

Compleet genoom analyseren voor minder dan \$100?

# DNA volgordes bepalen via foto of film

**DNA analyseren kan steeds sneller en goedkoper. De nieuwste technologie fotografeert of filmt losse DNA moleculen tijdens het kopieerproces, of volgt hun transport door een porie. Behalve een kostenbesparing levert 'single molecule sequencing' ook nieuwe onderzoeksmogelijkheden op.**

*Door Els van den Brink, gepubliceerd in het Laboratorium Magazine van februari 2011*

Terwijl het in kaart brengen van één menselijk genoom dankzij *next generation sequencing* technologie tegenwoordig nog maar een paar weken duurt, heeft de Amerikaanse X-Prize foundation tien miljoen dollar uitgelooft voor degene die honderd menselijke genomen kan sequencen binnen tien dagen. Dit voor een kostprijs van minder dan tienduizend dollar per genoom. Anderen streven al naar een \$1000 of zelfs \$100-genoom. Dat klinkt allemaal erg ambitieus. Toch gelooft Johan den Dunnen, hoogleraar medische genoomtechnologie binnen het LUMC in Leiden, dat de X-prize eind 2011 zal worden uitgereikt, en anders zeker in 2012. Wie de prijs gaat winnen, durft hij niet te voorspellen, maar zeker is dat het sequencen niet zal gebeuren door *next generation sequencing*, maar door de opvolger daarvan: *single molecule sequencing*. Als enige in Nederland heeft Den Dunnen sinds een jaar zo'n *single molecule sequencer* in huis en hij is zelfs al in onderhandeling over een tweede variant.

## Zonder PCR

Op dit moment zijn er drie verschillende apparaten voor *single molecule sequencing* in ontwikkeling. Ze werken volgens drie verschillende technologieën: de *true single molecule sequencing* technologie van Helicos, de *Single Molecule Realtime Sequencing* technologie van Pacific Biosciences en de *Nanopore Sequencing* technologie van Oxford Nanopore Technologies (zie kader). Helicos is de enige die de technologie al op de markt heeft gebracht. In alle drie de gevallen gaat het om de analyse van individuele moleculen. Dat betekent dat het niet meer nodig is om het DNA vooraf te vermeerderen door middel van een *polymerase chain reaction* (PCR). Den Dunnen: "Dat is de grootste bezuiniging. Het kost nu bijna niks meer om monsters op te werken, zowel qua werktijd als qua reagentia." Het overslaan van de PCR betekent bovendien dat de technologie meer mogelijkheden biedt voor kwantitatieve analyses.

## Microscopische foto's van DNA

Voor een analyse van Helicos wordt het DNA in kleine fragmenten gebroken. Aan elk fragment komt een staart van Adenine-nucleotiden (polyA), die kan binden aan een van de polyT-starten op een glasplaatje. Vervolgens wordt in verschillende rondes fluorescent gelabelde nucleotides toegevoegd, telkens één soort tegelijk (dus eerst alleen A, dan alleen G, etc.). Een microscopische foto maakt duidelijk aan welke DNA-fragmenten de nucleotide gebonden zijn. Na het verwijderen van de labels kan de cyclus worden herhaald met het volgende nucleotide. Aan het eind van de analyse heeft de HeliScope 23 miljoen foto's gemaakt en die vertaald naar een serie DNA sequenties. De technologie heeft nog wel zijn beperkingen. De korte lengtes van de DNA fragmenten maken het moeilijk om de sequenties te combineren tot een compleet genoom. Bovendien ziet het apparaat één op de twintig ingebouwde nucleotides niet, doordat fluorescente labels hun lichtfotonen in een willekeurige richting uitzenden, en daardoor niet altijd bij de camera terecht komen. Beide beperkingen maken de bioinformatica achteraf complex.

## Archeologisch onderzoek

Den Dunnen is enthousiast over de nieuwe onderzoeksmogelijkheden die de Helicos technologie biedt. Den Dunnen vertelt: "Bij forensisch en archeologisch onderzoek is DNA bijvoorbeeld vaak van matige kwaliteit, terwijl het verontreinigd is met kwalitatief goed DNA van bacteriën en schimmels of met DNA van de onderzoekers. De PCR bevoordeelt dit verontreinigende DNA." Met *single molecule sequencing* vonden Leidse onderzoekers relatief meer menselijk DNA terug bij opgegraven skeletten en konden zij altijd het geslacht vaststellen. "We gaan nu projecten doen met Naturalis, en kunnen ook analyses doen op oud archiefmateriaal", vertelt Den Dunnen.

### **Vertraagd voor de filmcamera**

Ondertussen is Den Dunnen bezig met onderhandelingen en subsidieaanvraag voor een volgend apparaat, namelijk van Pacific Biosciences. Dit bedrijf verwacht in 2013 een genoom te kunnen analyseren in vijftien minuten voor een kostprijs van minder dan \$1000 aan chemicaliën. In 2014 hopen ze die prijs zelfs te kunnen verlagen tot \$100. Op dit moment zijn alleen beta-versies beschikbaar. Den Dunnen verklaart: "Dit is een apparaat dat wij dolgraag willen hebben. Het is een volgende stap in de ontwikkeling, waarbij je ook losse moleculen analyseert, maar dan met veel langere leeslengtes."

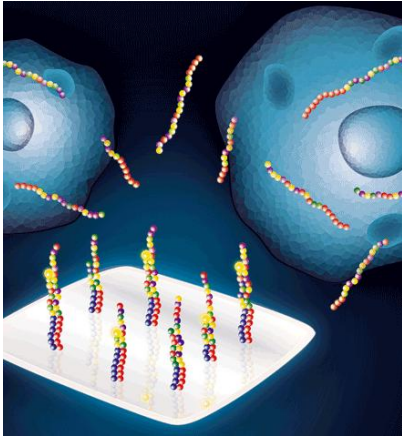
In plaats van vijftig nucleotides leest de Single Molecule Realtime sequencer er duizend tot vijftienhonderd achter elkaar. Het apparaat filmt een DNA polymerase, tijdens het kopiëren van een DNA streng. De polymerase is geïmmobiliseerd op de bodem van een miniscuul putje. Tijdens het inbouwen knipt de polymerase het fluorescente label van de nucleotides, zodat hun fluorescentie maar even zichtbaar is voor de filmcamera. Doordat de snelheid van de polymerase drastisch is verlaagd, is het proces nu langzaam genoeg om het te kunnen volgen. Den Dunnen: "Het probleem van de detectie van losse moleculen is nu opgelost, het probleem ligt alleen nog bij de imaging en dataverwerking." Ook deze techniek gaat gepaard met nieuwe onderzoeksmogelijkheden. Het DNA polymerase kan bijvoorbeeld vervangen worden door een RNA-polymerase of ribosoom, om de synthese van RNA of eiwitten live te kunnen filmen.

### **Zonder labels**

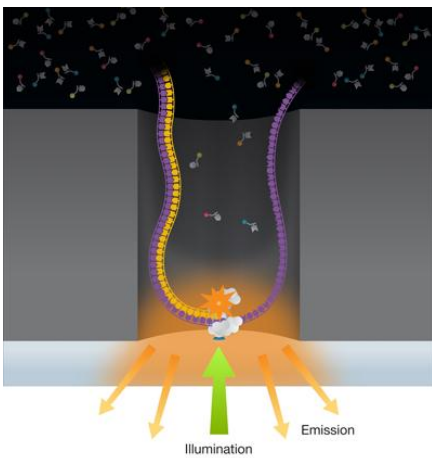
De allernieuwste variant van single molecule sequencing is nanopore sequencing. Den Dunnen verwacht in 2012 de eerste betaversies van het bedrijf Oxford Nanopore Technologies. Deze technologie wordt waarschijnlijk nog goedkoper, omdat het geen fluorescente labels gebruikt. Basis van de technologie vormt een porie, die zowel kunstmatig (silicium of grafeen) of biologisch (een eiwitporie) kan zijn. Het DNA wordt er in zijn geheel of in stukjes doorheen getrokken. Doordat elke nucleotide een andere vorm en grootte heeft, verschilt de elektrische weerstand tijdens het bewegen door de porie. Zo kan de DNA-volgorde worden afgeleid.

### **Wennen**

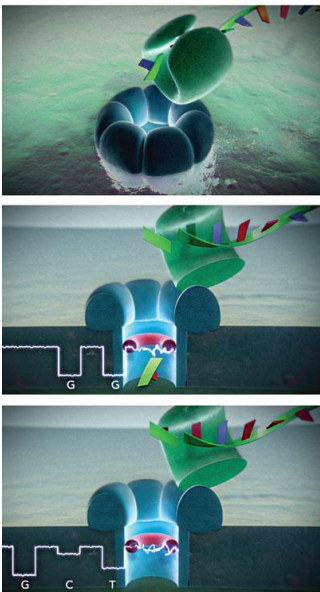
"Deze nieuwe technieken zijn voor ons in de eerste plaats een aanvulling, omdat ze mogelijkheden bieden die we eerder niet hadden", besluit Den Dunnen. "Tegelijkertijd wordt sequencen zo goedkoop, dat we het steeds vaker zullen inzetten om dingen op te lossen die we voorheen op andere manieren aanpakten. Ik verwacht dat het hooguit twee tot drie jaar zal duren, voordat het goedkoper is om het hele genoom te bepalen van een patiënt met verdenking op een bepaalde erfelijke ziekte dan om één voor één de daarvoor reeds bekende genen te bekijken. Uit dit hele genoom zouden we dan tegelijkertijd nog veel meer af kunnen leiden maar het is de vraag of die persoon daar zelf ook op zit te wachten. Maar dat is waarschijnlijk een kwestie van wennen."



De **True Single Molecule Sequencing** technologie van **Helicos** maakt microscopische foto's van DNA. Om een genoom te sequencen, knipt Helicos dit in kleine fragmenten van ongeveer 35 nucleotiden, en plakt vervolgens aan elk fragment een staart van Adenine-nucleotiden. Deze polyA-staart kan binden aan een van de vele polyT-staarten die geïmmobiliseerd zijn op een glasplaatje. Vervolgens wordt in verschillende rondes telkens één soort nucleotide toegevoegd, dat fluorescent is gelabeld. Als de eerste vrije base hiermee overeenkomt, kan dit gelabelde nucleotide binden. De Heliscopie maakt dan een foto om te zien op welke plaatsen een label zit. Tenslotte wordt het label van de nucleotides verwijderd en gaat een volgende ronde van start met een ander nucleotide.



Bij de **Single molecule realtime sequencing** technologie die wordt ontwikkeld door **Pacific Biosciences**, wordt een DNA polymerase enzym vastgezet onderin een klein putje. Enkelstrengs DNA (paars) komt hier bij, en wordt door deze polymerase gekopieerd (geel). De nucleotides die hiervoor nodig zijn, zitten in de vloeistof en zijn fluorescent gelabeld. Het fluorescente label zit in aan de derde fosfaat, wat betekent dat het label eraf gaat zodra de nucleotide is vastgemaakt aan de DNA streng. Daardoor is het label alleen even in de buurt van de polymerase op moment van inbouwen, en verdwijnt daarna weer door diffusie. Een filmcamera volgt van onder de polymerase en meet de fluorescentie van de ingebouwde labels.



De **Nanopore** technologie van **Oxford Nanopore Technologies** is ook nog in ontwikkeling. De plaatjes tonen een eiwitporie (blauw) met daaraan een DNA-afbrekend enzym. Deze knipt het DNA in stukjes en stuurt vervolgens elk afgeknipt nucleotide in de porie. In de porie zit een cyclodextrine-ring (roze), waarin de nucleotide even blijft steken. Hierdoor verandert de elektrische spanning. Dat is het signaal dat wordt gemeten. Er zijn ook varianten mogelijk waarbij het DNA-afbrekend enzym ontbreekt en de DNA streng in zijn geheel door de porie gaat. De porie kan ook gemaakt zijn van kunstmatig materiaal, zoals silicium of grafeen.