

# Screening for genvarianter

I dag er det blevet mere og mere almindeligt at lede efter årsager og forklaringer på mange sygdommes natur ved at undersøge menneskets genom. Vi kender allerede til mange genetisk arvelige sygdomme, som det i dag er relativt enkelt at teste en patient for.

Genetisk nedarvede sygdomme har den fordel rent diagnostisk, at allelforholdet oftest står i forholdet 1:1. Dvs. at der på det ene af de 2 alleler, der udgør ét kromosom, er en variation, også kaldet mutation/polymorfi, der afslører den genetiske sygdom. Men hvad gør man, når variationen ikke er genetisk nedarvet, men opstået spontant? F.eks. som sporadisk opstået cancer?

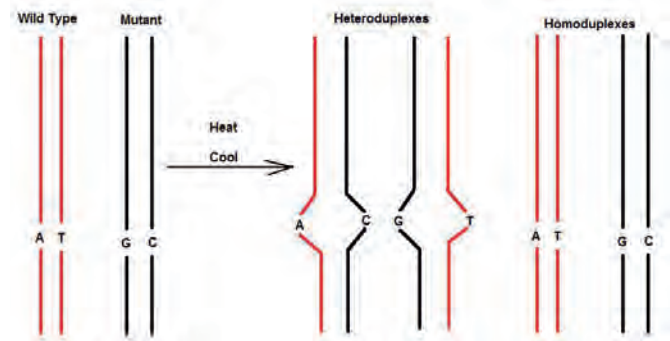
Udfordringen i at screene for og diagnosticere sporadisk opståede varianter ligger i at få udviklet analyse- og målemetoder, der er sensitive nok til at kunne detektere variationerne.

## BAGGRUND

Der er naturligvis en lægelig interesse i at kunne diagnosticere en variation, der kan udvikle sig til en alvorlig cancer så tidligt i forløbet som overhovedet muligt. Ligeledes kan det mulige sygdomsforløb ikke blot reduceres for patienten, men også opstartes så tidligt, at der ikke behøves at anvendes lige så bivirkningsfyldt behandling.

I forbindelse med udførelsen af mit bachelorprojekt besluttede jeg mig for at undersøge, om der var noget, der ville kunne imødekomme behovet for en mere sensitiv detektion og derved diagnostik. Det hovedspørgsmål, jeg stillede mig selv, var: Hvordan fanger man de få celler med forandringer i DNA'et, og hvor langt kan man gå ned i fortynding, før metoderne sensitivitet bliver en begrænsning? Jeg satte mig ind i de metoder, der er tilgængelige, og som anvendes på Sektion for Molekylærgenetisk Diagnostik på Rigshospitalet, hvor jeg udførte mit forsøg og skrev mit projekt.

I Sektion for Molekylærgenetisk Diagnostik screener man for variationer i DNA fra patienter ved hjælp af sanger-sekventering. Det er også muligt at screene ved hjælp af smeltekurveanalyser. Sanger-sekventering kan bestemme den specifikke



**BILLEDE 1:** Her ses, hvordan en heteroduplex dannes ved PCR under afkøling af et opvarmet produkt.

basesammensætning af den sekvens, der undersøges, hvilket er nødvendigt for at kunne verificere et prøvesvar. Det kan man ikke ved smeltekurver alene. Til gengæld er smeltekurveanalysen mere sensitiv i forhold til at kunne detektere varianterne. Man kan gøre det i dag, at man anvender smeltekurven til at undersøge, om der er en variation, før man begynder at sekventere.

Men forud for begge metoder må prøvematerialet opformeres. Det gør man ved hjælp af PCR.

Både smeltekurveanalysen og sekventeringen er metoder, der ikke i sig selv giver megen mulighed for at ændre på sensitiviteten. Til gengæld kan man undersøge, om det er muligt at lave en PCR- protokol, der i en eller anden grad selektivt kan opformere på den andel af DNA'et, der indeholder variationerne. For at få en forståelse for, hvad det er, der sker, vil jeg i det følgende beskrive analyseprincippet bag dannelsen af de såkaldte heteroduplex, som dannes under PCR-reaktionen samt smeltekurveanalyserne.

## HETERODUPLEX

Først skal vi opformere DNA'et fra patienten.

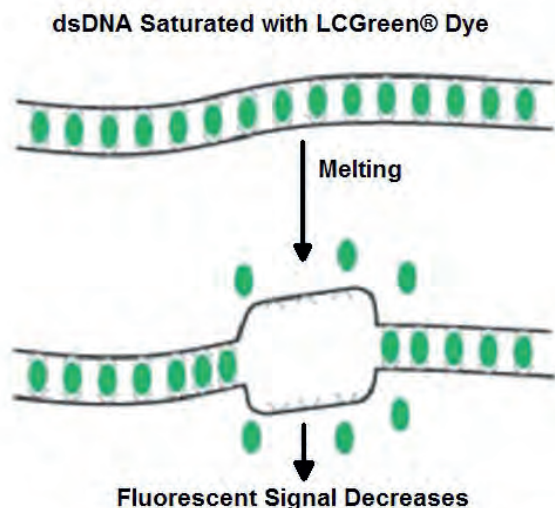
I prøvematerialet er der 2 alleler fra de normale gener, WT (homozygot normal), og 2 alleler fra de varierende, mut (homozygot mutation), (vi forudsætter, at der er en variation i prøvematerialet). Under opformering ved PCR sker der det, at ét afskrevet allel fra WT kan sætte sig sammen med ét allel fra mut. Herved opstår det såkaldte heteroduplex, som altså er en dobbeltstrengt DNA- sekvens med en enkelt baseafvigelse på det ene allel. Se billede 1.

Det viser sig, at heteroduplex har en lavere denaturerings-



**Af bioanalytiker //**  
**Christina Kjær**  
uddannet bioanalytiker i 2009  
studerer nu biomedicin på Roskilde  
Universitet

**Vejledere: Peter Böhm, Sektion for Molekylærgenetisk Diagnostik, Rigshospitalet**  
**Tina Stausholm Nielsen, Professionshøjskolen Metropol**



**BILLEDE 2:** Øverst i figuren ses, hvordan LCGreen+ har bundet sig til et dsDNA. Nederst ses, hvordan LCGreen+ frigives ved denaturering af dsDNA, hvorved fluorescensen formindskes.

temperatur end homoduplex, idet den svagere binding i punktmutationen brydes ved lavere varmepåvirkning. Teoretisk beregning vil estimere 1:1-dannelse af heteroduplex i forhold til homoduplex, hvis man forudsætter, at der er lige stor sandsynlighed for, at de hver især dannes. Det er altså den samlede mængde af heteroduplex, der øges, mens forholdet mellem heteroduplex og homoduplex forbliver konstant. Når nu PCR-reaktionen er udført, kan man måle på det opformerede DNA ved hjælp af smeltekurveanalyse.

## SMELTEKURVEANALYSEN

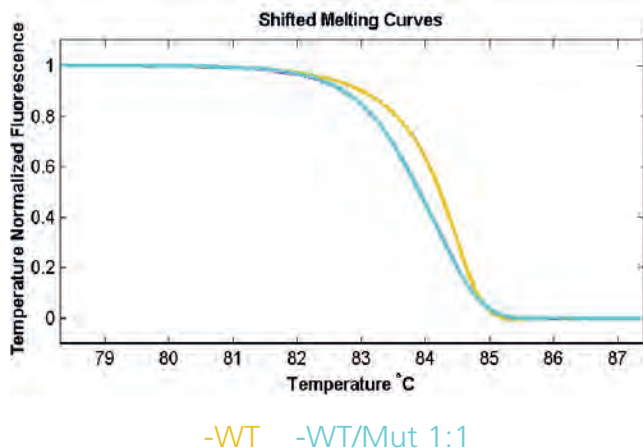
Via smeltekurver kan detektion og separation af heteroduplex fra homoduplex opnås.

Farvestoffet LCGreen+, der er et fluorocrom, binder til dsDNA og tilsættes i PCR-mixet. Det afgiver fluorescens som funktion af den temperatur, hvormed dsDNA'et udsættes. Se billede 2.

I takt med varmebaseret denaturering af dsDNA vil der ske et proportionalt fald af fluorescens. Til måling af dette anvendes en såkaldt LightScanner, og metoden er Hi-Res Melting<sup>TM</sup>, som er et softwareprogram, der kan behandle data fra fluorescens. I en given mængde amplificeret DNA vil en vis procentdel af dette, den del der er heterozygot, altså foranledige fald i fluorescens-signalet før den mængde DNA, der er homozygot. Dette visualiseres af Hi-Res Melting<sup>TM</sup> som såkaldte smeltekurver, hvorved der tydeligt kan detekteres tilstedeværelsen af heteroduplex. Se billede 3.

Metoden kan altså afsløre, om det afskrevne gen for en vis procentdel af cellerne indeholder en variant. Altså en mulig mutation, der kan være potentielt cancerfremkaldende. Ved hjælp af softwaren på lightscanneren kan man kigge på et afgrænset forløb af kurven. Det, der er interessant, er det sted, hvor kurvefaldet ligger. Billede 4 viser et zoom af dette sted.

Dette var så mine metoder, jeg kunne benytte mig af. Men hvilke parametre kunne jeg så justere på for at regulere specificitet og sensitivitet? Jeg mente jo, at svaret måtte være valget af protokol til PCR. Det var jo her, at heteroduplex blev dannet. Jeg søgte derfor efter yderligere viden om emnet i litteraturen. Først blev jeg klar over, at der var noget grund-



**BILLEDE 3:** Her ses to kurver med fluorescensen (y) som funktion af temperaturen (x). Man kan se, at faldet på kurverne sker ved forskellige temperaturværdier.

læggende teori, jeg måtte forstå. Teori omkring den såkaldte  $T_m$  og  $T_c$ .

## TM OG TC

$T_m$  er den temperatur, hvorved en given dobbeltstretet DNA-sekvens er denatureret for 50 % af sekvensernes vedkommende i et PCR-produkt. Hvis der blandt de afskrevne sekvenser er dannet heteroduplex, vil disse have en lidt lavere denatureringstemperatur pga. den lidt svagere binding ved varianten. Det er som tidligere nævnt det, man benytter sig af under smeltekurveanalysen.

Så ved at finde den specifikke denatureringstemperatur for en sekvens med varianten kan man i protokollen fastholde denne temperatur og derved minimere afskrivning af sekvenser uden varianten, idet disse slet ikke er denatureret endnu og derfor ikke afskrives.

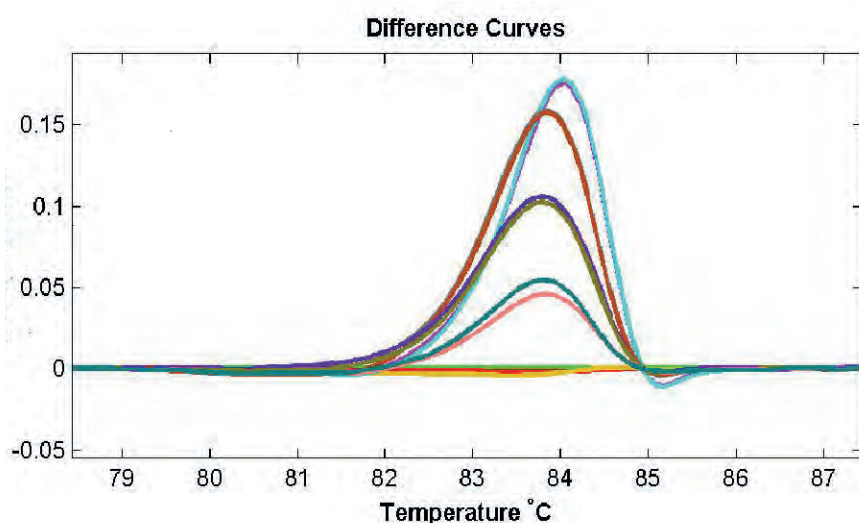
Det lille temperaturinterval, hvori kun heteroduplex er denatureret og endnu ikke homoduplex, kaldes  $T_c$ , den kritiske temperatur. Den kritiske temperatur  $T_c$ , hvorved der denatureres forholdsvis flest heteroduplexer i forhold til homoduplexer, kan fastsættes specifikt for hver sekvens, der ønskes afskrevet.  $T_c$  er afhængig af basesammensætning samt længde på sekvensen.  $T_c$  er omstændelig at fastsætte og findes eksperimentelt for hver sekvens, der arbejdes med i laboratoriet.

## PROTOKOLLERNE

Jeg blev opmærksom på en protokol udviklet i Kina af Li. et. al. kaldet COLD.

COLD-PCR-protokollen har en eksperimentelt fastsat  $T_c$ -temperatur. Som netop beskrevet i afsnittet om  $T_m$  og  $T_c$  skulle denne fastsættelse gerne sikre, at der fortrinsvis denatureres og opformeres heteroduplex. På Sektion for Molekylærgenetisk Diagnostik på Rigshospitalet havde min vejleder Peter Böhm udtænkt en anden protokol. Touch-Up-protokollen.

Touch-Up er skabt til at undgå det eksperimentelle arbejde. Tanken er, at der ved en dynamisk øgning af denatureringstemperaturen automatisk vil opformeres flere heteroduplex, fordi den dynamiske temperatur vil ramme  $T_m$  for heterodu-



**BILLEDE 4:** Her ses heteroduplexdetektion for forskellige fortyndingsgrader, hvor fluorescensforskellen (y) er en funktion af temperaturen (x). Man kan tydeligt se af toppunkterne på kurverne, at de har forskellige fluorescensværdier, men næsten samme smeltetemperatur for dobbeltbestemmelser af fortyndinger på 1:1, 1:10, 1:20, 1:75 samt WT.

plex i flere cykler, før  $T_m$  for homoduplex rammes. Herved skulle opformeringen af heteroduplex altså automatisk øges i forhold til homoduplex uanset  $T_c$ . Herved undgår man det store eksperimentelle arbejde med fastsættelse af  $T_c$ , hvilket er både tids- og ressourcebesparende.

Min nye viden ledte mig frem til det endelige spørgsmål, jeg stillede mig selv: Er Touch Up-PCR eller COLD-PCR mest velegnet som metode til opformering af heteroduplex fra et PCR-produkt på ca. 150bp med kendt punktmutationsvariant, idet denne variation efterfølgende ønskes verificeret ved sekventering? (For nærmere og præcis information om kriterier for valg af prøvemateriale, primere til PCR, forsøgsopsætningen med videre henvises til netudgaven af denne artikel).

Nu havde jeg altså 2 protokoller, jeg ville afprøve. Jeg forsøgte at gennemtænke, om min fremgangsmåde ville lede til resultater, der kunne sige noget om muligheden for at imødekomme det oprindelige behov, der altså var en generel øgning af diagnostisk sensitivitet. Forskellen mellem Touch-Up- og COLD-protokollen havde forskelligt opsæt for denatureringstemperatur, og det var jo det, der rent teoretisk skulle kunne gøre en forskel efterfølgende. Samtidig valgte jeg at tage standard-PCR-protokollen Touch Down med i forsøget som reference.

Det næste relevante spørgsmål måtte være: Er forsøgets resultater sammenlignelige med andre(s) resultater? Igen måtte svaret være tilnærmelsesvist ja. Jeg havde forsøgt at vælge opsæt, prøvemateriale og protokoller, der lå så tæt på de forsøgsopsæt, som jeg i litteraturen havde taget som udgangspunkt.

## MATERIALER OG METODE

Jeg fremstillede fortyndingsrækker af prøvematerialet.

- WT2: Wild Type nr. 2 DNA uden en mutation i BRCA1-genet exon 11-4.
- WT3: Wild Type nr. 3. DNA med en punktmutation i BRCA1-genet exon 11-4 kaldet 2201.

BRCA1 WT3	Type punktmutation
exon 11-4	Nt2201 C→T

Fortyndingerne blev lavet i følgende forhold:

WT3	WT2
1	1
1	10
1	20
1	50
1	75

Alt prøvematerialet, der blev overført til PCR-reaktionspladerne, stammede altså fra samme pool.

Kontroller: Jeg lavede dobbeltbestemmelser til alle prøver samt blindprøver. Jeg lavede 2 dobbeltbestemmelser på DNA uden variationen WT for at sikre, at der ikke er signal fra WT. Jeg tilsatte prøvemateriale og reagenser af ens mængde til 3 PCR-plader, og herefter var fremgangsmåden:

- Touch-Up-, COLD- og Touch-Down-protokollerne udføres på PCR-maskinen.
- Smeltekurveanalyser udføres.
- Sekventering på PCR-produkterne fra de 3 PCR-plader.
- Data opsamles og udprintes.

## TOLKNING AF RESULTATER

Smeltekurveanalyserne.

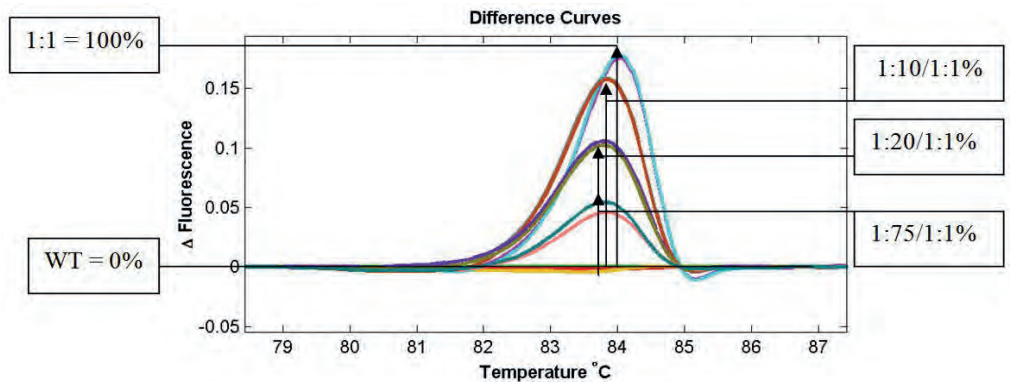
Det optimale er en opformering af heteroduplex. Hvis det lykkes at få et resultat, hvor de høje fortyndingsgrader 1:20-1:75 giver et højt fluorescenssignal, dvs. et signal, der tilnærmer sig signalet for fortyndingen 1:1, betyder det, at primersæt og protokol i samspil har været velegnet til opformering af heteroduplex. Måden at vurdere smeltekurverne på er vist på billede 5.

For det enkelte primersæt vil der være et maks. fluorescenssignal for fortyndingen 1:1, der udgør 100 %. Bundlinjen for WT2 udgør 0 %. For hver enkelt fortynding udregnes det procentvise forhold for fluorescenssignalet i forhold til 1:1. Dette gøres for samtlige 3 protokoller.

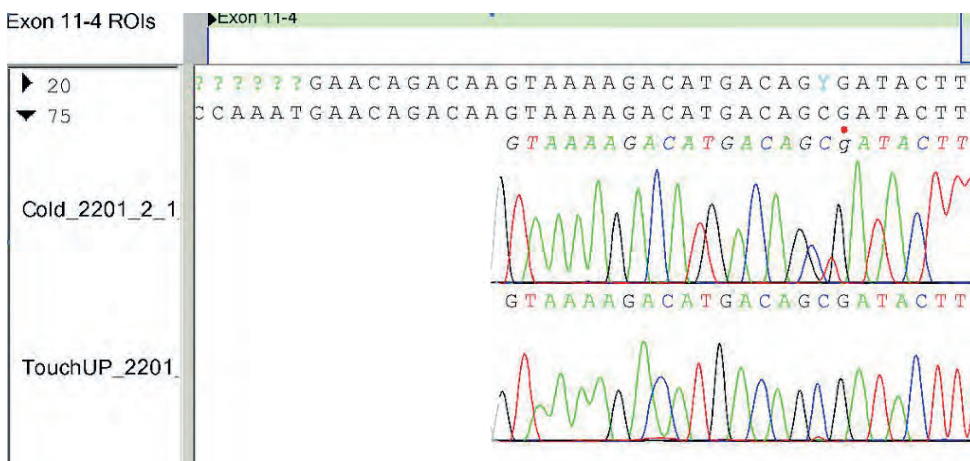
## SEKVENTERINGEN

Jeg undersøgte, ved hvilke fortyndingsgrader varianten fremkommer tydeligst ved sekventering. Dette er gjort på baggrund af visuel inspektion. Det optimale er en tydelig sekvens-

**BILLEDE 5:** Figuren viser smeltekurven for varianten med anvendt primersæt 3. Der ses tilstedeværelse af heteroduplex for fortyndingerne samt en lille afvigelse for dobbelt-bestemmelserne. Alle WT giver 0 i faldændring.



## RESULTAT FOR FORTYNDING AF VARIANTEN 2201 I 1:75



**BILLEDE 6:** Her ses sekventeringsresultatet, efter at COLD- og Touch-Up-protokollen er anvendt på varianten kaldet 2201 i fortyndingsforholdet 1:75. Den ekstra røde top, thymin, der ses sammenfaldende med den sorte, guanin, ud for COLD-protokollen, repræsenterer det visuelle bevis på opformeringen af varianten. Placeringen er markeret med en rød prik øpe i bogstavlinjen. Ved sammenligning med Touch-Up anes måske en svag rød top, men langt fra tilstrækkeligt til at diagnosticere ud fra.

afvigelse for varianten ved så høj en fortyndingsgrad som muligt, i forhold til signalet for fortyndingen 1:1, der udgør det teoretiske højst mulige signal for denne prøve. (For nærmere gennemgang af resultater og diskussion ud fra resultaterne henviser jeg til netudgaven af denne artikel).

### KONKLUSION

Resultaterne viste, at det lykkedes at opformere andelen af heteroduplex med Touch-Up-protokollen i en grad, så det var muligt at detektere varianter i fortyndingsforhold 1:20 ved sekventering. Det var en fordobling i forhold til tidligere opnåede resultater. Det undrede mig, at jeg generelt ikke opnåede specielt gode resultater for COLD-protokollen, der generelt klarede sig dårligere end selve referencen Touch-Down. COLD-protokollen viste dog nogle helt bemærkelsesværdige resultater ved brug af et bestemt primersæt, hvor andelen af opformet heteroduplex oversteg det teoretisk mulige. Mine resultater viste en opformeringsevne, hvorved en fortynding på 1:75 var tydelig ved sekventering, se billede 6.

### HVAD KAN DET BRUGES TIL?

Mulighederne for at anvende de opnåede resultater er mange. Som afslutning på denne artikel beskrives én mulighed.

Der laves store undersøgende mutationscreeninger på befolkningsgrupper for at afdække og undersøge, om der er forekomst af bestemte mutationer i forbindelse med bestemte lidelser og kliniske symptomer. Mine resultater kan tænkes at

blive anvendt til at reducere ressourceforbruget ved omfattende folkesundhedsundersøgelser for genvarianter, idet mine resultater viser, at jeg ved blot 1:10 kan se en variant ved sekventering. Ud fra dette ville det blive muligt at poole patientprøver i grupper af 10 personer, og er der ikke en variant, så ved man, at det ikke er, fordi man bare ikke har en metode, der er sensitiv nok til at registrere den.

Visse folkeundersøgelser som for eksempel Østerbrounderundersøgelsen rummer mutationscreeninger på op mod 100.000 deltagere. En reduktion på blot 10 % af de analyser, der skal udføres, er enorm. Fra 100.000 til 10.000. Perspektivet for den økonomiske og ressourcemæssige besparelse er anseelig. ▣

*Alle referencer er tilgængelige via netudgaven af denne artikel. Netudgave af projektet kan ses på dbio's hjemmeside under Fagbladet/faglige artikler.*

### PRÆMIERET ARTIKEL:

Christina Kjær fik Bioanalytikeruddannelsens Legat på 15.000 kroner for sit bachelorprojekt. Begrundelsen lød blandt andet, at projektet var originalt og langt fremme forskningsmæssigt. Desuden vil projektets resultater blive integreret i videre forskning og er allerede implementeret i Sektion for Molekylærgenetisk Diagnostik på Rigshospitalet.