

Microarrays ▾

# Microarrays mit elektrischer Detektion zur Genexpressions- und SNP-Analyse

Dr. Gerhard Hartwich, FRIZ Biochem GmbH,  
Dr. Sabine Duntze, b3c, München

Die EDDA®-Technologie der FRIZ Biochem ist eine rein elektrische Version von DNA-Microarrays, die eine parallele Detektion von SNPs ohne vorangeschaltete Primer Extension-Reaktionen erlaubt. Damit ist der Grundstein für einen routinemäßigen Einsatz von Microarrays in der medizinischen Diagnostik gelegt.

Die meisten Microarray-Technologien basieren auf der Fluoreszenz-Detektion amplifizierter und fluorophormarkierter Target-Sequenzen. Seltener sind massenspektrometrische oder elektrische Detektionsverfahren. DNA-Microarrays haben sich innerhalb eines kurzen Zeitraums zu einem wichtigen Werkzeug in der Molekularbiologie entwickelt. Die Anwendungsmöglichkeiten sind jedoch noch eingeschränkt, denn geringe Verlässlichkeit, komplizierte Handhabung und hohe Kosten verhindern Routine-Anwendungen bei Genexpressions- und SNP-Analysen. Die Herausforderung besteht darin, die Technologie soweit zu verbessern, daß DNA-Microarrays auch in der medizinischen Diagnostik angewendet und zugelassen werden können.

## SNP-Analyse

Anomalien humaner Nukleinsäuren, wie Punktmutationen (SNPs, Single Nucleotide Polymorphisms), Deletionen, Expressionsunterschiede oder Abweichungen im Methylierungsmuster genomischer DNA, spielen bei der Entstehung und Entwicklung von Krankheiten eine wichtige Rolle. Sie werden in der medizinischen Diagnostik oft über standar-

disierte PCR-Assays ermittelt. Da bei manchen Krankheiten Hunderte von Sequenzabschnitten auf Anomalien hin überprüft werden müssen und die standardisierte PCR-Analytik nur seriell funktioniert, ist der finanzielle, personelle und zeitliche Aufwand enorm. Abhilfe können Microarrays schaffen, die alle relevanten Sequenzen parallelisiert in einer Analyse überprüfen. Allerdings müssen solche Microarrays der Anforderung gerecht werden, auch SNPs zuverlässig zu detektieren.

Ein gängiges Verfahren zur SNP-Detektion basiert auf einer PCR, bei der der SNP-beinhaltende DNA-Abschnitt vervielfältigt und anschließend einer Post-PCR-Analytik für die eigentliche SNP-Identifizierung unterzogen wird. Bei der klassischen RFLP-Methode (RFLP = Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus) muß die Mutation im Bereich der Schnittstelle eines ausgewählten Restriktionsenzymen liegen. Im Mutationsfall wird diese Position von bestimmten Restriktionsenzymen nicht mehr erkannt und geschnitten, wohl aber im nicht-mutierten Fall. Dabei entstehen verschieden lange DNA-Stücke, die über Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend detektiert werden können.

Eine Alternative dazu ist die SNUPE-Methode (Single nucleotide primer extension). Hier wird in einer weiteren Polymerase-Reaktion ein Primer an die Target-Sequenz in unmittelbarer 3'-Nachbarschaft zum möglichen SNP gebunden und einer „Ein-Basen-Erweiterung“ unterzogen. Der so verlängerte Primer wird dann massenspektrometrisch auf die neu eingebaute Base hin überprüft. Damit bietet SNUPE die Möglichkeit zur Detektion einer größeren Anzahl von SNPs, wobei arbeitsintensive Primer-Extension-Reaktionen nach wie vor notwendig sind. Bei einer routinemäßigen Überprüfung von gegebenenfalls Hunderten von Sequenzabschnitten steigen zudem die Kosten, da für die Detektion eines SNPs mindestens 1 € kalkuliert werden muß.

## EDDA® – Electrically Detected Displacement Assay

Die von dem Unternehmen FRIZ Biochem entwickelte EDDA®-Microarray-Technologie basiert auf einer elektrischen Detektion. Das dafür erforderliche Auslesegerät kostet etwa ein Zehntel heutiger Fluoreszenz-oder Massenspektrometrie-Systeme und ist damit wesentlich kostengünstiger. Abbildung 1 illustriert das EDDA®-Prinzip. Die unmarkierten Sonden-Oligonukleotide zur Identifizierung einer bestimmten Target-Sequenz sind auf einer Elektrode eines Mikroelektroden-Arrays immobilisiert. Ist in der Untersuchungslösung das zur Sonde passende Target vorhanden, werden die Sonden je nach Konzentration der Targets in der Untersuchungslösung besetzt. Nichtbesetzte Sonden werden durch Zugabe markierter (+) Signal-Oligonukleotide, die locker an die unbesetzten Sonden assoziieren, elektrisch abgefragt. Die Methode erlaubt die parallele quantitative Bestimmung von Target-Sequenzen. Sie weist bei Verwendung von 50 µm x 50µm Mikroelektroden ein Detektionslimit von 10<sup>6</sup> Kopien der Target-Moleküle auf.

## Microarray-Substrat und Auslesegerät

Zur Zeit verwendet FRIZ Biochem Arrays mit bis zu 96 Einzelelektroden auf zwei mm<sup>2</sup> (50µm x 50µm Elektroden im 200 µm Abstand). Die Mikroelektroden-Arrays werden extern über Standard-Platinen-Technologie hergestellt. Eine weitere Erhöhung der Testsite-Zahl ist auf Platinen (passiv angesteuerte Arrays) wenig sinnvoll. Deshalb arbeitet FRIZ Biochem in Kooperation an einem Silizium-CMOS-Chip mit Gold-Einzelelektroden, die aktiv angesteuert werden können. Mit diesem Chip kann in einer ersten Ausbaustufe sowohl die Elektroden-Anzahl um den Faktor 20 erhöht als auch die Dichte durch Verringerung des Elektroden-Abstan-

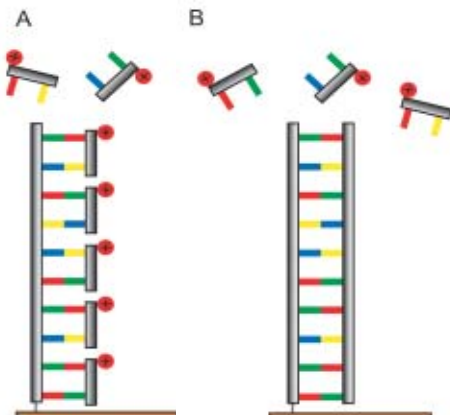
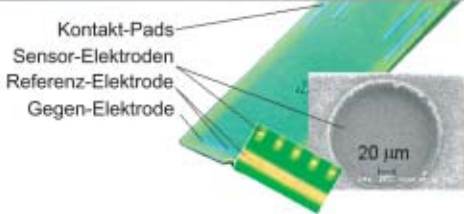


Abb. 1: Prinzip der EDDA®-Technologie. (A) Bei Abwesenheit einer passenden Target-Sequenz binden die Signal-Oligonukleotide an die Sonde. Es wird ein starkes Signal gemessen. (B) Enthält die Untersuchungslösung das passende Target, hybridisiert dieses wegen der höheren Bindungskonstante mit der Sonde. Es wird kein Signal gemessen.



Abb. 2: Microarray-Substrat und Reader für EDDA®-Technologie



des auf 100 µm deutlich erhöht werden. Darüber hinaus erlaubt die CMOS-Technologie eine Integration der elektrischen Meßwert-Signalerfassung direkt auf dem Array. Dadurch wird die Sensitivität der Detektion erhöht, und das Auslesegerät ist direkt auf dem Chip integriert, so daß für die Meßwernerfassung nur noch ein adaptierter Laptop benötigt wird, der die digitalisierten Meßdaten des Chips auf dem Bildschirm darstellt. Gegenwärtig erfolgt die Datenerfassung des mit Untersuchungslösung inkubierten Microarrays in einem einfachen und kostengünstigen elektrischen Reader (Abb. 2), der auch das notwendige Liquid handling (Inkubation mit Signal-Oligonukleotiden) automatisch durchführt.

### Spotting

Die Sondenimmobilisierung erfolgt über einen Spotting-Prozeß. Dies ermöglicht die Verwendung qualitätskontrollierter Sonden, die off-chip synthetisiert, aufgereinigt und über Massenspektrometrie charakterisiert werden. Der Anbindungsprozeß erfolgt über einen proprietären Polythiolanker, der in der automatisierten Festphasensynthese an die Sonden-Oligonukleotide gebunden wird und die Stabilität der Sondenanbindung gegenüber harschen Reaktionsbedingungen erhöht. Eine qualitativ und quantitativ reproduzierbare Immobilisierung der Sonden ist durch FRIZ Biochems „Pseudo-Kontakt-Spotten“ gewährleistet. Dabei wird die ursprünglich versiegelte Gold-Sensorfläche unmittelbar vor dem Spotten über Laserablation freigelegt. Im anschließenden konventionellen Spotting-Verfahren mittels Dosier-Nadeln setzt der relativ große Nadelkopf (100 µm Durchmesser) auf der umgebenden Versiegelungsschicht auf, und die Flüssigkeit wird auf die kleinere freie Gold-Sensorfläche übertragen. Hierdurch wird eine ideale Belegungsdichte (etwa  $5 \times 10^7$  Sonden/Sensorfläche; weniger als 5% Streuung) bei maximaler Hybridisierungseffizienz (90-95%) erreicht. Die Länge der Sonden kann über weite Bereiche variiert werden. Im Gegensatz zu anderen Technologien muß die Länge der Sonden bei FRIZ Biochem nicht auf einheitliche Hybridisierungs-Stringenzbedingungen optimiert werden, was in der Regel gleiche Schmelztemperaturen zwischen Sonde und Target bei allen Testsites erfordert. Dies wirkt sich nicht nur positiv auf den Content-Optimierungsprozeß aus, sondern vereinfacht auch die Hybridisierung, die nicht unter einheitlichen und dadurch schlechten Stringenzbedingungen für das gesamte Array durchgeführt werden muß. Die Technologie von FRIZ Biochem erlaubt individualisierte Stringenzbedingungen für jede Testsite, die über die geeignete Wahl der Signal-Oligonukleotide

eingestellt wird. Beides, die größere Wahlfreiheit bei der bioinformatischen Content-Optimierung und die individualisierte Stringenz, erhöhen die Selektivität der biologischen Datenerfassung deutlich und erlauben eine homogene Assay-Führung.

### Detektion von SNPs mit EDDA®

Bei Anwendung geeigneter Signal-Oligonukleotide kann die EDDA®-Technologie eindeutig zwischen Perfect Match und Mismatch diskriminieren und für SNP-Messungen herangezogen werden (Abb. 3). An Testsite 1 befindet sich die Sonde, die eine Target-Sequenz perfekt erkennt (WT, Wildtyp-Erkennner-Sequenz) und an Testsite 2 die Sonde, die in der Mitte einen Ein-Basen-Mismatch mit der Target-Sequenz ausbildet (SNP). Nach 30minütiger Inkubation der Testsites mit der Target-Sequenz werden geeignete Signalsonden (SNP-IDs) zugegeben und die elektrische Antwort zeitabhängig aufgezeichnet. Da die beiden SNP-IDs den sequenzgetreuen Gegenstrang der Sonden beider Testsites darstellen, wird das Target von Testsite 2 (SNP) deutlich schneller verdrängt als das perfekt hybridisierte Addukt der Testsite 1 (WT). In einer standardisierten Messung reicht es aus, die ersten drei Meßpunkte (3 - 6 Min.) aufzunehmen und anhand der damit ermittelbaren Steigung zwischen Perfect Match und Mismatch zu unterscheiden.

### Anwendungspotential: Medizinische Diagnostik

Die Herausforderung der Microarray-Technologie besteht in der Entwicklung von Diagnostik-Chips zur Detektion von Risiko- und Prognosefaktoren von Krankheiten, wie beispielsweise Tumoren, und ihrer Zulassung. Multiparameter-Tests, wie sie mit Microarrays möglich sind, können wertvolle Informationen über Herkunft, metastatisches Potential und Therapierbarkeit liefern. Solche Diagnostik-Chips könnten nicht nur eine Früherkennung ermöglichen, sondern auch den Weg für individualisierte Therapien ebnen. Während sich FRIZ Biochem auf die Entwicklung der Technologie konzentriert, werden Anwendungen in Kooperation mit Partnern entwickelt.

### Korrespondenzadresse

Dr. Gerhard Hartwich  
Staffelseestraße 6  
D-81477 München  
Tel./Fax: +49-(0)89-724409-0 /-10  
eMail: gerhard.hartwich@frizbiochem.de

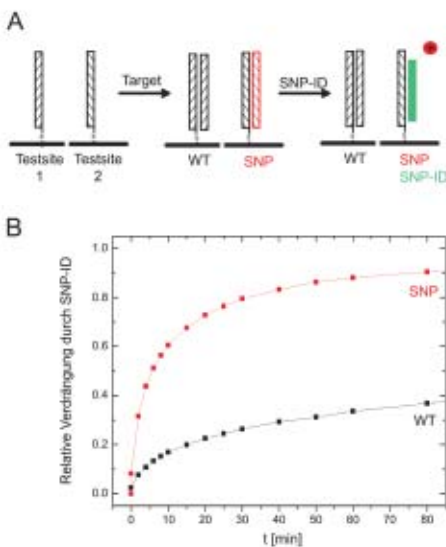


Abb. 3: SNP-Detektion mit der EDDA®-Technologie. (A) An Testsite 1 befindet sich die Sonde, die eine Target-Sequenz perfekt erkennt (WT) und an Testsite 2 die Sonde, die einen Mismatch mit der Target-Sequenz ausbildet (SNP). In Gegenwart von Signal-Oligonukleotiden (SNP-IDs) wird das Target, welches einen SNP ausbildet, deutlich schneller verdrängt als das perfekt hybridisierte Wildtyp-Addukt (B).