

Проф. др Богомир ДИМИТРИЈЕВИЋ

ГЕНСКИ ЧИП – DNK МАТРИЦА НА СИЛИЦИЈУМУ

УВОД

Када будући историчари буду критички писали о двадесетом веку, ери пребогатој публицистичким сензационализмом, само два догађаја ће заслужити по цело поглавље. Први је свакако компјутерски чип који нам је омогућио да уградимо наш ентитет практично у све, у опсегу од „паметних” бомби, преко новогодишњих честитки до мобилних телефона. Други догађај је можда и монументалнији: људска раса је сломила тврду љуску хуманог генома, безпоговорну суштину нашег бића.

Поглавље о првој револуцији ће се свакако отворити у Силиконској Долини где је Интел 1971. године лансирао микропроцесор. Колевка друге револуције још увек није установљена а највероватнији кандидат — и поред заиста изузетне овце на Шкотским пашњацима — је, не сасвим случајно, поново Силиконска Долина. Тамо се сада уобличавају биочипови који ће далеко превазићи било који клон и вероватно променити и медицинску праксу и квалитет нашег живота.

Ови чипови, засновани су на матрицама DNK, носе необичну сличност са чиповима који су поставили темеље ери информатике. Уместо транзистора, они су претрпани густом мрежом молекулских сонди (проба) које су тако синтетисане да специфично реагују са DNK. Од њих се очекује да истраживачима у биологији и медицини омогуће истовремену анализу више хиљада гена и да фактички помогну у убрзаном читању „књиге живота”. Трезвени историчари ће, наравно, приметити да генска револуција траје већ дуже време. 1990-те, на пример, почело је буџетско финансирање (Министарство за енергетику, САД) Пројекта „Хумани геном” (ХГП) који је прерастао у међународни подухват за дешифровање хуманог генома до 2003. Генски чипови су кардинални догађај за овај пројекат зато што обећавају да ће за другу револуцију урадити оно што је силицијумски чип урадио за прву: учиниће га персоналним.

Генски чип је већ достигао медијски врх: „У питању је моћна технологија, истовремено и политичка технологија коју многи желе а мало је ко има.” (Clinton, B., State-of-the-Union address, 27. Januar, 1998). „Неко је упалио светло!” (Trent, J., HGP Workshop, Tucson, 1998). Генски чип „p53” и његови следбеници ће учинити да савремена онкологија личи на преглед слона пипањем и то са завезаним очима (Nussbacher, K., Affymetrix, Santa Clara, CA).

На први поглед не изгледа да DNK, двочлана хемијска структура која кодира генетску информацију, има нечег заједничког са Java, Unix или C++. Ипак, DNK је најстарији и најкомплекснији од свих програмских језика и ужива монопол коме ни Bil Gates није раван – одређује функцију и добар део судбине свих организама, од једноставних вируса до људи. Нажалост, као и сваки програмски језик и он болује од ноторних „bugs and flaws”. Док је компјутерским експертима релативно лако да изврше „debugging” и „закрепе” програм, генетичарима је тешко чак и да читају кодирани запис у DNK, да и не говоримо о „debugging” и „upgrading” овог молекула у лечењу рака, Alchajmerove болести, атеросклерозе и других „баг”-ова у генетском материјалу.

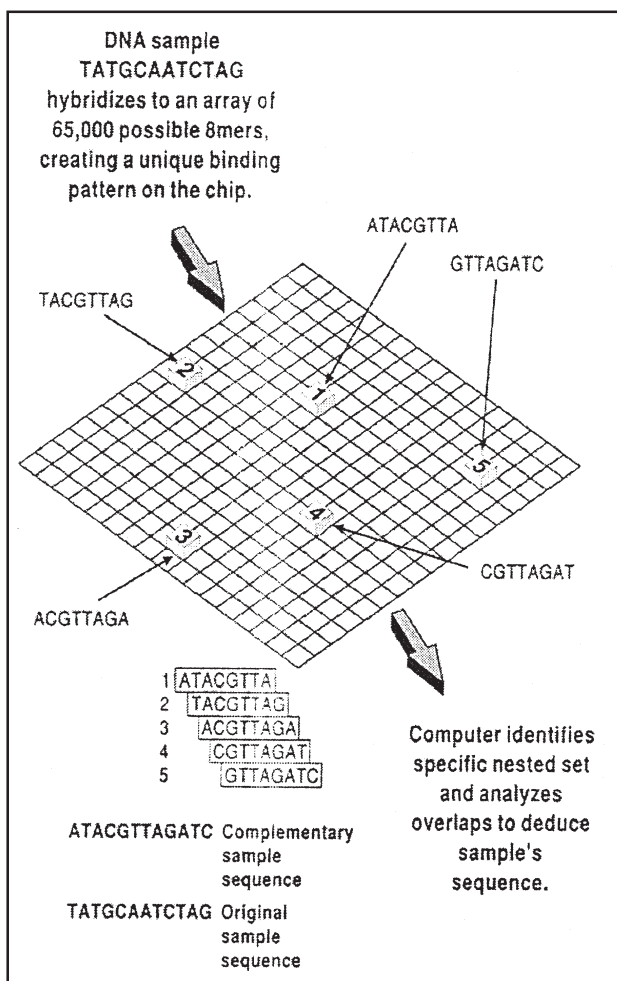
Реализација HGP-а је само неопходни почетак у нашој борби за бољи живот преко „праве” медицине и фармакологије. Врло је могуће да се генски чип покаже као стратешки маневар у тој борби. Прва идеја за таква производ је имала елементе претеране фантазије која, међутим, није имала логички недостатак. Наиме, типичан проблем који очекује „праву” медицину је случај у коме нам је познат сегмент DNK који је одговоран за патолошко стање и знамо да је неопходно проверити која је од могућих 20000 грешака у питању да би рационално усмерили терапију или превентиву. Наизглед претерана фантазија је била у основи једноставна идеја: уместо да се тражи прави кључ за браву која даје одговор, зашто не направити свих 20000 могућих кључева у пробати их све одједном? За то је, наравно потребан веома сложен уређај али не и незамислив ако се само позајме искуства из производње полупроводника. Фантазија је постала реалност и појавио се генски чип који дефинише мутације у генима HIV-а а затим „p53” чип који дефинише мутације код малигних болести. Уследили су и други чипови који детектују и идентификују мутације у познатим генима. Компаније које их производе бележе финансијске губитке али њихове акције на берзи расту и инвеститори их опседају. Ера DNK микроматрице је почела.

ТЕХНОЛОШКА ОСНОВА

Геномика настоји да биолозима обезбеди оно што је Периодни систем дао хемичарима – инвентар свих гена одговорних за појавне облике живота заједно са логичним системом за класификацију елемената од

којих се састоји. Пре само десет година само пребројавање gena је било егзотичан подухват. Хемијска једињења чини само око стотину елемената док елемената који су одговорни за функционалност организама има много више – неколико хиљада код бактерија и око сто хиљада код виших организама. Gene чине четири основна хемијска слова или базе којих има око три милијарде код сисара. Геномско мапирање и секвенцирање (утврђивање редоследа база) gena је сада већ оперативно у домену мегабаза и очекује се овладавање гигабазним доменима у блиској будућности.

Наредни велики изазов је дефинисање законитости које произилазе из инвентара свих gena. Периодни систем је сумирао хемијске особине по редовима и колонама и наговестио правилности у субатомској структури. На сличан начин, разумевање биолошких система, са свих око 100.000 gena, захтева организовање основних елемената у складу са њиховим особинама. Биолошки периодни систем неће бити једнодимензионалан јер одражава сличности на различитим нивоима: примарна секвенца DNK у кодирајућим и регулаторним регионима; полиморфна варијација у оквиру врсте или популације; временско просторна експресија gena у току развића, физиолошких процеса и болести; и субћелијско дистрибуирање и молекулске интеракције протеинских молекула. Традиционални приступ ген-по-ген је потпуно неадекватан због димензија проблема. Зато је неопходно имати глобалнији увид у биоло-



Сл. 1.

шке процесе: остварити истовремени преглед стања код свих елемената у реалним динамичким ситуацијама.

DNK матрице представљају прву велику наду за остварење овако амбициозног циља. За сада једино генски чип даје наду да се систематично прате варијације у DNK и RNK. То је разлог због кога се очекује да постану стандардне алатке и у молекуларној биологији и у медицинској пракси. Нагли раст интересовања за матричне технологије иницирала су два кључна открића. Први напредак је употреба непорозних чврстих подлога за DNK пробе. Овај напредак је олакшао минијатуризацију матрица и примену флуоресцентних детектора. Преко 10 000 различитих популација cDNK се могу прецизно (роботом) нанети на микроскопску плочицу и анализирати хибридизацијом. Други напредак је била ласером катализована хемијска синтеза DNK проба на начин веома сличан литографији која се користи у производњи полупроводника. У току је развој *in situ* синтезе са реагенсима које дозира уређај сличан „инк-јет” штампачима.

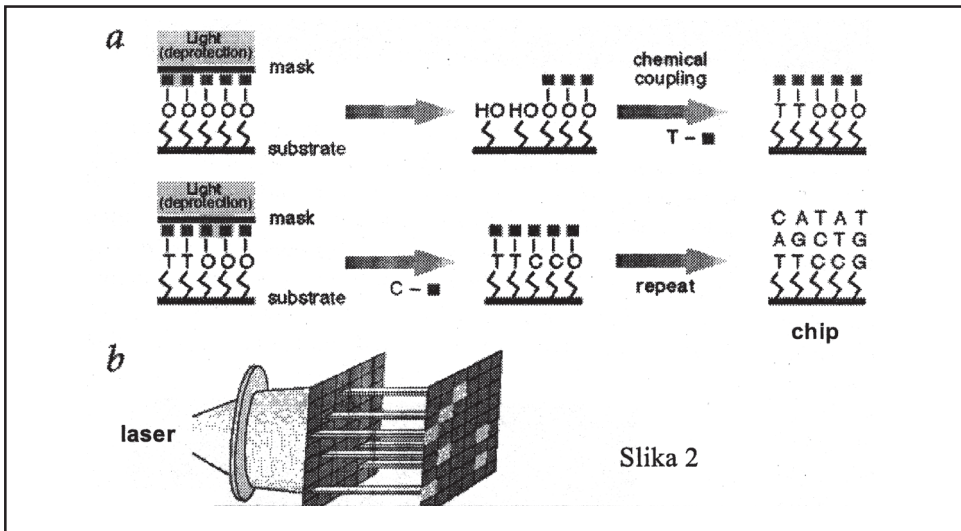
Идејна основа технологије се заснива на такозваном секвенцирању хибридизацијом (sequencing by hybridization, SBH). Иако идејно најстарија, ова технологија још увек није технолошки комплетирана иако је интензивно развија моћни HiSeq Inc. из Sunnyvale, CA. Већ дуже време се наговештава уређај за мегабазну анализу DNK. Иако, очигледно, још увек нису решени сви технички проблеми, ова метода има незаменљив педагошки значај јер илуструје основне принципе технологије DNK матрица. Због тога је одабрана за ову прилику и биће приказана нешто подробније.

Основни принцип је приказан на Слици 1. Централни значај имају основне особине DNK молекула. У питању је двочлана хеликсна структура, састављена од два међусобно увијена једноланчана низа. Сваки једноланчани сегмент је низ основних слова генетике – база А, G, T и C. Хеликс настаје комплементарним (специфичним) спаривањем искључиво парова А-T и G-C. Једноланчани молекули су векторски усмерени и антипаралелни у хеликсу. Формирање хеликса је реверзибилна реакција са строго усмереним спаривањем база. Ова реакција се назива хибридизацијом и важно је да формирање хеликса не зависи од порекла и дужине једноланчаних молекула (ланаца) већ о исходу реакције одлучује да ли су задовољена правила спаривања база, односно да ли су ланци комплементарни. Секвенцирање хибридизацијом је илустровано у случају када је DNK проба на матрици октамер (осам база дугачки ланац). На свако поље на матрици је једним крајем везан по један скуп идентичних октаметара од 65 000 могућих редоследа од четири елемента у низу од осам. Хемијска веза октамера са матрицом је довољно стабилна да издржи физичко-хемијске услове раздвајања ланаца (денатурације) и њиховог спаривања (хибридизације). Флуоресцентно обележен узорак DNK (TATGCAATCTAG) се денатурише и хибридизује са свим октамерима на матрици. Стабилан хибрид (дуплекс) ће формирати само у случају када

постоји комплементарност. Матрица, генски чип, се опере раствором који уклони нехибризовани материјал. Оптички уређај, епифлуоресцентни конфокални сканирајући микроскоп, детектује флуоресцентна поља која су истакнута на слици (поља 1-5). С обзиром да компјутер зна адресе свих поља на метрици и секвенце припадајућих октаметара, преклапањем генских проба 1-5 дедукује се редослед база у тестираном узорку. Овај процес представља фактичко читање непознатог сегмента неког гена, односно SBH процедуру.

Описани принцип се, теоријски, може применити за секвенцирање, детекцију специфичних DNK и RNK молекула у хетерогеној популацији и за идентификацију мутација у познатом гену који је од посебног значаја. Последње две апликације су већ практично реализоване. Ова, потенцијално моћна технологија, још увек је мање у употреби него класичне скупе и споре методе. Разлога за то има више а највеће ограничење, у овом тренутку, представља производња генског чипа и технолошки проблеми у адекватном генерисању флуоресцентних сигнала. Као илустрација тренутног стања следи опис два различита приступа проблему.

Први, комерцијални генски чип је производ већ поменуте компаније Affymetrix. Процес који се примјењује за производњу DNK чипова је сличан литографским методама у производњи полупроводника. У питању је ласером катализована *in situ* хемијска синтеза дијагностичког олигонуклеотида – једноланчаног DNK молекула који треба да хибридује са DNK молекулом који се тестира. Синтеза се изводи на супстрату који је хемијски дериват силицијума и који треба да постане генски чип. Прво, ласерски сноп активира везајућа места на супстрату, пролазећи кроз ма-



Слика 2

тричну маску са претходно задатим образцем (Слика 2). Супстрат се, затим, хемијски третира тако да омогући реакцију једне од четири DNK базе са активираним везујућим местом. Процес се затим понови још три пута са различитим матричним маскама тако да цео супстрат добије прво слово (DNK базу). Компјутерски алгоритам дефинише серију литографских маски тако да се понављањем оваквог процеса додаје једно по једно слово и синтетише велики број дијагностичких олигонуклеотида на дефинисаним пољима матрице која чини генски чип.

Након производње чип је спреман за употребу која подразумева хибридизацију са узорком који се тестира. Такав узорак представља DNK изловану из биолошког материјала који треба анализирати. Специфичан ген у таквој DNK се амплификује ланчаном реакцијом полимеразе – PCR реакцијом – и обележи флуоресцентним молекулом. Генски чип и флуоресцентна DNK се инкубирају у раствору под условима који остварују денатурацију и хибридизацију, при чему дијагностички олигонуклеотид и обележена DNK формирају дуплекс. Материјал који није нашао комплементарне секвенце на чипу се уклони и заостају само флуоресцентни молекули комплементарни секвенцама за које је чип био програмиран.

Као типичан пример производа који се међу првима појавио на тржишту биће описан генски чип p53 (GeneChip p53 Probe Array, Affymetrix, www.affymetrix.com). Ген p53 је најчешће измењен (мутиран) ген код малигних болести. Чак 60% анализираних хуманих малигнитета садржи овај ген у мутираном облику а мутација може бити на више од 200 позиција у 1300 база дугачком гену. Чип је спакован у картицу који олакшава руковање и има облик квадрата 12.8 x 12.8 cm. Састоји се од више од 50.000 дијагностичких ћелија од којих свака садржи милионе копија појединачног дијагностичког олигонуклеотида. Дијагностичка ћелија је квадратног облика, димензија 50µm. Појединачни дијагностички олигонуклеотиди су комплементарни различитим сегментима гена p53 и њихова дужина износи 18 база. Дијагностичке ћелије су уређене по групама од пет. Свака од њих садржи дијагностички олигонуклеотид потпуно комплементаран референтној секвенци, изузимајући само једну позицију некомплементарности названу место супституције. Разлика на овој позицији дефинише елементе групе од пет ћелија. Прве четири имају сваку од четири могуће DNK базе: А, Т, G, и С. Пета дијагностичка ћелија има празно место на овој позицији и симулира делецију у гену. Услови хибридизације су подешени тако да формирани дуплекс који је потпуно комплементаран даје флуоресцентни сигнал већег интензитета него дуплекс који има некомплементарност на месту супституције. Дијагностичке групе од пет ћелија су комплементарне свакој бази у гену тако да се свака појединачна база посебно тестира за присуство мутације односно одступање од референтне секвенце.

Након хибридизације резултујући флуоресцентни образац се анализира помоћу Hewlett-Packard GeneArray scanner-om. GenChip software ауто-

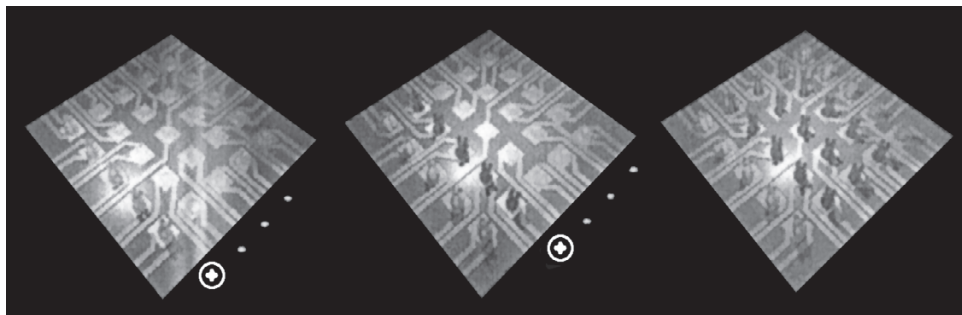
матски израчунава интензитете флуоресценце у појединачним ћелијама из којих дедукује секвенцу тестираног узорка и одступања од референтне секвенце.

Цена комплетног уређаја је око \$100 000, а појединачни чип је \$45. Техничке карактеристике су: анализира се DNK из произвољног биолошког узорка дужине 1262 базе (дужина р53 гена); поузданост је 99,9%; време потребно за једну анализу након изолације DNK, је 4,5 часова; максимална брзина и пропусна моћ је 5 узорака на сат, што је еквивалентно 6310 база на сат. Поређења ради, овакве карактеристике значе да је ова технологија више него 100 пута бржа од постојећих аутоматских система, при чему је цена експлоатације знатно нижа а цена уређаја приближно иста. Међутим, с обзиром на то да је, до сада, произведено тек нешто више од 10 чипова, класични системи за секвенцирање и генотипизацију су још увек незаменљиви у реалној пракси.

Други технолошки приступ који ће бити описан развија Наноген (San Diego, CA, www.nanogen.com). Први корак у производњи чипа представља електронско адресирање силицијумске плочице, односно електронско депоновање молекула са наелектрисањем, она може бити електронски вођена ка позитивној локацији на чипу. Због тога се дефинисана локација на силицијумској матрици активира позитивним наелектрисањем. Раствор са специфичном DNK пробом се нанесе на тако активiranу матрицу. Негативно наелектрисана проба се брзо депонује, концентрује и хемијски веже на локацији са негативним наелектрисањем. Након завршене реакције, вишак DNK пробе се спере са чипа и аплицира нови раствор са новом генском пробом. Тако се поље по поље, ред по ред, формира матрица специфичних, дијагностичких олигонуклеотида чије су адресе познате, односно тако настане генски чип (Слика 3 и 4).

Након електронског адресирања, Наноген користи електронско усмеравање и концентровање негативно наелектрисаних молекула који се анализирају (опет DNK) на једно или више дефинисаних места на чипу. Електронско концентровање DNK узорка (фактор 10^6) веома убрзава хибридизацију са имобилизованом генском пробом.

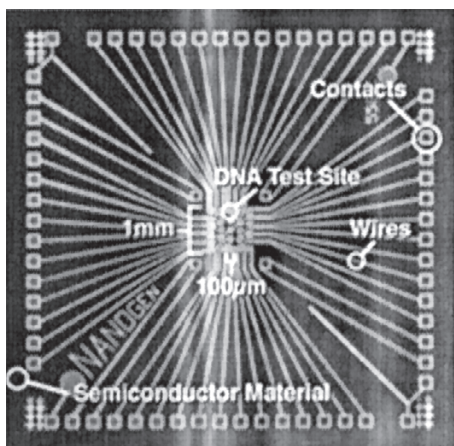
Овај поступак многоструко убрзава хибридизацију у односу на процес који зависи само од дифузије молекула у раствору. За уклањање незване или неспецифично везане DNK поларност поља промени знак и ефикасно уклони све осим DNK специфично хибридизоване са генском пробом на чипу. Фина регулација јачине и градијента поља омогућава независно детектовање комплементарног дуплекса, дуплекса који садржи један некомплементаран базни пар, инсерцију или делецију или различите друге мутационе абнормалности које се могу јавити код различитих патолошких стања. Типичан пример је уређај APEX (Automated Programmable Electronic Matrix), Наноген-ов чип 8850. Он се састоји од 64 адресиране микролокације, димензија $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$, на чипу мањем од



Сл. 3.

1 mm². Направљен на супстрату силицијум – силицијум диоксид – силицијум нитрид са металним микроелектродама и може да ради у режиму једносмерне струје. Могућа је независна контрола различитих услова хибридизације на различитим локацијама на матрици.

Описане технологије представљају само неке од тренутно актуелних програма за развој DNK матрица. Због ограниченог обима овог приказа неће бити приказана веома важна примена cDNK чипова. Ова технологија



Сл. 4.

је важна за истовремени мониторинг експресије великог броја гена у различитим ткивима и различитим физиолошким стањима и ослања се на сличне принципе као и претходно описане две технологије.

АПЛИКАТИВНИ ПОТЕНЦИЈАЛИ

Како се HGP приближава првој комплетној секвенци хуманог генома (планирано за 2003-ћу године), микроматрична технологија отвара нове хоризонте у изучавању застрашујуће сложености постављеног циља.

У овом тренутку реално је очекивати остварење следећа четири апликативна оквира. (1) Мерење нивоа експресије свих гена неког организма у различитим физиолошким условима. (2) Одређивање полиморфизма (генетичке разноликости) алела (алтернативних облика гена) на стотинама хиљада генетичких локуса у стотинама узорака DNK. Овакав подвиг би омогућио (3) реалну процену доприноса генетичке компоненте комплексним полигенским мултифакторијалним болестима које представљају доминантан медицински проблем. (4) У оквиру апликација које се односе на мутациони скрининг, DNK микроматрице треба да омогуће одређивање индивидуалне предиспозиције за неку болест или индивидуал-

ног, генетички предодређеног, реаговања на лекове. Престаје да звучи шаљиво да ће се тешко замислити живот без РС-ја и PGC-ја (personal gene chip).

Уколико се прогнозе остваре, а водећи ауторитети верују да хоће (видети Литературу) појавиће се проблем без преседана у биомедицинским наукама. Резултати истраживања засновани на DNK матрицама ће бити изазов нове врсте за научно издаваштво. Прво ће се јавити проблем разликовања каузалитета и корелације. То, само по себи, није нов проблем али димензије проблема јесу сасвим нове. Генски чипови ће производити резултате матричног типа са димензијама којима постојећи часописи нису прилагођени. Срећом, електронски простор на web странама научних часописа је или доступан или ће морати да буде доступан. Питање је, међутим, да ли су резултати генских микроматрица погодни за публикување у конвенционалном смислу – као штампане слике, табеле или додатна електронска информација. Вероватно је да ће ти резултати бити слични резултатима секвенцирања DNK који се обично публикују као „links to accession numbers” за специјализоване базе података. Конструкција ових база ће представљати изазов због вишедимензионалне природе хуманог генома као специфичне базе података и због тога биоинформатички изазов.

ЛИТЕРАТУРА

Nature Genetics, volume 21, ¹ 1, January 1999, Supplement: „Chipping forecast”. Collection of most recent and most comprehensive reviews on microarray technology from leading experts.

