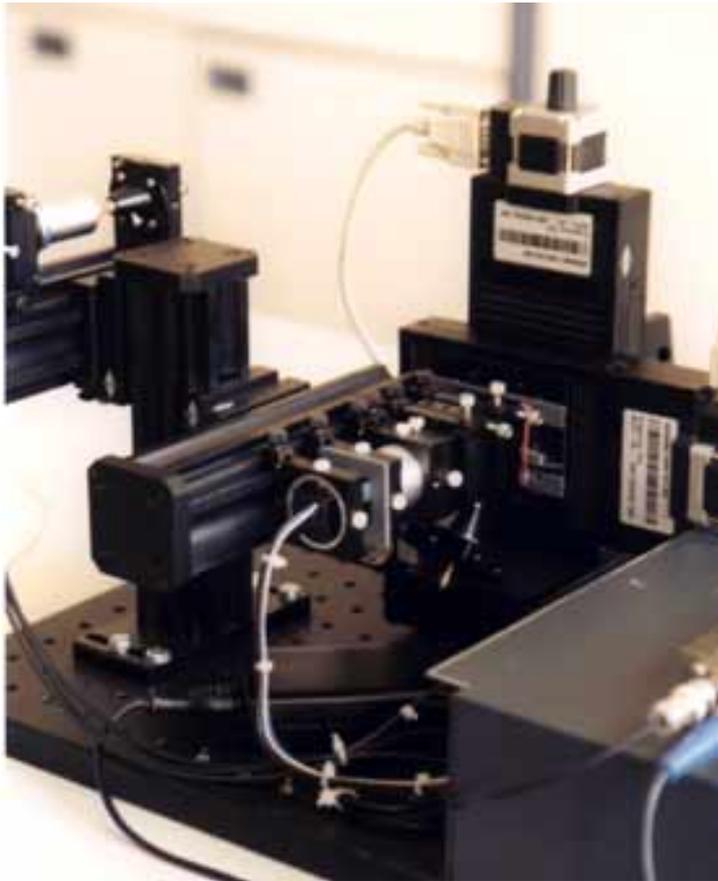


Abb. 1: Biochip-Scanner des FhG-IBMT

Der am IBMT verfolgte Ansatz verwendet DNA-Chips auf Glasbasis, die mit 13- bis 20-meren DNA-Oligos als Sonden beschichtet werden und den Locus der Punktmutation und deren unmittelbare Nachbarschaft abfragen. Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten Proben-DNA mit den immobilisierten Sonden und die nachfolgende Dissoziationsphase werden in einem Fließsystem realisiert und mit einem am IBMT entwickelten Biochip-Scanner detektiert (Siehe Abb. 1). Das Messprinzip beruht auf der lokalisierten Anregung je eines DNA-Spots mittels Faseroptik und der Detektion des emittierten Fluoreszenzlichts, das auf einen Photomultiplier fokussiert wird.

Die Messung erfolgt in Echtzeit, wobei wahlweise die absolute Fluoreszenzintensität (Abb. 2, Imaging-Mode) oder der zeitliche Verlauf der Intensität jedes einzelnen Spots über die Messdauer (Hybridisierungs- bzw. Dissoziationskinetik) dargestellt werden können.

In der vorliegenden Arbeit wird die Auswertung der Hybridisierungs- und Dissoziationskinetik zur Identifizierung des SULT1A1-SNPs in zufällig ausgewählten Probanden demonstriert. Die Technik wird als hilfreich zur Etablierung von einfacher strukturierten DNA-Chips angesehen.

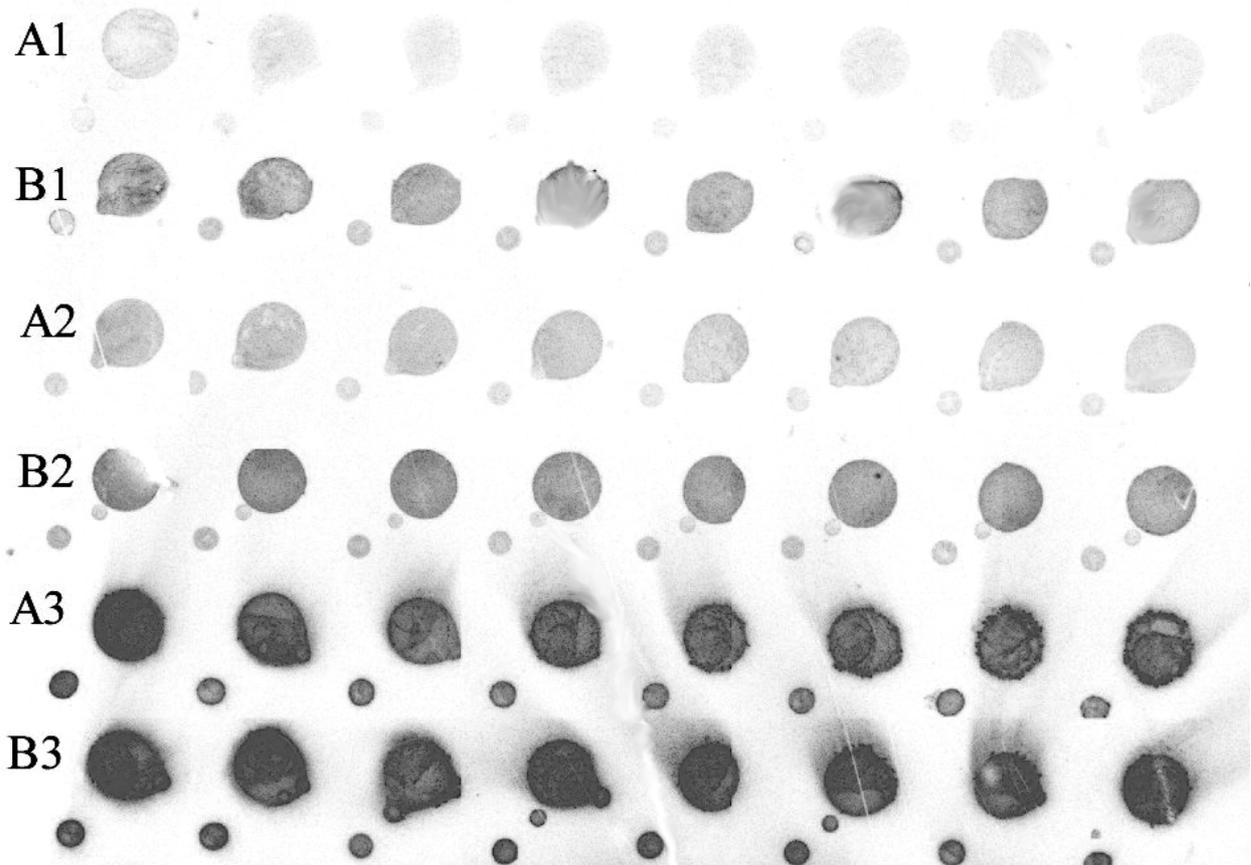


Abb. 2: Entwickelter DNA-Chip mit immobilisierten 13-mer Oligos (inverse Darstellung): Die Zeilen A1, A2, A3 stellen den mismatch-Fall dar, B1, B2, B3 den full-match (perfekte Basenpaarung). Die Konzentrationen der immobilisierten Sonden nehmen von 1 nach 3 zu (1-10 μM). Bei geeigneter Konzentration sind die Einzelbasenabweichungen mit bloßem Auge zu erkennen (A1 vs. B1, A2 vs. B2).