

DNS-chip

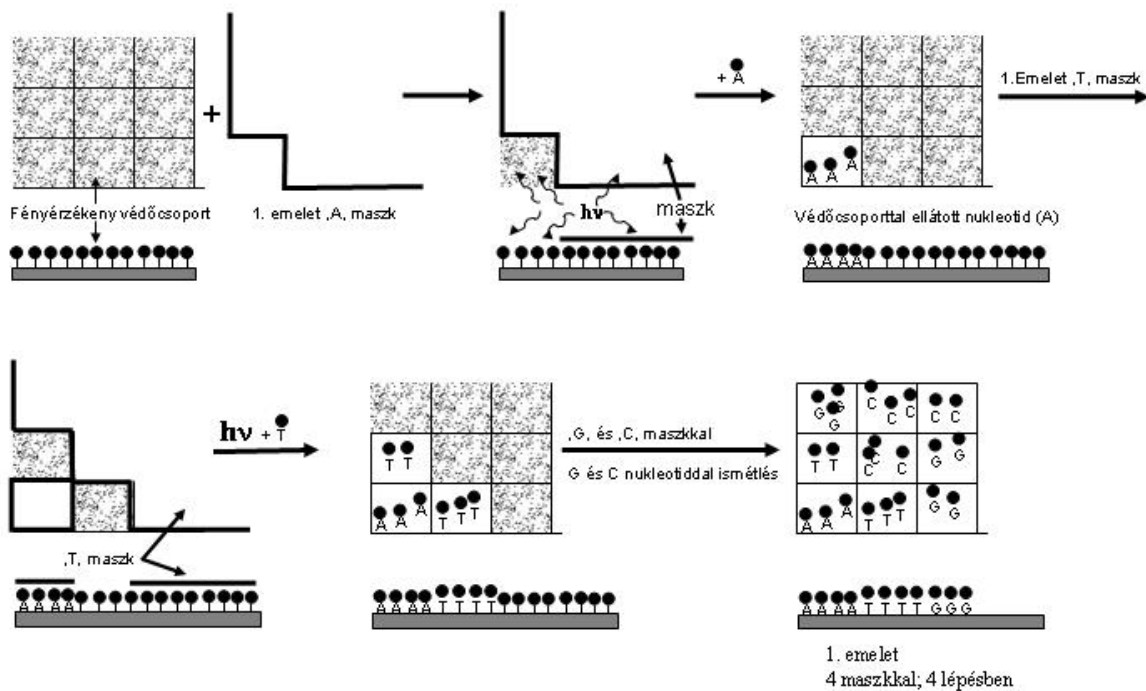
A DNS-chipek (génchipek) néhány éve kifejlesztett eszközök, orvosi jelentőségük hatalmas, felhasználásuk óriási karrier előtt áll. Az eljárás a már jól bevált hibridizációs technikán alapszik. Az újdonságot az jelenti, hogy egyszerre több, egymástól különböző (akár százezer!) próbaként használt oligonukleotidot hibridizáltathatunk a mintával. A vizsgálat időtartama mindössze néhány perc! Mivel a próba-oligonukleotidokat mi tervezzük meg, lehetőségünk van elméletileg minden ismert és ismeretlen mutációt kimutatni a segítségével.. Egyesek már a diagnosztika forradalmáról beszélnek. A DNS-chip kifejlesztésében, alkalmazásában, elterjesztésében nagy szerepe van a magyar származású S. Fodornak.

A DNS-chipek létrejöttét a számítástechnikának köszönhetjük több szempontból is. A módszer lelkét jelentő chip nem csak a külső megjelenése miatt kapta a nevét a számítógéppalkatrésztől, hanem a gyártástechnológia miatt is. Az oligonukleotidok tervezése, nyilvántartása, a kapott eredmények kiértékelése (lsd. alább) komoly számítógépes kapacitást igényel.

A DNS-chipek viszonylag kicsi (0,8-1,5 cm széles négyzet) szilárd hordozóra (szilíciumlapka, speciális műanyag) felvitt próba oligonukleotidokból állnak. A hordozót kisebb négyzetekre bontják, gyakorlatilag ezeknek a kisebb négyzeteknek a száma határozza meg, hogy hány féle próbát vihetünk fel egy-egy chipre. Az „őskorban” –az 1990-es évek elején- a hordozót még 100x100 µm-es négyzetekre bontották, manapság 50x50-esekre vagy 30x30-asokra. Így a „nagyobbik” négyzetből egy 1x1 cm-es chipre 40000 jut. Elméletileg tehát 40000 különböző próbát vihetünk fel erre a chipre.

A DNS-chipek gyártása

A folyamat lényege az alábbi ábrán látható:

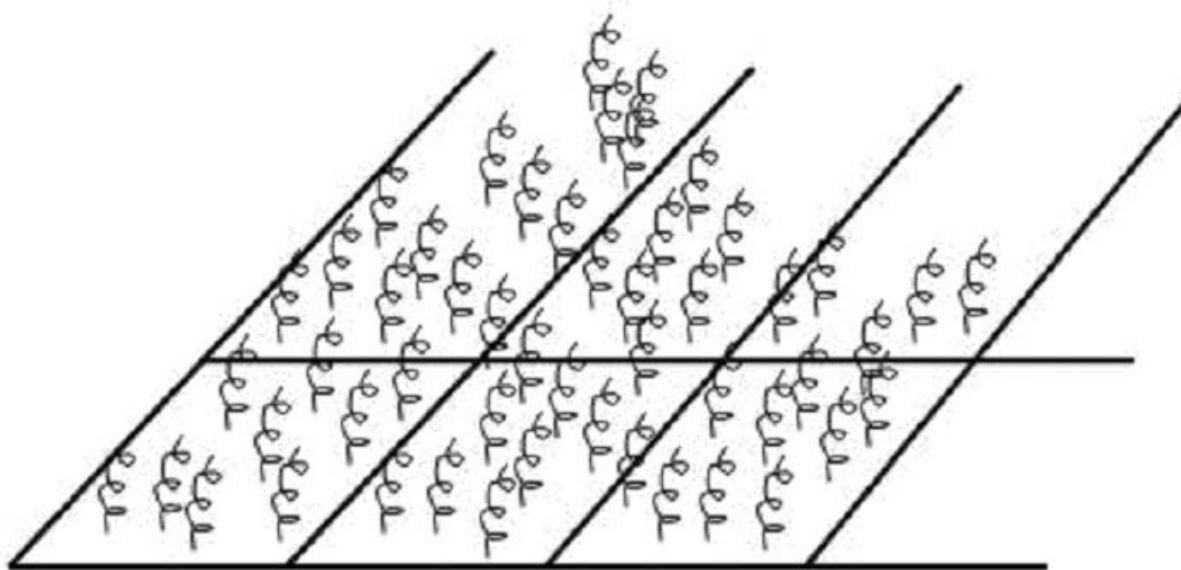


1. ábra

A technológia kifejlesztésekor a fotolitográfiát a szilárd fázisú kémiai szintézissel ötvözték, felhasználva a chipkészítés eszköztárát. A DNS-chipeken a próbákat (egyszálú DNS-t) az ún. *fotolitográfias technika* segítségével *in situ* szintetizálják. A hordozó (szilíciumlapka) felületén nukleotidokkal reagáló funkciós csoportok vannak. Ezeket a csoportokat, hogy idő előtt ne reagáljanak el, fényérzékeny védőcsoporttal látják el. Megvilágítás hatására ezek a védőcsoportok elbomlanak, a reakció végbemehet, tehát a nukleotidok 3' vége kapcsolódni fog a reagáló csoporttal. Az 5' vég szintén el van látva a védőcsoporttal, a reakció tehát a továbbiakban is csak megvilágítás hatására, ellenőrzött körülmények között mehet végbe.

A négyféle nukleotidot külön-külön viszik fel a lapkára. Az első nukleotidszint (emelet) tehát négy fázisban épül fel. Hogy ezt megvalósíthassák, a szintézishez szükség van ún. *maszkokra* is. A maszkok olyan chip nagyságú lapkák, amelyek perforálva vannak pl. 50x50 µm-es négyzetekkel az egyes nukleotidok helyének megfelelően. Emeletenként tehát négy maszkot használunk. A négy maszkon lévő perforációk teljesen lefedik a chipet.

A szintézis kezdetén az 1. emelet egyik maszkjával (pl. az A-nak megfelelőnek) letakarják a szilíciumlapkát, majd rövid ideig megvilágítják. A maszkot eltávolítják, majd A-nel kezelik a chipet. Ahol a lap perforálva volt, ott a védőcsoport eltávozik, az A kötődhet a laphoz. A felesleges A-t mosással eltávolítják. Ezután a C-nek, T-nek, G-nek megfelelő maszkokkal megismétlik az eljárást, és kész az első emelet. Mivel a nukleotidok 5' vége is tartalmazza a fényvédő csoportot, az emeletépítést tetszőlegesen lehet folytatni. Az eredmény valóságos oligonukleotid-erdő lesz. 20x20 µm-es négyzetben egyébként kb. 10⁶ szál van, így inkább erdő helyett ősrengetegről beszélhetünk.



2. ábra

A fentiek szerint n nukleotid hosszúságú oligonukleotidot $4n$ lépésben hozhatunk létre. Az oligonukleotidnak így maximum 4^n különböző variációja lehetséges. A gyakorlatban 18-30 nukleotidnyi hosszúságú oligonukleotidot használnak, de már 8 nukleotidból álló is használható. Rövidebbet nem érdemes használni, mert nem lesz elég specifikus; a hosszabbaknál pedig a keresztreakciók száma nő meg.

Maga a gyártási folyamat kb. 2-3 óra alatt megy végbe, és több százat is lehet párhuzamosan gyártani. Mivel a chipen elhelyezkedő szálak nukleotidsorrendjének megtervezése és a maszkok elkészítése időigényesebb és jóval drágább folyamat, a chipeket nagy tömegben

lehet gazdaságosan gyártani. Ez diagnosztikai szempontból is fontos, mert lehetővé válnak célzott szűrővizsgálatok is.

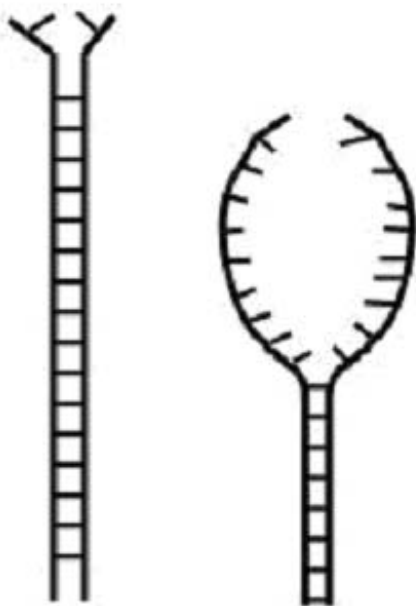
Néhány szó a térkép tervezéséről

A chipen elhelyezkedő oligonukleotidok nukleotidjainak sorrendjét, optimális számát alaposan meg kell tervezni. Ezek függnnek a céltól (mutációk keresése, kórokozó azonosítása stb.), a vizsgálni kívánt mintától és a kísérleti körülményektől is. A chip térképének tervezése és számontartása számítógépet igénylő feladat. Ennek érzékeltetésére: az általában használt 20 nukleotidból álló oligonukleotidokat 80 lépésben szintetizálhatjuk meg, így 10^{12} nagyságrendű különböző próbát állíthatunk elő elméletileg. Ennek milliomod része sem fér rá egy modern chipre, és a chip teljes kapacitására nincs is szükség általában!

Ha mutációkat akarunk vizsgálni, akkor a vad típus nukleotidsorrendje mellett a feltételezett mutációkat is be kell építenünk. Ez lehet szubsztitúció, deléció, inszerció vagy gyakorlatilag bármi, amit képesek vagyunk kitalálni.

Hogy a téves eredmények számát minimálisra csökkentsék, a vizsgálni kívánt minta + és - szálának megfelelő próbákat is terveznek kontrollként.

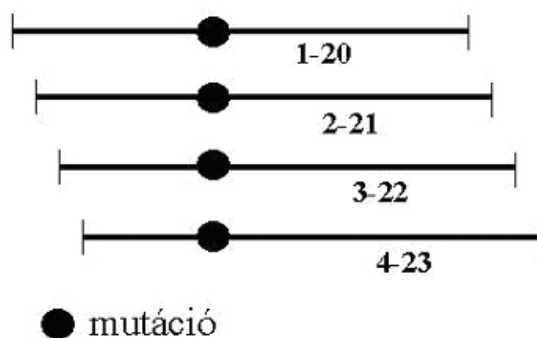
Hogy a nem specifikus hibridizációt elkerüljék, a mutációt a próba közepére tervezik általában. Pl. 20 nukleotidból álló próba 9-10. helyére. Ha a próba a mintától egy nukleotidban különbözik, és a különbség középen van, akkor a kettős szál kialakulása energetikailag kedvezőtlenebb mintha a különbség a szélén lenne, tehát kevésbé hibridizál.



3. ábra

Ha a vizsgálni kívánt DNS szakasz hosszú (akár több ezer nukleotid), akkor a mintának használt oligonukleotidokat nem a DNS darabolásával, hanem egyesével való „léptetésével” készítik el.

Nézzünk húsz egységből álló oligonukleotidot!



1-20	2-21	3-22	4-23

4.ábra

Az első mezőbe az 1-20, a másodikba 2-21, a harmadikba 3-22 stb. sorrendű oligonukleotid kerül. Így nagyobb biztonsággal dolgozhatunk, a chipen pedig hely van bőven.

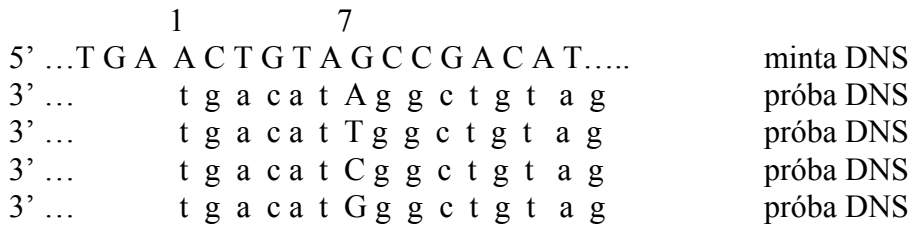
Ha beépítünk egy mutációt, akkor húsz oligonukleotidba kerül bele. Az analízis biztonsága így megnő.

A vizsgálat

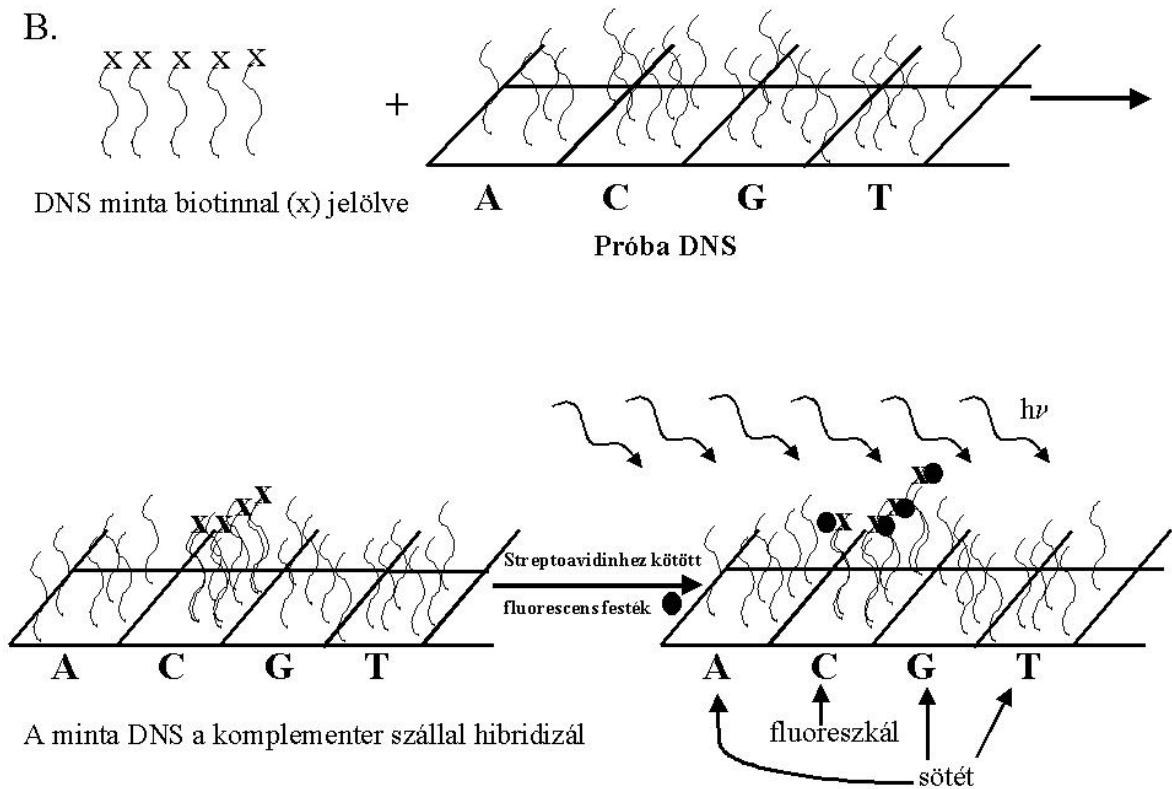
Ha a DNS-chip kész van, jöhet a vizsgálat!

A vizsgálatokat az adott DNS szakasz (minta) amplifikációjával kezdik. Ez DNS-ből történik PCR-rel vagy RT-PCR-rel (reverz transzkriptáz PCR) RNS-ből. A reakció során a DNS-t fluoreszkáló anyaggal (fluoreszcein, phycoerythrin) megjelölik. Ezután denaturálják a DNS szálát, majd a chipen elhelyezkedő próbákkal hibridizáltatják. Ha a minta és a próba - csak egy ponton is- nem komplementer, már nem, vagy csak minimálisan hibridizálnak. A felesleges DNS-t mosással eltávolítják, majd a pontok fluoreszkálását vizsgálják. Így sötét és fluoreszkáló pontokat kapunk (fluoreszcein-zöld, phycoerythrin-piros), aszerint, hogy a próba hibridizált-e a mintával vagy nem. A mintát biotinnal is megjelölhetik. Így ha hibridizál a próba a mintával, biotinnal jelölt négyzeteket kapunk. A felesleges minta eltávolítása után fluoreszkáló anyaghoz kötött streptoavidinnel kezelik a chipet. A streptoavidin a biotinhoz kötődik, így a biotinnal jelölt négyzetek fluoreszkálnak.

5. ábra A.



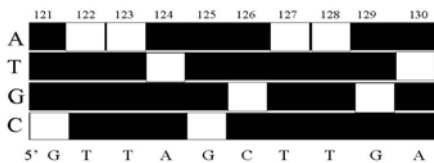
B.



5. ábra

A. Négy próba (kis betűkkel jelölve) a mintával (nagy betűkkel jelölve). A négy próba a 7. nukleotidban különbözik egymástól. A minta tehát fentről a harmadik próbával hibridizál.

B. A hibridizáció.



6. ábra DNS-chip részlete a leolvasott mintával

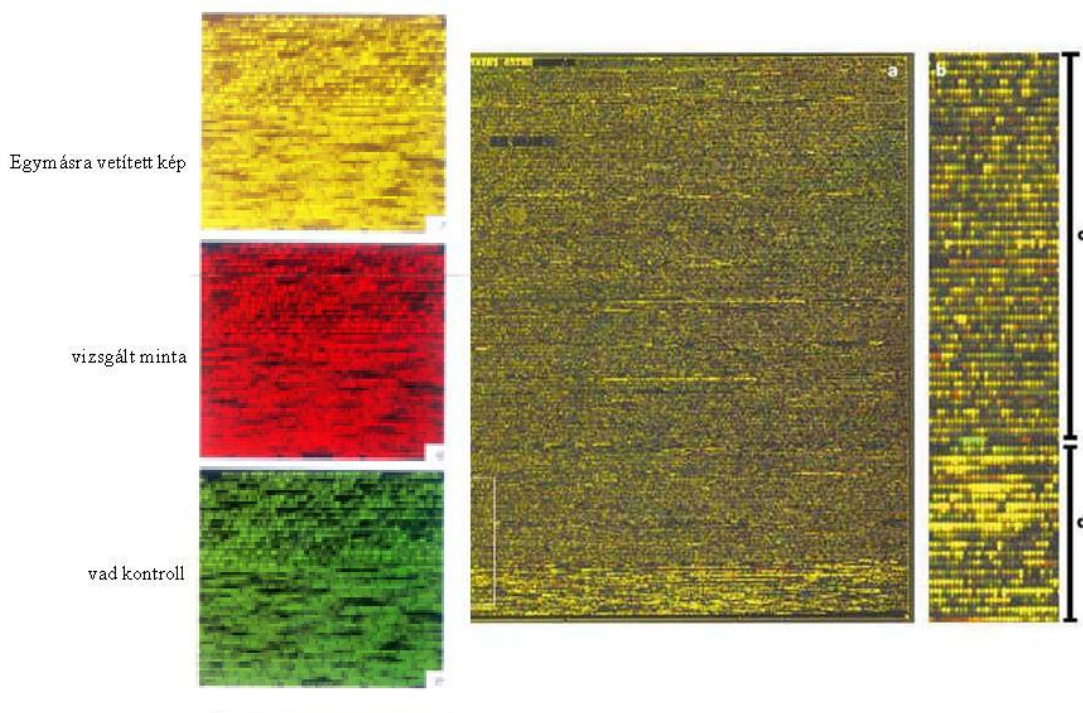
A számítógépben tárolt térkép alapján a minta nukleotidsorrendje megállapítható a jelekből.

Ha a szkennerek alkalmas a jel intenzitásának mérésére is, további információk is nyerhetők. Pl. homozigóta-heterozigóta vizsgálatnál a fenti vizsgálatot (sötét-világos pontok) megerősíthetjük. Ha a kapott jel fele akkora mint egy másik (homozigóta) akkor heterozigóta az allél. A jel erősségének vizsgálatával -megfelelő kontrollok használata mellett- fehérjék expressziójának a mértéke is tanulmányozható. Utóbbi esetben az RNS-ből készítenek cDNS-t és ezeket vizsgálják.

két-szín analízis

Gyakran előfordul, hogy a vizsgálat során arra a kérdésre keresünk választ, hogy az adott DNS minta tartalmaz-e mutációt vagy nem. Ilyen esetben nagyon hasznos a két-szín analízis.

Az ampifikációt két különböző marker jelenlétében végzik el a vad típusnál és a vizsgálni kívánt mintánál. Pl. a vad típust fluoreszcenciával, a vizsgált mintát phycoerythrinrel. Ezután mindkét mintát megvizsgálják egy-egy DNS chippel. A számítógép a kapott, és memóriában tárolt képeket egymásra vetíti. Ha a két pont színes, tehát a nukleotidsorrendjük azonos, akkor egy harmadik színnel jelöli a pontot, pl. sárgával. Ha csak az egyik pont színes, annak megtartja az eredeti színét. Jelen esetünkben tehát a piros és zöld pontok a két DNS minta eltéréseit mutatják. A chip térképe alapján ezek az eltérések könnyen azonosíthatók.

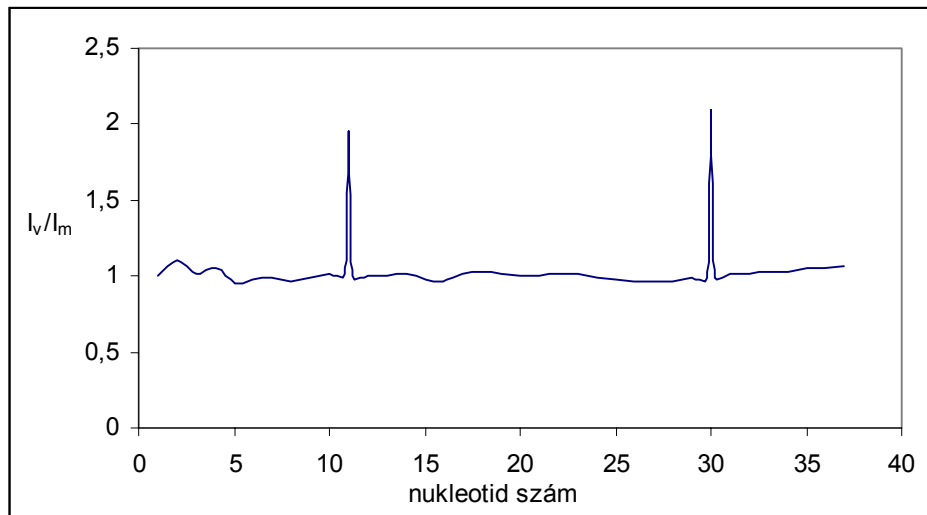


7. ábra Két-szín analízis

jelvesztő és jelnyerő technika

jelvesztő analízis

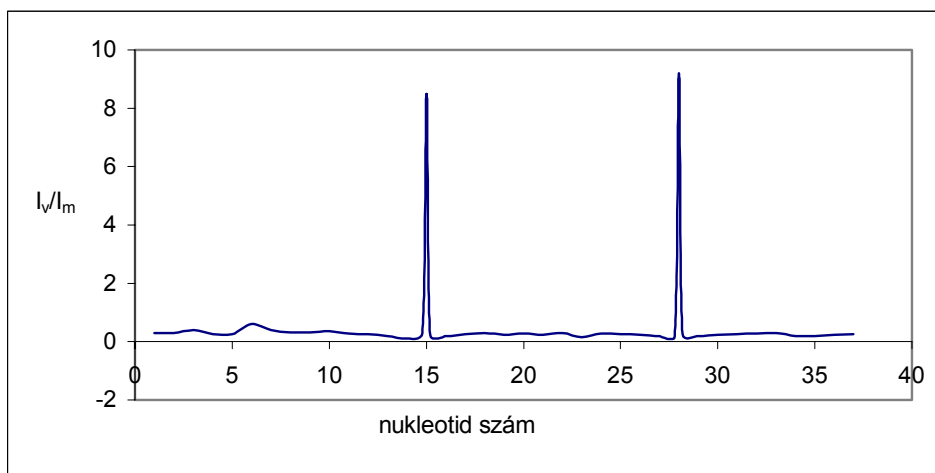
A jelvesztésnél azt használják ki, hogy a mutáns heterozigóta jel intenzitása (I_m) fele akkora mint a homozigóta vadé (I_v). Így a $I_v/I_m \cong 2$ (ideális esetben kettő). Alapesetben a hányados értéke 1 körül található.



8. ábra Jelvezető analízis

jelnyerő analízis

Ha a vad és mutáns gén különbözik, de mindkettő homozigóta, akkor a I_v/I_m hányados elvileg végtelen (az egyik jelen van jel a másikon nincs). Mivel csekély mértékben a nem tökéletesen komplementer szálak is hibridizálódhatnak, a gyakorlatban a hányados értéke 8 és 10 között található.



9. Jelnyerő analízis

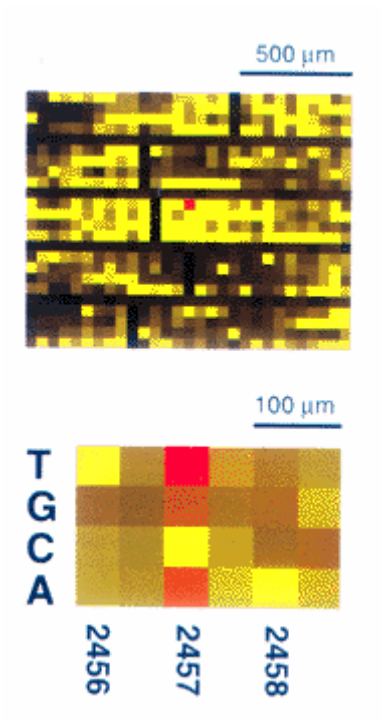
Egy konkrét eset: a BRCA1 gén vizsgálata

Öröklődő emlőrákban és petefészek tumorokban a BRCA1 és BRCA2 gének mutációinak már kimutatták a szerepét. Rokonvizsgálatok szerint a BRCA1 mutációk a mell- és ováriumtumoros beteg 50-60%-ában van jelen, míg a teljes populációban kb. 2 %-os az előfordulás. A heterozigóták predisponáltak a mellrákra, valamint a colon- és prosztaták kockázata is megnő. Egyes mutációk jelenlétében az érintettek kb. 90 %-ának fejlődött ki emlőrákja 75 éves korig.

A BRCA1 gén 22 exonból áll. 1996-ban S. Fodor és munkatársai a BRCA1 gén 11-es exonját vizsgálták meg. A vizsgálatot az exon amplifikációjával kezdték (PCR-rel).

A DNS-chipre felvitték vad típusú nukleotidsorrendet az összes lehetséges bázis szubsztitúcióval, inszercióval és 1-5 bázisból álló deléciónal. Az oligonukleotidok 20 bp-t tartalmaztak, a mutációk közepén helyezkedtek el. Általában jelvezetést vizsgáltak, de kétséges esetben jelnyerést is.

A 15 betegből 14-ben ki tudtak mutatni mutációt, míg a 20 egészséges kontrollban fals pozitív eredmény nem volt. A munka során 8 egyszerű polimorfizmust azonosítottak.



Mutáció azonosítás szenzitivitása a BRCA1 11-es exonjában

Mutáció	Minta	Jelnyerés		Jelvesztés		Mutáció azonosítás
		kódoló	nemkódoló	kódoló	nemkódoló	
1128insA	ST750	-	-	-	-	Nem
1294del40	624-F32	na	na	+	+	igen
1323delG	3295	-	+	+	-	igen
2294delG	ST755	-	-	+	+	igen
2314del5	RUL57	+	+	+	+	igen
2457C-T	RUL47	+	+	+	+	igen
2804delAA	MOC52	+	+	+	+	igen
3121delA	ENG9	+	+	-	+	igen
3867G-T	808-F161	+	+	+	+	igen

10. ábra A BRCA1 gén mutációi

Néhány eddigi alkalmazás

Az orvosi felhasználások közül elsősorban a diagnosztika és terápia nyomonkövetése kapott korszerű és remekül felhasználható módszert. A prenatális diagnosztikában, családtervezésben is jelentős szerepet kaphatnak a DNS-chipek a módszer elterjedésével. Az alkalmazások sokszínűségének megismeréséhez az Orvosi Hetilap cikket érdemes elolvasni (1. ref.). Itt csak néhány címszó került felsorolásra.

- fertőző mikroorganizmusok kimutatása → A hagyományos, tenyésztésen alapuló kimutatások néhány napos, egy hetes időtartama így néhány órára rövidülhet, nem is beszélve arról, hogy így specifikus vizsgálatok (antimikrobiális szerekre való rezisztencia) is elvégezhető.

- AIDS → Létezik egy T-sejtekre és makrofágokra részben specifikus receptor (CCR-5). Ez a receptor elősegíti a HIV vírus felvételét, míg a mutáció a vírus endocelluláris felvételét gátolja. Lehet, hogy ez a mutáció felelős egyes emberek rezisztenciájáért. Ezen kívül a HIV-1 reverz transzkriptázra és proteázra szintén kifejlesztettek egy DNS-chipet. Ez a két gén a genomon belül nagyon változékony, az eltérés két vírus között 47 % is lehet. A pontos térképezés a hatékonyabb gyógyszeres kezelést segítheti elő.

- p53 → a p53 gén eddig ismert 400 mutációját hordozó DNS chip már kereskedelmi forgalomban is kapható.

- a globin génchip a β -thalassemia különböző változatainak a kimutatására

- cisztikus fibrózis gén

stb.

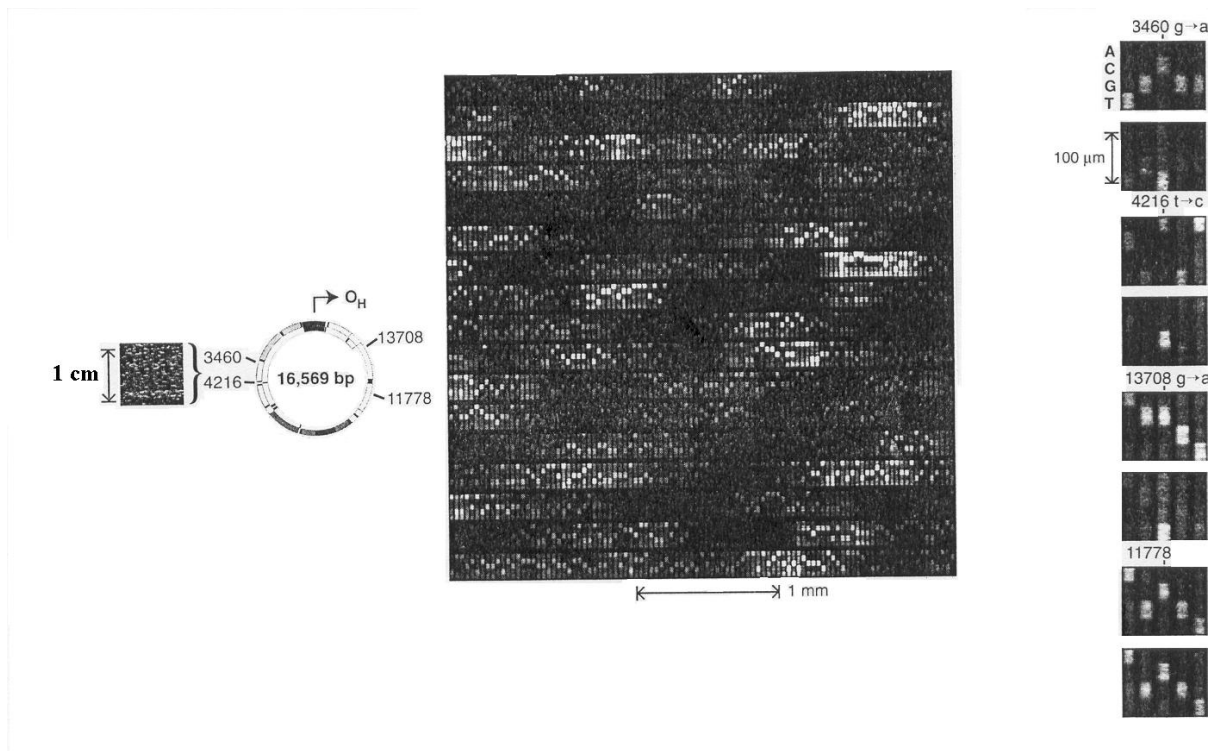
A mitokondriális DNS-chip

- mitokondriális genom (S. Fodor és mtsai.) chippel lehetővé vált, hogy mitokondriális, öröklődő betegségeket viszonylag egyszerűen kimutassunk, illetve tanulmányozzunk. A chip egyik nagy jelentőségét az adja, hogy a mtDNS mutációs rátája egy nagyságrenddel nagyobb, mint a kromoszómális DNS-é, így a káros mutációk is gyakrabban érintik a mitokondriális genomot.

A mai napig nagyszámú patológiás jelentőségű mtDNS mutációt azonosítottak, illetve valószínűsítettek. A mtDNS sajátosságai (elsősorban a heteroplazmia) miatt a mutációk előfordulása és a betegségek manifesztációja között az ok-okozati összefüggések nehezen bizonyíthatók. Először 1988-ban a Leber-féle neuropátiáról bizonyították be (persze nem DNS chippel) mitokondriális eredetét. Egyértelmű bizonyíték támasztja alá többek között a Leigh-szindróma, a Kearns-Sayre-szindróma, a rojtos-vörös-rostos mioklonusos epilepszia, a Pearson-szindróma összefüggését az mtDNS károsodásával.

Ezekon kívül megfigyelték a mtDNS nagyobb mutációs arányát (a kontrollhoz képest) az ismertebb betegségek közül diabetesben, egyes süketsegekben, egyes kardiomiopátiákban, Alzheimer-kórban, Parkinson-kórban.

Az egyes sejtekben a mitokondriumok száma elérheti az ezres nagyságrendet is. Mivel a mitokondriumok saját genetikai állománnyal rendelkeznek, az adott mutációk nem érintik az összes mitokondriumot. A mitokondrium osztódáskor persze továbbadja a mutációit. Így a sejtben, szervezetben különböző genetikai összetételű mitokondriumok létezhetnek egymás mellett. Ez a heteroplazmia jelensége. Ha osztódáskor véletlenül azonos származású, tehát azonos genetikai összetételű mitokondriumok kerülnek az egyik utódsejtbe (ha petesejtről van szó, akkor a kialakuló zigótába, illetve egyedbe) akkor homoplazmiáról beszélünk. Mivel heteroplazmiánál egy mutáció általában csak a mitokondriumok bizonyos hányadánál található meg, nehéz bizonyítani, hogy milyen mutáció káros, milyen betegséget okozhat.



11. ábra A humán mitokondriális genom és DNS chipje (A Leber-féle neuropátiát okozó mutációk jobb oldalon)

A mtDNS rendkívül „tömör”, szinte mindenhol gént kódol, de mégis van kb. 1000 bp-t tartalmazó szakasz, ahol nincsenek gének. A mutációs változásokat nem követik funkcionális zavarok, ezért a mutációk megmaradhatnak. Ezt a szakaszt „variábilis régióknak” is nevezik. Nemrokon vizsgálatok azt mutatják, hogy 70-500 nukleotidnyi különbség is lehet két ember között. Ennek a viszonylag kis régióknak a vizsgálatával az igazságügyi orvostan és a történeli antropológia jutott jól és nagy tömegben is használható módszerhez.

Nem tartozik a tárgyhoz, de érdekes, hogy fosszilis maradványokban a mtDNS darabjai - mivel nagyságrenddel több van belőle- nagyobb eséllyel maradhatnak fenn, mint a kromoszómális DNS töredékei. Így szerencsés esetben lehetővé válik a vizsgálatuk is. Sikerült már neandervölgyi ősember mtDNS vizsgálata is, ami a napjainkban ismét forrongó eredetvizsgálatokban jelent bizonyítékot.

A módszer néhány előnye és hátránya

előnyök

ismeretlen mutációk is kimutathatók

olcsó (nagy tömegben)

gyors

specifikus

multifaktoriális genetikai betegségek is kimutathatók

többször felhasználható

nagy génekre is érzékeny és specifikus

a számítógépes adatfeldolgozás miatt az internet előnyei is kihasználhatók (pl. nemzetközi adatbázis segítségével a ritka betegségek gyógyításában szerzett tapasztalatok összegezhető, segítség kérhető specialistáktól)

hátrányok

A terápiás lehetőségek nincsenek egyensúlyban a diagnosztikával. Tehát hiába mutatjuk ki, hogy valaki hordozza a mellrákra hajlamosító mutációkat, megelőzni a kialakulását még nem tudjuk. A kockázat persze csökkenthető. A veszélyeztetettek szűrésével az esetlegesen manifesztálódó betegségek felismerése, kezelése is korábban megkezdődhet. Az egyes mutációk hiánya viszont nem biztosíték arra, hogy az illetőnek nem alakul ki daganata.

Nincs szabványosítva a technika. Az igaz, hogy a technika nagy tömegben (száz-as-ezres nagyságrendben) olcsó, szűrővizsgálatra is alkalmas, de a chipgyártásra alkalmas berendezések, a chipok kiértékelésére alkalmas lézerleolvasók, szoftverek nagyon drágák. Ha külön-külön leolvasókat kell(ene) vásárolni az egyes chipokhoz, mert a gyártók nem egységes szabvány szerint dolgoznak, az a költségeket aránytalanul megemelné. Már a chipok (0,8; 1,0; 1,28; 1,5 cm) és a cellák (20, 30, 50, 100 μm) mérete sem teszi lehetővé a közös használatot, a szoftverek inkompatibilitásáról nem is beszélve. Ha a fejlesztések első hulláma lezajlik és letisztulnak a technikai megoldások, ez a probléma valószínűleg megszűnik, legalábbis csökken.

etikai problémák

- hisztériakeltés → Az USA-ban a BRCA1 gén vizsgálata során néhány százan kétoldali emlőeltávolítást követeltek, miután kiderült, hogy az emlőrák kockázatát növelő mutációt hordoznak.

- biztosítók → egyes biztosítók a biztosítási díjakat az általunk hordozott káros mutációk alapján is emelnék.

- munkahely → egyes veszélyes munkahelyeken (pl. atomreaktorban, szerves oldószerrel dolgozó gyárak, röntgenszobák) a genetikailag stabilabb (mármint kevesebb káros mutációt hordozó) embereket alkalmaznának, de ez egyben a veszélyeztetettebb emberek biztonságát is növelné.

- sportolók → az élsportolókat kedvező genetikai adottságok alapján válogatnák ki, így pl. nem kéne egy csomó pénzt „kiszórni” a tömegsporton keresztül történő tehetségkiválasztással.

- génterápia, tökéletes utódok → magáért beszél
stb. , stb.

Fehérje-chipek

A DNS-chipek elődjei technikailag az aminosavakból előállított fehérje-chipek voltak (S. Fodor). A chipen szintetizált peptideket antitestekkel reagáltatták. Az antitesteket megjelölték, így lehetővé téve azonosításukat.

Érdekességként érdemes megjegyezni, hogy ezek a számítógépes chipként egyáltalán nem alkalmazható chipek az újságírók jóvoltából a köztudatba úgy kerültek be (a chip szó miatt), mint a számítógépeket új elméleti alapon működtető fehérje-chipek.

Irodalom

1. Az orvosi genetikai diagnosztika új eszköze, a DNS-chip
Falus, Váradi, Raskó
Orv. Het., 1998. ápr. 19. 139(16) 957-60
2. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis
Fodor, Read, Pissung, Stryer, Lu, Solas
Science, 1991. Febr. 15. 251(4995) 767-73
3. Multiplexed biochemical assays with biological chips
Fodor, Rava, Huang, Pease, Holmes, Adams
Nature, 1993. aug. 5. 364 555-556
4. Accessing genetic information with high-density DNA arrays
Chee, Yang, Hubbel, Berno, Huang, Stern, Winkler, Lockad, Morris, Fodor
Science, 1996. oct. 25. 274 610-13
5. Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis
Hacia, Brody, Chee, Fodor, Collins
Nat. Genet., 1996. dec. 14(4) 441-47
6. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis
Pease, Solas, Sullivan, Cronin, Holmes, Fodor
PNAS, 1994. May. 24. 91(11) 5022-26
7. The human aquaporin-CHIP gene. Structure, organization, and chromosomal localization
Moon, Preston, Griffin, Jals, Agre
J.B.C. , 1993. Jul. 25. 268(21) 15772-78
8. Truce likely in battle over 'DNA-chip' patent rights
Butler
Nature, 1997. May. 15. 387(6630) 221

Érdeklődőknek ajánlható még Váradi Andrásnak a doktori képzés keretén belül megrendezett kurzusa.