

Syntetisk DNA

Syntetiske efterligninger af DNA og RNA kan blive en vigtig brik i udviklingen af moderne lægemidler. Låst Nucleinsyre (LNA) er et sådant syntetisk DNA-molekyle, som der stilles store forventninger til

Af Jesper Wengel, Kemisk Institut, Syddansk Universitet, Odense, jwe@chem.sdu.dk

Moderne naturvidenskabelig forskning bevæger sig ofte i grænseområdet mellem etablerede discipliner. Dette gælder i høj grad for udviklingen af syntetiske efterligninger af naturens egne nucleinsyrer DNA og RNA, som udspiller sig på grænsen mellem kemi og biologi. Der er store interesser i denne forskning – dels fordi det kan give os en øget forståelse for kemiske og biologiske processer på det molekylære plan, men også fordi syntetisk DNA spås en stor fremtid inden for udviklingen af nye lægemidler og diagnostik.

Lægemidler uden bivirkninger

Et problem ved mange lægemidler er, at de ikke kun virker der, hvor sygdommens årsag findes, hvorfor der opstår bivirkninger. Et eksempel er kemoterapi, hvor man vha.

kemiske forbindelser forsøger at hæmme formeringen af kræftceller. Desværre hæmmer de kemiske forbindelser ikke bare væksten af kræftceller, men også af kroppens normale celler. Derfor er der et stort behov for at udvikle mere selektive lægemidler, der virker specifikt på sygdommens årsag og kun der.

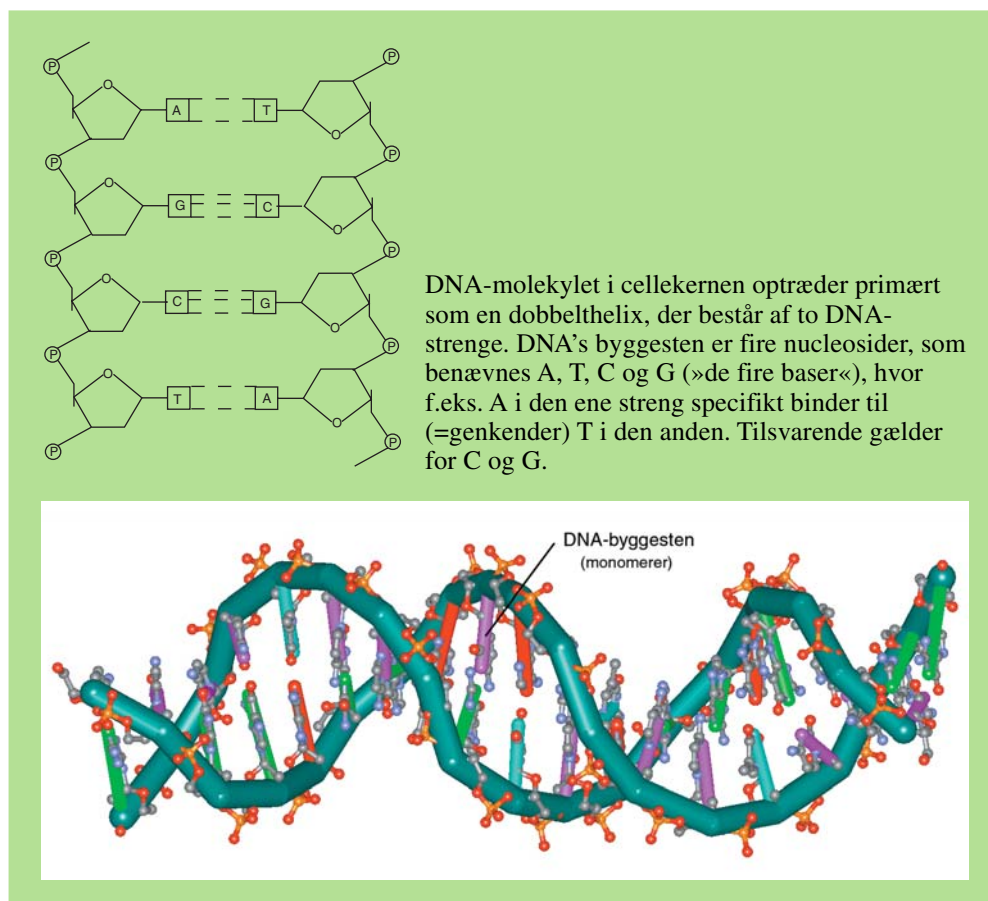
En lang række kendte sygdomme kan henføres til et eller flere sygdomsrelaterede proteiner (f.eks. receptorer eller enzymer), som er dannet af kroppen. Proteinet kan f.eks. indgå som et nødvendigt element til opbygning, og dermed til formering af HIV-virus partikler, eller det kan føre til udvikling af cancer, hvilket f.eks. under visse omstændigheder gælder for de såkaldte *ras* proteiner, der er involveret i cellevækst.

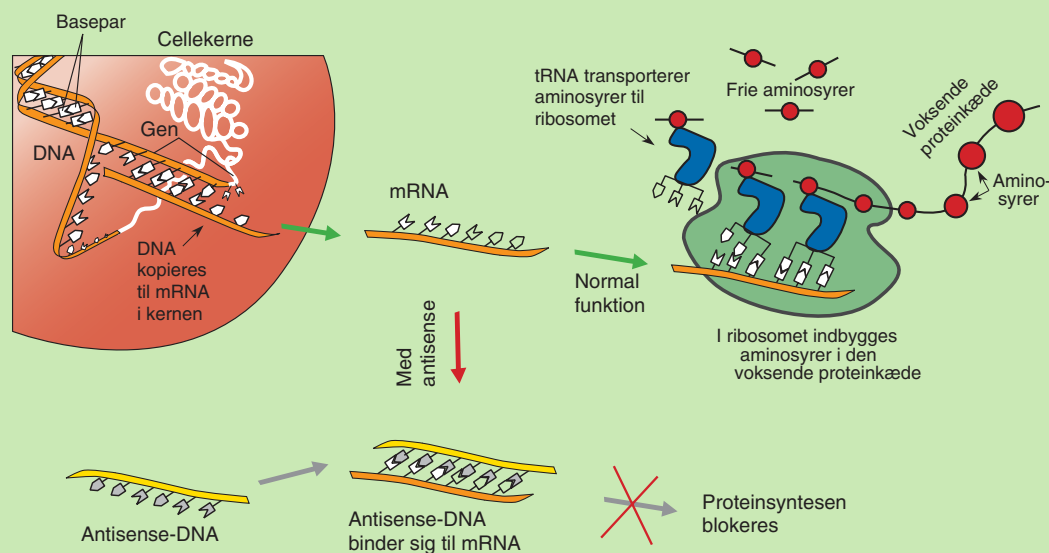
Traditionelt har man i udviklingen af lægemidler arbejdet på at gribe ind i de biokemiske processer, der foregår med kroppens proteiner. Et eksempel er kombinationsbehandling af HIV-infektion, der foregår med forskellige stoffer, der hæmmer nogle af de enzymer, der er vigtige for formering af HIV-virus (henholdsvis enzymet HIV revers-transcriptase og HIV-proteasen).

Antisense-lægemidler

Bl.a. for at undgå bivirkninger udviklede man sidst i firserne et nyt revolutionerende terapeutisk princip: Antisense-lægemidler. Princippet går ud på at bremse sygdommen ved kilden ved at forhindre produktionen af skadeligt protein. I praksis foregår det ved at hæmme udtrykkelsen af de gener, som koder for de skadelige proteiner. Hertil designer man en syntetisk DNA-streng (antisense-DNA) så den netop binder sig (dvs. laver dobbeltstreng) til den budbringer-RNA, der danner skabelon for det skadelige protein. På denne måde er dannelsen af proteinet blokeret (figur 1, side 16).

I forhold til det ovennævnte eksempel med HIV-infektion vil





Princippet i antisense-teknologien
Øverst ses den normale proteinsyntese, hvor der dannes mRNA-kopi (=budbringer-RNA) af et gen på cellekernens DNA. Denne mRNA-kopi transporteres ud af cellekernen til ribosomet i cellens cytoplasma. Her aflæses mRNA'et og oversættes til aminosyrer, der sættes sammen i en lang kæde, hvorved et protein er dannet. Det er denne proces, som antisense-DNA'et griber ind i ved at binde sig til mRNA, inden det bliver oversat i ribosomet. Herved blokeres proteinsyntesen, og genetisk betingede sygdomme kan bremses.

Figur 1

man specifikt kunne forhindre dannelsen (dvs. biosyntesen) af de to enzymer og dermed forhindre formeringen af HIV-virus.

Det første antisense-lægemiddel blev sidste år godkendt i USA til behandling af CMV-infektion (en virusinfektion i øjet, der bl.a. optræder hos AIDS-patienter).

De ideelle egenskaber for syntetisk DNA

Det er ikke muligt at anvende almindelige (dvs. kemisk umodificerede DNA- eller RNA- strenge) som antisense-lægemidler, idet naturlige enzymer (nucleaser) i løbet af kort tid vil nedbryde disse for kroppen fremmede molekyler. Derfor har man de seneste 10 år i forskningslaboratorier verden over forsøgt at udvikle syntetiske DNA- og RNA-strengene med de rette egenskaber. På trods af den intensive forskningsindsats, som har udmøntet sig i syntesen af over 1000 kemisk set forskellige syntetiske DNA-eftertiligninger, er det ikke lykkedes at fremstille en streng med de helt rigtige egenskaber. Den ideelle nucleinsyre-eftertiligning skal kunne binde sig stærkt og med stor præcision (dvs. med korrekt base-base-genkendelse) til sin komplementære sekvens. Yderligere skal disse bindingsegenskaber kombineres med f.eks. opløselighed i vand, evne til at trænge gennem membraner og modstandsdygtighed over for enzymatisk nedbrydning.

LNA – en god eftertiligning

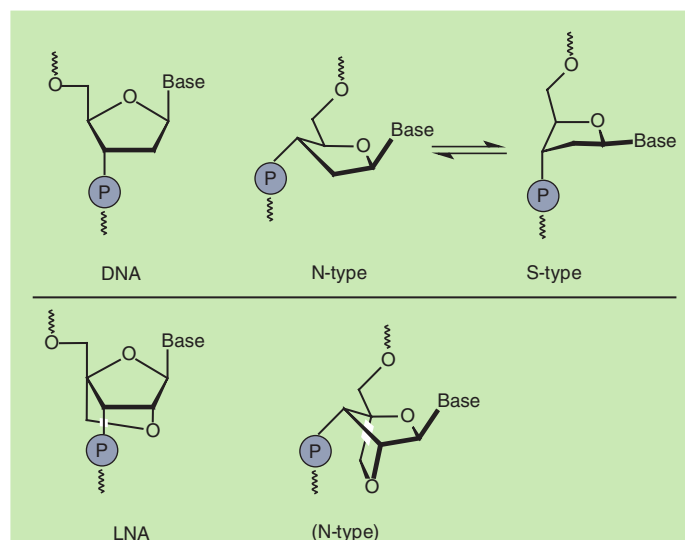
Vi påbegyndte vores forskning på området med det ønske at udvikle en nucleinsyre-eftertiligning, som kunne imødekomme disse krav. Vores tilgang til emnet var anderledes end mange andre forskergrupper, idet vi havde en ide om, at kemiske ændringer i DNA'ets sukkerdel (ribose-delen) kunne være interessant (strukturen af DNA kan ses på figur 2).

Sukkerringene i en DNA-streng kan vrides og antage forskellige strukturer. Når en DNA-streng binder til en komplementær RNA-streng (f.eks. et budbringer-RNA), skal sukkerringene alle indstille sig i én bestemt konformation.

Vores udgangspunkt var at forsøge at designe en syntetisk DNA-streng, som kunne binde sig til komplementært budbringer-RNA, uden at det syntetiske DNA behøvede at tilpasse sig væsentligt rent strukturelt.

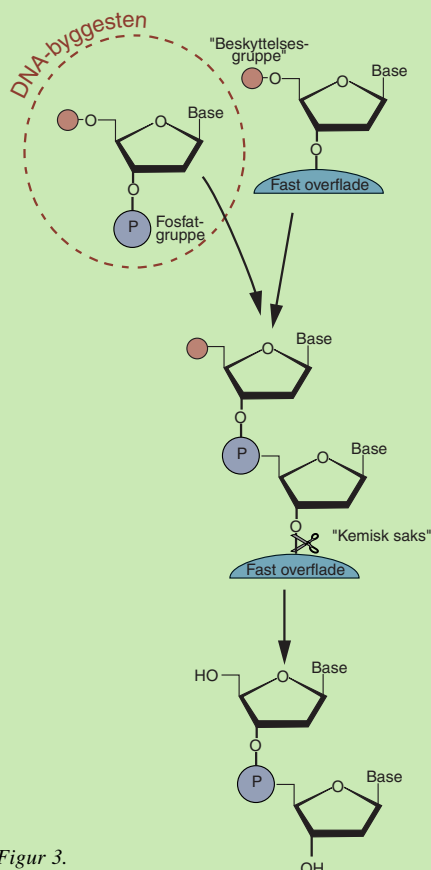
Ved at studere molekylmodeller fandt vi frem til en interessant mulighed, hvor sukkerringen er fastlåst i en RNA-lignende struktur. Strukturen kaldte vi LNA (figur 2), hvilket står for Locked Nucleic Acid (»Låst Nucleinsyre«).

Det lykkedes at fremstille LNA i synteselaboratoriet (se figur 3 for beskrivelse af automatiseret DNA-syntese), og det viste sig hurtigt at LNA, langt bedre end nogen anden kendt DNA-eftertiligning, kan binde stærkt til komplementært DNA og



Figur 2.

Øverst til venstre ses strukturen af en DNA-monomer, og til højre ses de to dominerende udgaver (konformationer), som benævnes N- og S-type. Nederst til venstre ses strukturen af en LNA-monomer og til højre den fastlåste N-type konformation. Denne fastlåsning af en streng bestående af en blanding af LNA- og DNA-monomerer, eller udelukkende LNA-monomerer, bevirker binding af LNA til komplementære DNA- og RNA-strengene med hidtil uset styrke.



Figur 3.

Fremstilling af syntetisk DNA

Takket være et målrettet forskningsarbejde af organiske kemikere i specielt 70'erne og 80'erne findes der i dag effektive metoder til automatiseret syntese af DNA- (og RNA-) strenge med en længde op til ca. 100 monomerer. En monomer er en DNA-byggesten, dvs. en sukkerring (2-deoxy-D-ribose i DNA og D-ribose i RNA) forbundet med en base. De enkelte monomerer er hængt sammen med såkaldte fosfatbroer. Hvor det for 25 år siden tog flere måneder at syntetisere en 8-mer DNA-streng (8 monomerer sat sammen), kan en sådan nu fremstilles i løbet af 30 minutter på en DNA-syntesemaskine.

Før en syntetisk DNA-eftertiligning kan fremstilles, må de enkelte byggesten først syntetiseres ved traditionel organisk syntese. Efterfølgende kan disse byggesten hænges sammen på DNA-syntesemaskinen.

En typisk antisense-streng består af 10-20 monomerer. Man har vha. statistiske overvejelser fundet ud af, at der kun findes én fuldstændigt komplementær budbringer-RNA-streng i kroppen. Derved kan biosyntesen af det sygdomsfremkaldende protein hæmmes. Figuren viser det forenklede princip i syntese af en DNA-streng ud fra DNA-byggeklodser (monomerer). Syntesen foregår på en fast overflade (af f.eks. glas). Sammenkobling af to monomerer er vist, men processen kan gentages, så man opnår en DNA-streng af den ønskede længde. Derefter kan den »klippes« af den faste overflade vha. en »kemisk saks«.

Der henvises til den ved afslutningen af artiklen angivne litteratur for yderligere kemiske detaljer.

RNA. Bindingen er samtidig meget specifik. Derfor er anvendeligheden af LNA blevet undersøgt i forskellige terapeutiske og bioteknologiske sammenhænge.

LNA som antisense-lægemiddel

I samarbejde med professor Claes Wahlestedts forskergruppe ved Karolinska Institutet i Stockholm og det danske biotekfirma Exiqon A/S har vi med et modelstudie vist, at LNA effektivt og specifikt kan nedregulere et på forhånd udvalgt gen i levende rotter. LNA virker derfor lovende med henblik på antisense-teknologien. På baggrund af forsøgene på Karolinska Institutet antages det, at LNA kan trænge ind i cellerne og modstå nedbrydning med enzymer.

Nedreguleringen af genet betød en midlertidigt ændret smerterespons hos rotterne. Det skyldtes, at LNA-molekylets base-rækkefølge var designet til at slukke for biosyntesen af et protein (en receptor), der indgår i rottens naturlige smertestillende respons.

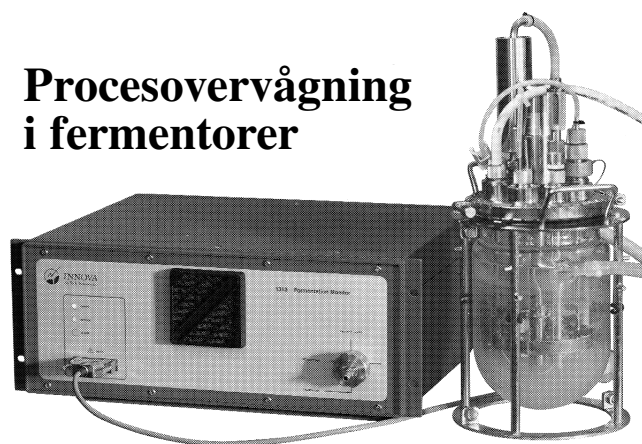
En af fordelene ved antisense-teknologien i forhold til genterapi er, at der ikke ændres i arveanlæg; således blev den normale smerterespons hos rotterne genetableret, da rotterne ikke længere fik tilført LNA.

Hurtige diagnoser ved hjælp af DNA

Et andet interessant aspekt ved LNA er, at det kan bruges i forbindelse med DNA-baseret diagnostik til f.eks. analyse af en gen-mutation i en persons genom eller analyse af en bakterieinfektion. Med DNA-baseret diagnostik håber man i fremtiden langt hurtigere at kunne give patienten svar på, om han eller hun har en bestemt bakterieinfektion.

Hvis en patient har en bakterieinfektion, vil der i blodprøven være genfragmenter stammende fra bakterien. Vha. PCR-reaktionen, der er en polymerase-katalyseret teknik til kopiering af DNA-

Procesovervågning i fermentorer

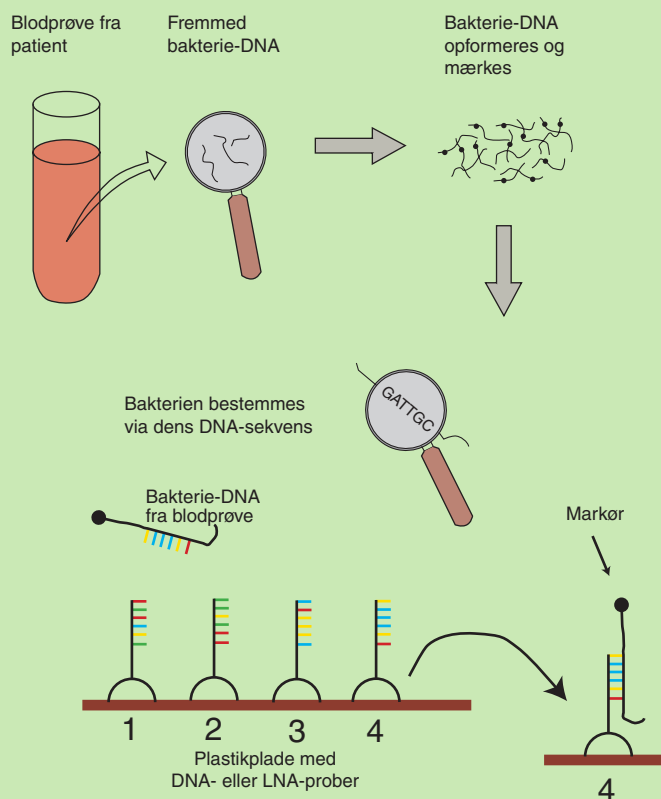


Driftssikker fermentor gasanalyse med den nye dedikerede Fermentation Monitor 1313 fra Innova AirTech Instruments.

- Online måling af O₂, CO₂ og etanol
- Stor nøjagtighed med integreret foto/magneto-akustisk måleprincip
- Lille vedligeholdelse - Lave driftsomkostninger
- Kan bruges i alle skalaer fra laboratoriet til produktionen
- Indbygget styring af 36 kanalers multiplexer



Energivej 30
DK-2750 Ballerup
Tlf.: 44 20 01 00
Fax: 44 20 01 01
www.innova.dk
e-mail: innova@innova.dk



Figur 4.

Principper i DNA-baseret diagnostik

En blodprøve undersøges for fremmed bakterie-DNA. Bakterie-DNA'et opformeres vha. PCR-reaktionen, og der indsættes samtidig en markør (evt. et fluorescerende materiale) i DNA'et. Derefter bestemmes bakterien på baserækkefølgen. Sidstnævnte proces ses mere detaljeret nederst.

Patientprøven med det mærkede bakterie-DNA tilføres en plade, hvorpå der på bestemte områder er påsat en række DNA-prober (mange kopier af hver), der hver er karakteristisk for en bestemt bakterie. Bakterie-DNA'et fra patientprøven binder sig til sit komplementære DNA på analysepladen. En af anvendelserne af LNA er til sådanne prober.

fragmenter, kan man opformere disse genfragmenter og f.eks. mærke dem med et fluorescerende materiale.

Herefter kan bakteriens »identitet« afsløres ved at tilsætte det mærkede DNA til en analyse-plade, hvorpå der på bestemte områder af pladen er fastgjort en række DNA-strenger (prober), som hver især er karakteristiske for en bestemt bakterie. Det mærkede DNA fra patientprøven binder sig til (danner duplex med) sit komplementære DNA på analysepladen. Derefter skal man blot aflæse, hvilken DNA-streng på pladen det mærkede DNA har bundet sig til (figur 4).

Foreløbige forskningsresultater tyder på, at LNA-prober pga. LNA's gode bindingsegenskaber med fordel kan anvendes i stedet for DNA-prober.

LNA kan bruges på DNA-chips

Det er målet at kunne foretage diagnosen på DNA-chips, hvor f.eks. 100 forskellige LNA-prober er påsat et 1 cm² stort område af en lille plastplade. Det 1 cm² store område er opdelt i 10×10 mindre områder. Hvert probe-område indeholder mange ens kopier af de 100 LNA-prober. Proberne kan være sammensat, så de er komplementære til et genfragment karakteristisk for én bestemt bakterie (eller f.eks. komplementære til et genfragment karakteristisk for en given sygdomsrelateret mutation).

Når patientprøven tilsættes DNA-chip'en vil et opkoncentreret genfragment binde sig til (dvs. danne duplex med) dets komplementære LNA-probe. Dermed bliver den bakterie, patienten er inficeret med, afsløret ved, at det pågældende sted på DNA-chippen lyser op pga. fluorescensmarkøren.

Det videre arbejde med LNA

For antisense-teknologien og den DNA-baserede diagnostik er det afgørende, at de syntetiske forbindelser, der bruges, har en meget effektiv og specifik hybridiseringssevne – dvs. evne

til at danne duplex med deres komplementære sekvens. Derfor synes LNA-molekylet yderst velegnet til begge disse anvendelser.

På universitetet fortsætter den videnskabelige forskning omkring LNA. Der syntetiseres kemiske analoger til LNA, og disses egenskaber undersøges. I tæt samarbejde med lektor Jens Peter Jacobsens forskergruppe ved Syddansk Universitet undersøges vha. avancerede NMR-spektroskopiske teknikker strukturen af duplexer imellem LNA og f.eks. komplementært RNA.

To danske biotekfirmaer arbejder med LNA med henblik på en kommerciel udnyttelse - Exiqon A/S, som fokuserer på udnyttelsen af LNA til diagnostiske formål, og Cureon A/S der koncentrerer sig om de terapeutiske formål.

Artiklen er med små ændringer genoptrykt fra *Aktuel Naturvidenskab*, 2000, 6, 8-11.

Litteratur

- Otto Dahl, »Kemisk DNA-syntese«, *Dansk Kemi* 1987, 6/7, 188-195.
- Jesper Wengel og Claus Scheuer-Larsen, »Selektivitet, kulhydrater og organisk kemi«, *Dansk Kemi* 1997, 8, 22-25.
- Jesper Wengel, »Synthesis of 3'-C- and 4'-C-branched oligodeoxynucleotides and the development of locked nucleic acid (LNA)«, *Accounts of Chemical Research*, 1999, 32, 301-310.