

# Ny teknologi til detektion af sekvensvariation

**Op gennem halvfemserne blev der på danske universiteter gjort en række opdagelser inden for nucleinsyre kemi samt fotoaktiverbar kemi med anthraquinoner. Disse opdagelser har siden vist sig, at have stor indflydelse på de teknologier, der vil blive anvendt til udforskning af menneskets arvmasse. Her beskrives disse teknologier**

*Af Lars Kongsbak, vicedirektør, Exiqon, kongsbak@exiqon.com*

Udvikling af medicin vil i fremtiden tage udgangspunkt i den viden, der i disse år genereres på basis af den nu kendte sekvens af det humane genom. Dvs. at en del medicin vil tage højde for, at vi mennesker har en forskellig arvmasse og derfor responderer forskelligt på et givent medicinsk præparat. Vi vil formentlig snart se, at diagnosticering og medicinering kræver en genetisk test af den enkelte patient, der vil danne grundlag for valg af type og dosering af nye såvel som gamle medicinske præparater. Det vil forhåbentlig give en mere præcis medicinering med færre bivirkninger og dermed bedre livskvalitet.

Sekvensvariations-analyser vil kunne danne grundlag for såkaldt »predictive medicin«. Predictive medicin er diagnosticering af genetisk relaterede sygdomme, inden de på anden måde kan måles i kroppen. Det kunne være sygdomme som f.eks. forhøjet blodtryk og diabetes. Sådanne analyser vil kunne bruges til at sætte ind med forebyggende behandling.

## SNPs

Pga. nye DNA-sekvenseringsteknologier har det været muligt at bestemme den totale sekvens af menneskets arvmasse - også kaldet det humane genom. Det har vist sig, at menneskets arvmasse består af mere end 3 mia. DNA-basepar (nucleinsyrepar), som koder for omkring 30.000 gener. Sammenligninger af kromosomsekvensen fra forskellige personer har vist, at der er en meget stor sekvensdiversitet. Langt den hyppigste form for sekvensdiversitet skyldes enkeltbasemutationer eller polymorfier også kaldet SNPs (udtales *snips* som står for Single Nucleotide Polymorphisms). SNPs findes med varierende hyppighed fordelt over hele det humane genom. Den gennemsnitlige frekvens er ca. 1 SNP pr. 1000 basepar, hvilket giver ca. 3 mio. SNPs pr. genom. Det komplicerer naturligvis undersøgelser af det humane genom yderligere. Sådanne studier hører til i kategorien genomics.

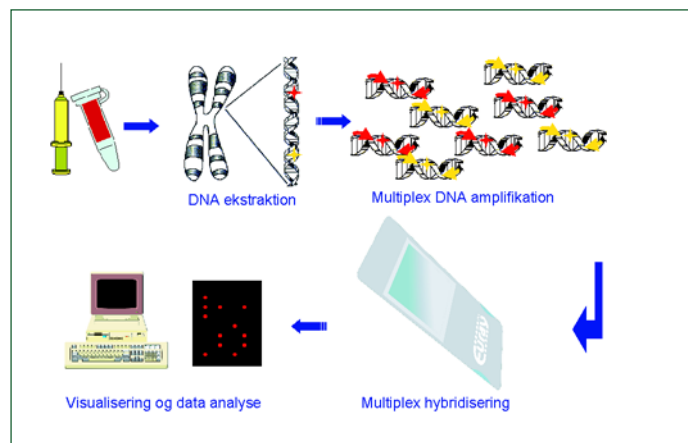
Opdagelsen af den store sekvensdiversitet har medført studier af samspillet mellem sekvensdiversitet og forskellige medicinske præparaters virkning. Dette kaldes pharmacogenomics.

Pga. det humane genoms kompleksitet stilles der meget store krav til de teknologier, der skal benyttes for at kunne studere og diagnosticere sygdomme baseret på genom-undersøgelser. Exiqon udvikler teknologier, der effektivt og sikkert kan detektere sekvensvariation. Da antallet af mutationer og polymorfier i sådanne undersøgelser ofte er højt, skal der

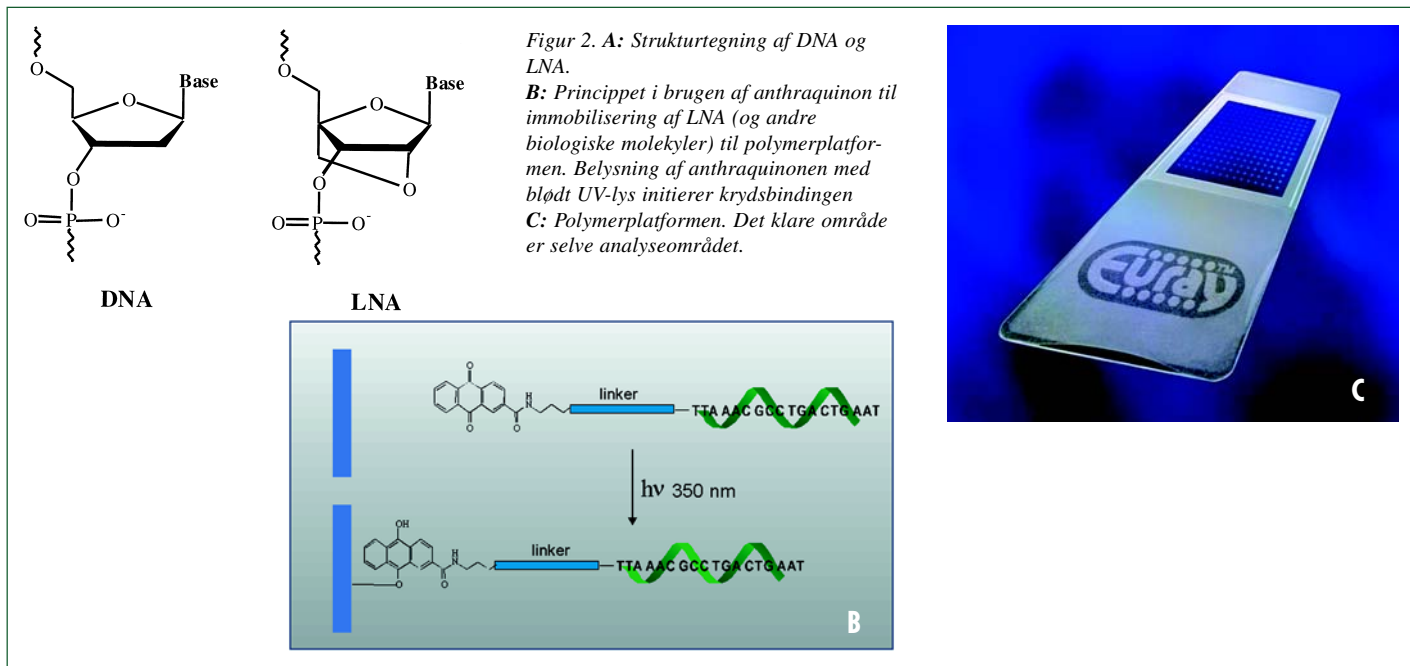
benyttes teknologier, der tillader en ekstrem grad af parallel-analyse. Det gøres bedst ved at bruge mikroarrays, som er små platforme (typisk 2,5x7,5 cm), hvor der kan påsættes et stort antal prøver. Med den udviklede teknologi kan der påsættes ca. 12.200 prøver på 4,8 cm<sup>2</sup>, hvilket giver mulighed for, at lige så mange parametre kan følges simultant. På den måde kan selv meget komplekse sammenhænge i det humane genom undersøges.

## Teknologierne

En typisk arbejdsgang i en SNP-undersøgelse er skitseret i figur 1. For at få nok DNA til undersøgelsen skal de områder, der ønskes undersøgt amplificeres (mangedobles) efter ekstraktion af det kromosomale DNA. Det gøres vha. PCR (Polymerase Chain Reaction - en metode til opformering af selv uhyre små mængder DNA), hvilket stiller store krav til specificiteten af amplificeringen af de ønskede DNA-områder. Næste step består i at hybridisere det amplificerede DNA til mikroarrayet, hvilket er selve sekvensvariations-målingen. Hybridisering betyder, at komplementære DNA-strenger (dvs. med »ens sekvens«) finder hinanden, hvilket selvfølgelig stiller meget store krav til specificiteten og affiniteten af denne del af processen. Sidste trin består i analyse af det hybridiserede mikroarray og samkøring af de opnåede polymorfibestem-



Figur 1. Typisk arbejdsgang for detektion af genetisk variation (polymorfisme). Multiplex amplifikation og multiplex hybridisering betyder, at mange prøver håndteres i samme arbejdsgang. DNA-amplifikation er enzymatisk »opformering« af det DNA, der skal undersøges.



melser med andre biologiske data, f.eks. fra kliniske undersøgelser.

For at kunne udføre denne krævende opgave som skitseret i figur 1 benyttes følgende nøgleteknologier:

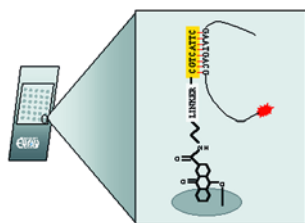
- LNA (Locked Nucleic Acid) til DNA-amplifikation og detektion.
- Anthraquinonkemi til immobilisering af DNA/LNA på mikroarray-plattformen.
- Polymerteknologi til mikroarray-plattformen.

De tre nøgleteknologier er afbildet i figur 2. LNA er et bicyklisk DNA-derivat med uovertrufne egenskaber mht. hybridiseringsspecificitet og -affinitet. Både i PCR-amplifikationen af det detekterede DNA og i selve mikroarray-hybridiseringen benyttes det, at DNA er et dobbeltstrengt molekyle med komplementære strenge. Benyttes LNA i stedet for DNA opnås øget specificitet og nøjagtighed.

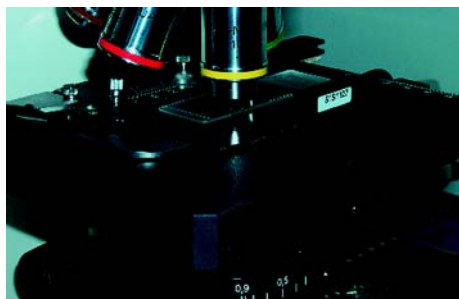
Opbygningen af mikroarrayet er kompliceret. Med udgangspunkt i de ovennævnte nøgleteknologier er der taget en

række helt nye indgangsvinkler i brug. Plattformen er sprøjtestøbt i plast (figur 2), hvilket vha. anthraquinon-kemien giver mulighed for effektivt at immobilisere de biologiske detektormolekyler kovalent til polymeren. De immobiliserede detektormolekyler bruges til at detektere genetisk polymorfisme og kaldes »capture probes« (»indfangnings«-enhed). De er opbygget som skitseret i figur 3. Da proben er enkeltstrengt, kan den hybridisere til en komplementær DNA-streng fra den DNA, som ønskes undersøgt. Dette trin i analysen er det mest kritiske, da manglende specificitet kan medføre fejldiagnosticering.

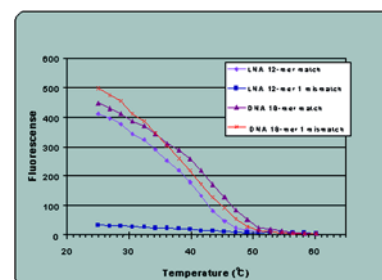
I figur 4 er vist et eksempel på den forøgede specificitet, der kan opnås ved at benytte LNA i capture proben i stedet for DNA. Grafen viser afsmeltningen af den komplementære DNA-streng (patientens DNA). Vi ønsker at måle en SNP (en polymorfi), hvor der kun er et nucleotid til forskel mellem de to polymorfier. Med de to DNA-baserede capture prober kan der ikke detekteres nogen signifikant forskel i evnen til at se



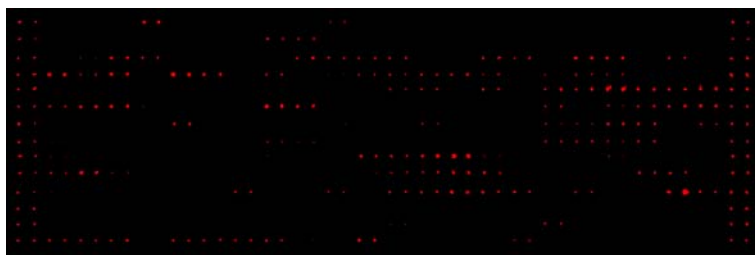
**Figur 3.** Skitse over opbygningen af et mikroarray. Mikroarrayet består af et meget stort antal capture prober. Hver capture probe er immobiliseret til polymerplatformen vha. den påsatte anthraquinon. Selve capture probe-delen er separeret fra anthraquinonen via en spacer, som giver bevægelsesfrihed til capture proben, hvilket sikrer en effektiv hybridisering. Capture proben er enkeltstrengt, hvilket giver mulighed for at hybridisere LNA-strengen til en komplementær DNA-streng (patientens DNA), som her er mærket med et rødt fluorescerende molekyle. Capture proben syntetiseres på en syntesemaskine og kan bestå af et mix af LNA- og DNA-nucleotider. De påsættes polymerplatformen vha. en robot, der i et foruddefineret mønster »drypper« 300 pl ned på polymerplatformen. Herved opnås meget små spots med en diameter på mindre end 50 µm.



**Figur 4.** Til venstre er vist en mikroskopopsætning til smelttemåling af dobbeltstrengt DNA. Mikroarray-plattformen er placeret på et varmelægeme, som langsomt opvarmes. Under opvarmningen vil det DNA, der er hybridiseret til capture proberne smelte af, hvilket ses som et fald i fluorescensen (grafen til højre). Evnen til at hybridisere og afsmelte patient-DNA er undersøgt for 4 capture prober. To capture prober er DNA-baserede og to er LNA-baserede (faktisk er det et mix af LNA og DNA). Fluorescensmærket patient-DNA kodende kun for den ene polymorfisme blev tilsat hybridiseringen. DNA- og LNA-baserede capture prober havde en længde på henholdsvis 18 og 12 nucleotider.



Figur 5. Komplekst SNP-mikroarray med 672 capture prober. Et mikroarray som dette indeholder positive og negative kontroller og to rækker målespots i hver ende af mikroarrayet. De ydre dimensioner er ca. 5x18 mm.



forskel på et enkelt nucleotid. Det ses ved at de to smeltekurver forløber næsten ens. Ved at bruge en LNA-baseret capture probe fås en signifikant diskriminering. Det ses ved, at der stort set kun hybridiseres patient-DNA til den capture probe, der er designet til at monitorere den polymorfisme, der skal detekteres.

Med udgangspunkt i den fine diskrimination mellem to enkelt nucleotidpolymorfismer er der udviklet komplekse SNP-mikroarrays. Figur 5 viser hybridiseringen af et komplekst SNP-mikroarray med 672 capture prober. Sådanne mikroarrays vil i nær fremtid blive brugt i prækliniske og kliniske studier ved udvikling af nye medicinske præparater.

Til slut skal det nævnes, at LNA-molekylet har en række andre potentielle applikationer inden for den medicinske verden såsom mRNA-antisense drug (molekyler der specifikt hindrer et givet proteins syntese), target validering (verificering

af nye medicinske præparaters påvirkning af menneskets celler), nucleosid-drugs (til brug f.eks. i cancerbehandling) osv., men det er en helt anden historie.

LNA blev opdaget på Københavns Universitet af professor Jesper Wengel og adjunkt Poul Nielsen, se artikel side 15.

Anthraquinon-kemien blev opdaget på Københavns Universitet af Chief Scientific Officer og medstifter af Exiqon Mogens Havsteen Jacobsen og Director of Chemistry, Cureon, Troels Koch, der også er medstifter af Exiqon.

Arbejdet præsenteret i denne artikel blev udført af Yoanna Choleva, Peter Mouritzen, Mikkel Nørholm, Poul Erik Høiby, Susanne Pedersen, Alex Toftgard Nielsen, Mette Randahl Larsen, Morten Bruus og Annemette Borch.



Q-ToF LC-MS-MS  
Quattro LC-MS-MS  
LC-ToF  
M@Idi

**Micromass Danmark . Baldersbuen 46 . 2640 Hedehusene**  
**Tel. 46 57 41 01 . [www.micromass.dk](http://www.micromass.dk)**