

Nieuwe ontwikkelingen in de automatisering van moleculaire diagnostiek: mutatie-analyse

B. A. J. GIESENDORF, H. J. BLOM en J. M. F. TRIJBELS

De afgelopen jaren is het belang van de moleculaire diagnostiek sterk toegenomen als gevolg van nieuwe wetenschappelijke bevindingen. Dit brengt met zich mee dat de stroom monsters die geanalyseerd moet worden toeneemt. Ondanks de verbeterde methoden en technieken is moleculair genetisch werk tijdrovend en arbeidsintensief. Een aantal recente ontwikkelingen maken het echter mogelijk deze werkzaamheden te automatiseren. Geconcludeerd kan worden dat de recente ontwikkelingen ertoe zullen leiden dat moleculaire diagnostiek steeds eenvoudiger en sneller uit te voeren zal zijn en daardoor voor een brede groep niet-gespecialiseerde laboratoria toegankelijk zal worden. Op gebied van wetenschappelijk onderzoek bieden deze technieken een instrument om grote studies op te zetten waarin het risico van bepaalde genetische defecten voor patiënten vastgesteld kan worden.

Trefwoorden: moleculaire genetica; diagnostiek; automatisering; DNA; homocysteïne; mutatie-analyse

In het onderzoek naar oorzaken van ziektebeelden bij de mens neemt de kennis op moleculair biologisch gebied een enorme vlucht. Indien de genetische oorzaak van een defect eenmaal bekend is, kan screening hiervan op het erfelijk materiaal van de patiënt verricht worden.

Het belang van moleculair biologische technieken daarbij is evident en speelt in toenemende mate een rol op het terrein van erfelijke stofwisselingsziekten, de diagnostiek van infectieziekten, de hemato-oncologische diagnostiek en de HLA-typeringsdiagnostiek. Deze technieken behelzen onder meer DNA-amplificatie, scheiding en detectie van geamplificeerd materiaal, en mutatie-analyse.

In het kader van wetenschappelijk onderzoek naar de rol van genetische defecten bij een bepaald ziektebeeld is het vaak noodzakelijk dat grote aantallen monsters, afkomstig van (geselecteerde) patiëntengroepen en controle-individen, onderzocht worden. In het laboratorium voor Kindergeneeskunde en Neurologie (LKN) van het Academisch Ziekenhuis Nij-

megen neemt het onderzoek aan het homocysteïne (Hcy)-metabolisme een belangrijke plaats in. Een verhoogd Hcy gehalte in het bloed is een belangrijke risicofactor voor hart- en vaatziekten en voor obstetrische complicaties zoals neurale buis defecten (1). Een aantal enzymen spelen een belangrijke rol in het Hcy-metabolisme en het onderzoek in het LKN richt zich met name op het ophelderen van genetische defecten in deze enzymen en het risico hiervan voor de patiënt. Dit betekent dat DNA- en RNA extracties uit dikwijls honderden monsters (bloed- of ander lichaamsmateriaal) moeten plaatsvinden, gevolgd door de polymerase chain reaction (PCR), single-stranded conformation polymorphism (SSCP)- en/ of sequentie-analyse. Hoewel de huidige technieken enorm verbeterd zijn ten opzichte van een aantal jaren geleden, zijn bovenstaande werkzaamheden en met name nucleïnezuur extracties en elektroforesetechnieken, nog altijd tijdrovend, arbeidsintensief en gevoelig voor contaminatie. Het vergroten van de monstercapaciteit van apparaten en automatisering kunnen bijdragen aan verbetering en versnelling van het onderzoek en zullen uiteindelijk leiden tot verbeterde diagnostiek en adequate behandeling van patiënten.

Recente ontwikkelingen maken het mogelijk om de moleculaire diagnostiek zodanig te automatiseren dat toepassing hiervan grootschaliger kan plaatsvinden. Een aantal ontwikkelingen die hiertoe bijdragen komen in het onderstaande aan de orde.

DNA/RNA-extractie

Mutatie-analyse vereist in eerste instantie het isoleren van DNA uit het desbetreffende patiëntenmateriaal. DNA-isolatie uit grote aantallen monsters vergt in het algemeen veel tijd ondanks het grote aanbod aan diverse commerciële kits. Automatisering van dit proces zou een enorme verbetering betekenen in laboratoria waar dagelijks vele monsters geanalyseerd worden. De ontwikkeling van de BiomekTM2000 (Beckman), een robot-werkstation, maakt geautomatiseerde DNA-isolatie mogelijk.

Met behulp van dit robot-werkstation en een protocol gebaseerd op het gebruik van DNA-bindende magnetische beads, is het mogelijk om in 10 minuten uit 8 bloedmonsters (10 µl) 200-400 ng DNA per monster te isoleren (2). Dit resulteert niet alleen in een enorme tijdwinst, maar het systeem reduceert ook de kans op het maken van pipetteerfouten en/of verwisseling van monsters. Daarnaast is de Biomek een flexibel systeem dat geprogrammeerd kan worden voor tal van andere (extractie-) procedures.

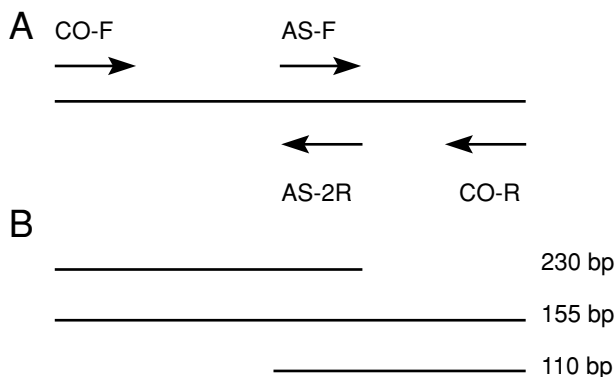
Afdeling Kindergeneeskunde, Academisch Ziekenhuis Nijmegen

Correspondentie: Dr. B. A. J. Giesendorf, Afdeling Kindergeneeskunde, Academisch Ziekenhuis St Radboud, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.

Januari 1997 gepresenteerd als projectvoorstel in het kader van de Werkgemeenschap Klinische Chemie.

Koppeling van Biomek aan PCR voor mutatie-analyse

Aansluitend aan de DNA-extractie is het mogelijk om met behulp van de Biomek diverse reacties op het geïsoleerde DNA uit te voeren. Door de Biomek te koppelen aan een PCR-apparaat kunnen de monsters, na het bijeenvoegen van de reactanten, direct in de PCR-machine geplaatst worden. Software, noodzakelijk voor het realiseren van een dergelijk systeem, is in ontwikkeling. Mutatie-analyse van reeds bekende mutaties kan vervolgens met deze apparatuur geautomatiseerd uitgevoerd worden door middel van technieken als 1 allel-specifieke PCR (3), 2 PCR gevolgd door restrictie-enzym analyse of 3 het gebruik van allel-specifieke fluorescerende probes. Allel-specifieke PCR (zie figuur 1) maakt gebruik van 2 'outer' primers (forward en reverse) en twee allel-specifieke primers waarvan de 3' base gepositioneerd is op de mutante base in het gen. Een van de allel-specifieke primers is complementair aan het wildtype allel, de andere allel-specifieke primer is complementair aan het mutante allel. Dit resulteert in de gelijktijdige vermenigvuldiging van een controle fragment door de outer primers en één of beide allel-specifieke fragmenten door de allel-specifieke primers in combinatie met de outer primers. Na PCR kunnen de producten met behulp van agarose gel-elektroforese aangetoond worden. Screening van (nog) onbekende mutaties kan plaatsvinden door middel van SSCP (4). Met behulp van PCR (met radioactief gelabelde nucleotiden of met fluorescerende primers) wordt het te onderzoeken DNA-fragment geamplificeerd en gedeneatureerd tot enkelstrengs DNA. Na 'opvouwing' van de enkelstrengsfragmenten, waarbij een mutatie in een fragment aanleiding geeft tot een andere vouwing en daarmee een andere migratiesnelheid in de gel, worden de fragmenten gescheiden en de migratieverschillen gedetecteerd door middel van polyacrylamide gelelektroforese en autoradiografie. Het toepassen van capillaire elektroforese (CE), eerder beschreven door Kuypers et al. (5) voor het scheiden van de SSCP fragmenten en PCR-producten zou niet alleen een enorme tijd-winst betekenen maar ook verdere automatisering



Figuur 1. A: Allel-specifiek PCR: CO-F en CO-R zijn de 'outer' primers, AS-F en AS-R zijn de allel-specifieke primers. B: De producten die kunnen ontstaan na PCR met de 4 onder A beschreven primers.

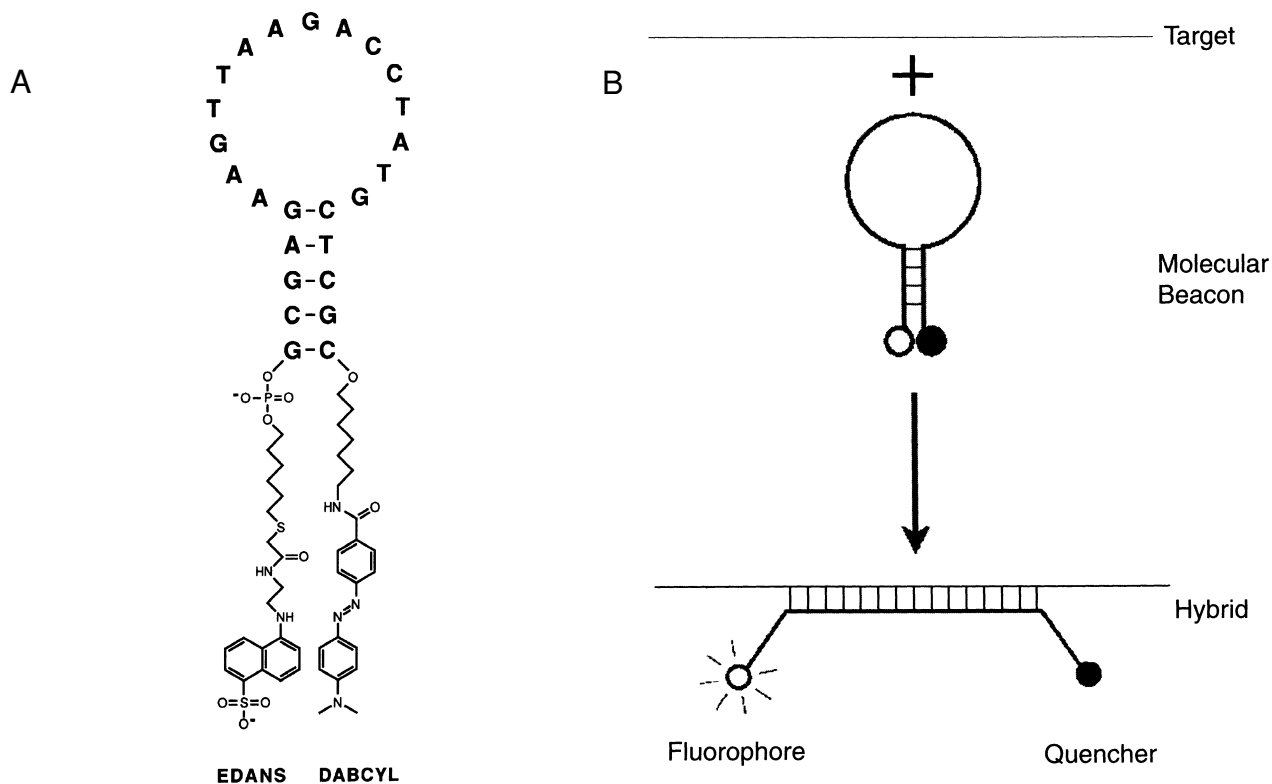
van het proces en eliminatie van het gebruik van radioactiviteit mogelijk maken.

Toepassingen van capillaire elektroforese (CE)

Relatief nieuw is de toepassing van CE voor het scheiden en kwantificeren van DNA-fragmenten tot 12.000 bp. CE berust op het scheiden van moleculen in een capillair met een diameter in de orde van micrometers waarover een spanningsverschil (tot 30 kV) aangebracht wordt. De techniek is superieur aan conventionele elektroforese wat betreft snelheid, scheidingsefficiëntie, massagevoeligheid, de hoeveelheid te gebruiken reagentia en het produceren van afvalstoffen. Omdat met deze methode zeer kleine volumina gebruikt worden is het gebruik van gevoelige, laser-geïnduceerde fluorescentie (LIF) detectoren aan te bevelen. Met CE-LIF is het zelfs mogelijk zeptomolen DNA (10^{-21}) aan te tonen waarmee nieuwe terreinen in de moleculaire genetica ontsloten kunnen worden. Daarnaast biedt CE de mogelijkheid tot het ontwikkelen van (semi)-geautomatiseerde routinemethoden voor mutatie-analyse. Zijn de monsters eenmaal in het apparaat geplaatst dan kan injectie, scheiding en het verzamelen van data automatisch plaatsvinden. Optimalisatie van CE is mogelijk door meerdere capillairen te gebruiken (multi-capillary electrophoresis) en monsters kort na elkaar te injecteren (tandeminjectie CE). Dit resulteert in een zeer hoge monster throughput'. Het koppelen van een Biomek-PCR-station aan CE maakt volledige automatisering van DNA-analyses uit bloed mogelijk en biedt nog vele andere voordelen. Naast de eliminatie van tijdrovende conventionele procedures voor DNA-isolatie en elektroforese is het risico op contaminatie minimaal en kunnen grote aantallen monsters in korte tijd geanalyseerd worden. Verder kunnen de verkregen resultaten automatisch opgeslagen en digitaal geanalyseerd worden. Een groot voordeel is ook dat een dergelijk systeem zeer flexibel is en op eenvoudige wijze geprogrammeerd kan worden voor diverse toepassingen. Bovendien is het gebruik van toxische stoffen gereduceerd tot minimale hoeveelheden en wordt toepassing van radioactieve stoffen overbodig.

Fluorescerende probes: molecular beacons

Toepassing van CE-LIF in de moleculaire genetica vereist het gebruik van fluorescent gelabelde PCR-primers of intercalerende fluorescerende kleurstoffen (o.a. SYBR Green I) (6). Daarnaast kunnen ook fluorescerende DNA-probes gebruikt worden voor herkenning van een mutatie in het geamplificeerde product. Deze 'molecular beacons' zijn fluorescerende DNA-probes met aan de uiteinden een fluorofoor en een quencher. Als gevolg van de "hairpinstructuur" die gevormd wordt in afwezigheid van passend target DNA, bevinden fluorofoor en quencher zich zo dicht bij elkaar dat geen fluorescentie optreedt (7). Hybridisatie van de probe met het target verbreekt de "hairpinstructuur" en leidt tot fluorescentie (zie figuur 2). De probes kunnen aan een PCR-mengsel toegevoegd worden en het is zelfs mogelijk om op deze manier verschillen van 1 base (puntmutaties) aan te tonen (Giesendorf et al., unpublished data).



Figuur 2. A: Structuur van een molecular beacon. Dit oligodeoxyribonucleotide bestaat uit een 15-nucleotiden-lange probesequentie met aan de uiteinden twee complementaire 5 nucleotiden-lange-arm-sequenties. De fluorofoor, EDANS (5-(2'-aminoethyl) aminonaphtaleen-1-sulfonzuur), is gekoppeld aan het 5' uiteinde. De quencher, DABCYL (4-(4'-dimethylaminophenylazo)benzeenzuur), is gekoppeld aan de terminale hydroxylgroep. B: Principe van de werking van molecular beacons. De hairpinstructuur gevormd door de complementaire sequenties van de 'armen' kunnen niet in stand gehouden worden zodra de probe met het target-DNA een dubbel helix vormt. De beacon ondergaat een conformatie-verandering waardoor de uiteinden (fluorofoor en quencher) van elkaar verwijderd zijn, hetgeen resulteert in fluorescentie.

Naast het gebruik van CE-LIF voor detectie van fluorescent gelabeld DNA is het mogelijk om met behulp van een heel nieuw systeem, ontwikkeld door Perkin Elmer/ Applied Biosystems International, deze fluorescerende PCR-producten te detecteren. Dit systeem, de PRISM 7700 (recent beschreven door Mensink, ref. 8) is in feite een combinatie van een PCR-machine en een fluorescentie detector. Naast de detectie van DNA is het mogelijk het geamplificeerde product te kwantificeren. Een groot voordeel van de Prism 7700 is een minimaal risico op contaminatie. Bovendien is post-PCR-processing overbodig en kunnen de data direct digitaal geanalyseerd worden.

Toepassing op het gebied van het homocysteïne-onderzoek

Bovenstaande ontwikkelingen brengen volledig geautomatiseerde mutatie-analyse in de toekomst binnen handbereik. Binnen het LKN zal gestreefd worden naar realisatie van dit systeem door het koppelen van de Biomek aan een PCR-machine en capillaire elektroforese met een fluorescentie (LIF) detector. Dit systeem zal toegepast worden voor mutatie-analyse op het gebied van het Hcy onderzoek. Relevante mutaties op dit moment zijn de C677T mutatie in het methylenetetrahydrofolaatreductase (MTHFR) gen en de T833C-mutatie in het cystathionine beta-synthase (CBS) gen. Momenteel worden deze mutaties gescreend door middel van PCR en restrictie enzym digestie gevolgd door agarose gel-elektroforese. Om de procedure te vereenvoudigen en te versnellen zullen

allel-specifieke PCR-procedures ontwikkeld worden. Daarnaast zullen ook fluorescerende probes (molecular beacons) ontworpen worden die in staat zijn deze mutaties te herkennen. Door introductie van tandeminjectie zal de scheiding van PCR-producten middels CE veel sneller kunnen verlopen.

SSCP-analyse, voor de screening van onbekende mutaties, zal eveneens overgezet worden naar een geautomatiseerd systeem. PCR-producten zullen met fluorescerende primers gelabeld worden of zichtbaar worden gemaakt door middel van intercalerende kleurstoffen. SSCP-CE analyse zal gebruikt worden voor mutatie-analyse in onder meer het methionine synthase gen en het betaine-homocysteïne methyl transferase gen. Beide enzymen spelen een belangrijke rol in het Hcy metabolisme en mutaties in desbetreffende genen zijn mogelijk verantwoordelijk voor afwijkende Hcy spiegels in het bloed van patiënten. Bovenstaande ontwikkelingen maken het mogelijk om grote studies uit te voeren. Dit onderzoek zal leiden tot een beter inzicht in de oorzaken van hyperhomocysteinemie met als resultaat adequate diagnostiek en behandeling van de patiënt.

Ontwikkelingen in de nabije toekomst

Hoewel met behulp van genoemde technieken de moleculaire diagnostiek de komende jaren enorm verbeterd zal worden, is het einde van deze ontwikkeling nog niet in zicht.

Tijdens het 9e Internationale Symposium on High Performance Capillary Electrophoresis and Related

Microscale techniques (HPCE '97: Jan 26-30, Anaheim, CA, USA) werden de nieuwste ontwikkelingen op dit terrein gepresenteerd. Een aantal lezingen en posters waren gewijd aan op micro-chip gebaseerde technieken, met name op het gebied van DNA-scheiding en detectie.

Deze microflowsystemen (geëtst in glas of silica) bieden een netwerk waarin (bio)chemische reacties (onder andere PCR), monsterinjectie en scheiding van reactieproducten uitgevoerd kunnen worden. Vanwege de goede thermische geleiding van silica kunnen hoge elektrische spanningen toegepast worden waardoor de scheiding van DNA-fragmenten in zeer korte tijd optreedt. De systemen hanteren zeer kleine volumina (nanoliter tot picoliter) wat resulteert in een sterk gereduceerde hoeveelheid van benodigde reactanten. De ontwikkeling van deze chipformatsystemen betekent bovendien dat nieuwe technieken noodzakelijk zijn voor het pipetteren van deze microvolumina. Daarnaast zijn er systemen in ontwikkeling die verdamping van de monsters moeten voorkomen.

Overstap naar chipformat zal ertoe leiden dat reactie- en analysetijden sterk gereduceerd worden. PCR-reactietijden zullen slechts enkele seconden per cyclus bedragen. Bovenstaande nieuwe ontwikkelingen zullen ertoe leiden dat in de nabije toekomst moleculaire diagnostiek voor een brede groep gebruikers toegankelijk zal worden en geen koud maar slechts een 'klein' kunstje zal zijn.

Dit werk werd mede mogelijk gemaakt door de EU Commissie Demonstration Project Contract no. BMH4-CT95-0505.

Literatuur

1. Blom HJ, Boers GHJ, Eskes TKAB en Trijbels JMF. Hyperhomocysteinemie. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1995; 20: 20-26.
2. Mérel P, Dupin B, Comeau F, Lacoste L and Verzon G. Completely automated extraction of DNA from whole blood. *Clin Chem* 1996; 42: 1285-1286.
3. Locht LFT van de, Kuypers AWHM, Verbruggen B, Linssen P, Novakova IRO and Mensink EJBM. Semi-automated detection of the FactorV mutation by allele-specific amplification and capillary electrophoresis. *Thromb and Hemost* 1995; 74: 1276-1279.
4. Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K and Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 2766-2770.
5. Kuypers AWHM, Willems PMW, Schans MJ van der, Linssen PCM, Wessels HMC, Bruijn CHMM de, Everaerts FM, Mensink EJBM. Detection of point mutations in DNA using capillary electrophoresis in a polymer network. *J Chromatogr* 1993; 621: 149-156.
6. Skeidsvoll I and Ueland PM. Quantitative and sensitive analysis of double stranded DNA by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection using the new mono-intercalating dye SYBR Green I. *Anal Biochem* 1995; 231: 359-365.
7. Tyagi S and Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridisation. *Nature Biotechnol* 1996; 14: 303-308.
8. Mensink EJBM en Locht A van de. Nieuwe ontwikkelingen in de moleculaire diagnostiek: op weg naar bruikbare alternatieven voor PCR. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1997; 22: 29-33.

Summary

New developments in the automatisaton of molecular diagnostics: mutation analysis. Giesendorf BAJ, Blom HJ and Trijbels JMF. Ned Tijdschr Klin Chem 1997; 22: 215-218.

The diagnosis of molecular defects has become very important over the last years due to the increased knowledge in this field. This implicates that a growing number of samples require analysis. Despite the development of new techniques, molecular biological procedures are often cumbersome, time-consuming and labour-intensive. Recent developments enable the automatisaton of these methods. It can be concluded that these new techniques will lead to simple and fast molecular diagnostic procedures. These will be accessible even for non-specialised laboratories. With respect to scientific research, these techniques offer the possibility to conduct large studies in which the risk of certain genetic defects can be established.

Keywords: molecular genetics; diagnostics; automatisaton; DNA; homocysteine; mutation analysis