

Pratik Shah i laboratoriet, hvor han betragter prøver med fluorescerende molekyler. Foto: RUC

# NY TEKNOLOGI BRUGER DNA SOM SPION I CELLEN

**Såkaldt mikro-RNA spiller en vigtig rolle i mange processer i vores celler, herunder i udviklingen af forskellige sygdomme. Med en ny teknologi, der udnytter en kombination af særlige DNA-strukturer og nanoklynger af sølv, kan man nu følge sådanne mikro-RNA-molekyler direkte i levende celler.**



## Om forfatteren

Pratik Shah er adjunkt ved Institut for Naturvidenskab og Miljø, Roskilde Universitet. Han forsker i at bruge DNA til at bygge simple værktøjer, som kan registrere og respondere på ændringer i dets omgivelser. Det overordnede mål er at skabe biosensorer, der kan bruges til mange forskellige formål. Forskningen er tværvideenskabelig og integrerer viden fra biologi, kemi og nanoteknologi.  
shah@ruc.dk

**R**NA-molekyler spiller en vigtig rolle i udviklingen af alvorlige sygdomme som kræft. Derfor kan de potentielt hjælpe os med at afsløre, om en person har kræft, og hvordan sygdommen vil udvikle sig. Så hvis vi vil vide, om en person har kræft, er det en god idé at se på RNA-molekylernes adfærd i celler.

Udfordringen er dog, at vi i dag er nødt til at isolere RNA'et fra cellen, hvis vi vil undersøge det. Men på den måde kan vi ikke afsløre, hvordan RNA'et reelt fungerer i cellen.

Et godt spørgsmål er derfor, hvordan vi kan se RNA'et på arbejde uden at isolere det?

Vores forskning viser, at svaret muligvis ligger i små klynger af sølvpartikler, der er indkapslet i DNA-sensorer. Vi har udviklet en teknologi, som gør det muligt at følge RNA'et i realtid i cellen og vise os det cellulære maskineri, der er involveret i udviklingen af alvorlige sygdomme.

Men før jeg forklarer, hvordan den nye teknologi fungerer, skal vi først have på plads, hvorfor RNA har så stor betydning.

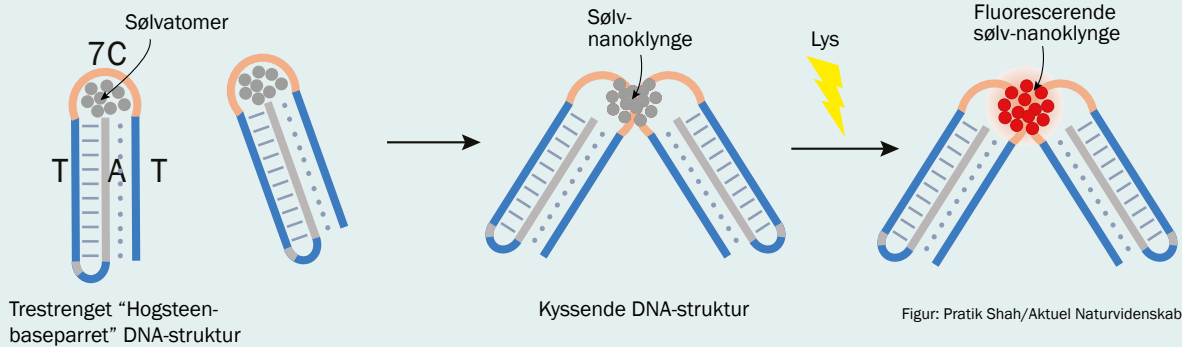
## Mikro-RNA påvirker udviklingen af sygdomme

RNA spiller en helt central rolle i cellen ved at bringe den genetiske kode for et protein, som den er lag-

ret i vores DNA, ud af cellekernen og hen til det molekylære maskineri (ribosomerne), som bygger proteinet ud fra denne opskrift. Dette messenger-RNA (som det kaldes) er typisk opbygget af tusindvis af byggesten (nukleotider). Der findes imidlertid også RNA, som kun er opbygget af 20-25 nukleotider og som har en anden funktion end messenger-RNA. Det kaldes mikro-RNA, og det spiller en vigtig rolle i reguleringen af vores gener.

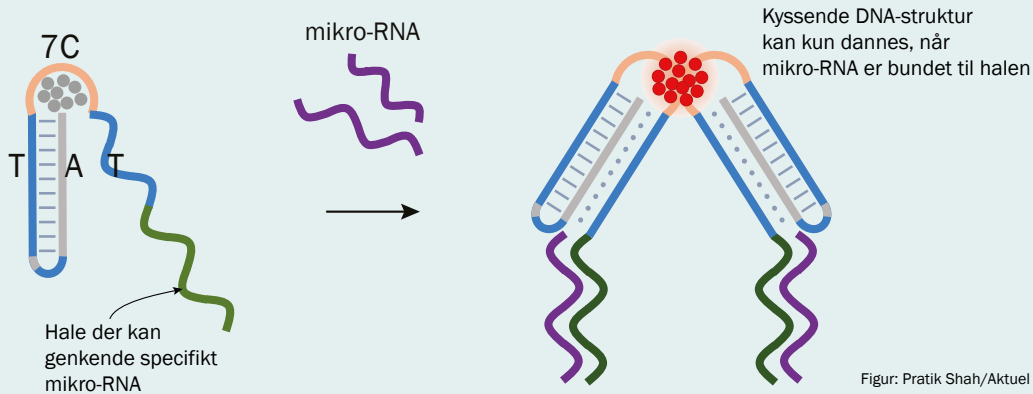
Mikro-RNA påvirker omkring to tredjedele af alle menneskets gener og spiller derfor med i mange forskellige biologiske processer i vores organisme – herunder udviklingen af sygdomme som kræft.

## Princippet i teknologien



Til venstre ses en trestrengt DNA-struktur kaldet en Hoogsteen-baseparret trestrengt DNA. Interaktionen mellem baserne thymin og adenin (A og T på figuren), er afgørende for, at en sådan trestrengt struktur kan dannes. Sølvatomer kan binde sig til denne struktur via basen cytosin. Sølvatomer foretrækker at binde sig til netop denne

base, hvor sølvatomerne finder sammen med nitrogen- og oxygenatomer. I strukturen danner syv cytosin-baser tilsammen en lille lomme, som tillader sølvatomerne at finde sammen og danne sølv-nanoklynger. Når to sådanne strukturer kommer tæt på hinanden dannes en "kysende DNA-struktur" med en fluorescerende sølv-nanoklynge.



Til den trestrengede DNA-struktur bliver der nu koblet en hale, der specifikt er designet til at genkende en bestemt type mikro-RNA. Kun når mikro-RNA har bundet sig til denne hale, kan to strukturer finde sammen og

danne en kysende DNA-struktur. Når man lyser på den kysende DNA-struktur, vil sølv-nanoklyngerne efterfølgende lyse op og afsløre, hvor i cellen strukturen – og dermed det undersøgte mikro-RNA – befinder sig.

Det er således dette mikro-RNA, vi gerne vil kunne studere, mens det udfører sin funktion i cellen.

Mikro-RNA-molekylerne bliver produceret på bestemte tidspunkter i løbet af en celleds liv, og de udfører deres funktion i bestemte dele af cellen. Og mikro-RNA'et er ikke statisk: Det bliver hele tiden dannet, bearbejdet, transporteret og nedbrudt i cellen.

Men når man isolerer RNA fra cellerne for at studere det (som vi gør i dag), går meget af informationen om dets liv i cellen tabt. Derfor er det vigtigt at kunne spore disse mikro-RNA-molekyler i cellerne uden at forstyrre selve cellen.

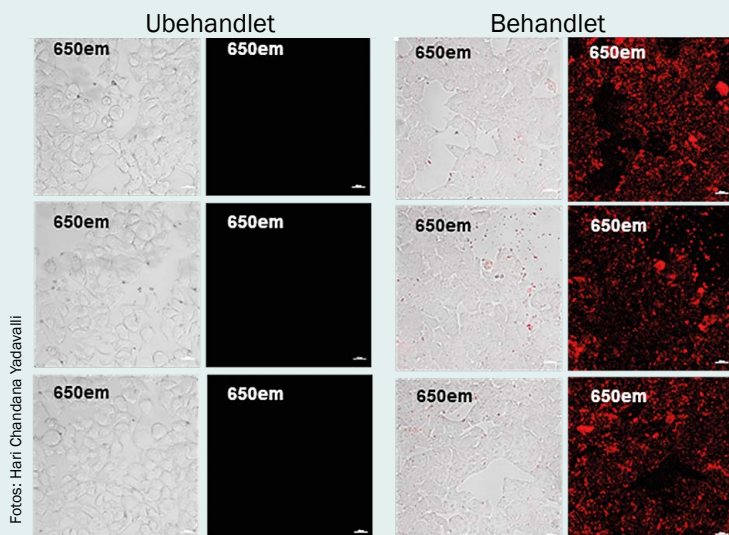
### DNA og sølv kan få RNA til at lyse op

I vores forskersteam har vi kombineret vores viden om DNA's biologi med viden om kemien bag fluorescerende nanomaterialer for at skabe en ny metode til at visualisere mikro-RNA-molekyler. Vores innovative teknologi benytter såkaldte "kysende DNA-strukturer", som er en særlig struktur, der opstår, når sølv-nanoklynger binder sig mellem DNA-molekyler.

Når nanoklynger af sølv er mindre end to nanometer, har de fluorescerende egenskaber. Det betyder, at de kan absorbere energi fra en lyskilde og udsende en del af denne energi igen som synligt lys.

Specifikt sker der det, at nogle af sølvnanoklyngernes elektroner bringes i en højere energitilstand ved belysningen, og der udsendes så lys (ved en længere bølglængde), når elektronerne falder tilbage i deres grundtilstand. Det er en yderst nyttig egenskab, da sølvnanoklyngerne kommer til at virke som små lygter, der afslører, hvor den kysende DNA-struktur helt præcist befinder sig i cellen i realtid.

Til at lave den kysende DNA-struktur benytter vi specialdesignede DNA-strengene, der fungerer som et stillads. Når DNA-strengene kommer tæt på hinanden, danner de en stabil struktur, som sølv-nanoklynger kan binde sig til. Det sikrer, at



Billederne viser til højre celleprøver, der er behandlet med et kompleks af molekyler, der kan danne en kyskende DNA-struktur med fluorescerende sølv-nanoklynger, mens celleprøverne til venstre er ubehandlede. Alle celler blev også behandlet med lipofectamin, et stof, der hjælper med at bringe molekyler ind i cellerne, som tiltrækker et bestemt mikro-RNA (mikro-RNA-21) til den kyskende DNA-struktur. Celleprøverne er fotograferet med forskellige mikroskopiteknikker, der fremhæver henholdsvis cellerne (de grå billeder) og de fluorescerende sølvnanoklynger, som exciteres med lys med en bølgelængde på 594 nm og efterfølgende udsender rødt lys med en bølgelængde på 650 nm. Det ses, at de behandlede celler lyser rødt, hvilket viser at mikro-RNA-21 har bundet sig til halen på den kyskende DNA-struktur.

sølvnanoklyngerne ikke kan vokse sig større end to nanometer og dermed miste deres fluorescerende egenskaber.

Det er ikke første gang, at forskere har koblet DNA og sølv sammen, men det er nyt at bruge et special-designet DNA-stillads, som i vores metode, og det er netop det, der giver os mulighed for at visualisere RNA'et direkte i cellen.

Stilladset består af to DNA-strukturer kaldet "Hoogsteen baseparrede trestrengede DNA'er". Som navnet antyder består denne type DNA af tre strenge (og ikke to som normalt), og det er en struktur, der kun sjældent findes i naturen og kun i meget kort tid.

Sølvatomer kan binde sig til dette trestrengede DNA via cytosin, der er en af de fire DNA-byggestene. Når to sådanne strukturer med DNA og sølv-nanoklynger kommer tæt på hinanden, binder de sig til hinanden

i en unik "kyskende DNA-struktur", der samtidig skaber et optimalt miljø for dannelsen af de fluorescerende sølvnanoklynger. Når man lyser på disse sølvnanoklynger, udsender de rødt lys.

### Kan hjælpe os med at se mikro-RNA

Vi har i vores forskning opdaget, at vi kan forhindre dannelsen af den kyskende DNA-struktur, når vi tilføjer en hale til den trestrengede DNA-struktur. Denne hale er designet sådan, at den kan genkende mikro-RNA. Og når mikro-RNA binder sig til halen, ophæves blokeringen, så der kan dannes en kyskende DNA-struktur.

På den måde har vi skabt et værktøj, der kan bruges til at afsløre, hvor meget mikro-RNA, der er i cellen, og hvor det helt præcist findes – i realtid. Hvis vi designer halen, så den kan genkende en specifik type mikro-RNA, der er involveret i sygdom, kan vi altså afsløre, om

dette mikro-RNA er til stede i cellen.

Forskning har vist, at mikro-RNA'er blandt andet findes i mitokondrier (dvs. i de energiproducerende organeller i cellen) og muligvis spiller en rolle i hjerte-kar-sygdomme, Alzheimers sygdom og diabetes. Hvis vi skal udnytte det fulde diagnostiske potentiale ved mikro-RNA, er det derfor afgørende, at vi kan bestemme præcis, hvor det findes i cellerne.

Siden opdagelsen af mikro-RNA er der kun lavet få undersøgelser af, hvor det findes i celler, primært på grund af manglen på velegnede metoder. Det er derfor stadig uvist, om og hvordan mikro-RNA'ets tilstedeværelse i forskellige dele af cellen ændrer sig under henholdsvis normale forhold og under sygdom. Vores nye teknologi kan potentielt være en løsning på den udfordring.

### Sparer tid og penge

Der kendes i dag flere end 1000 mikro-RNA'er i menneskekroppen, og formentlig findes der langt flere. Vi mangler endnu at identificere de mest pålidelige mikro-RNA'er – eller sæt af mikro-RNA'er – der kan bruges til at diagnosticere sygdomme.

For sygdomme som kræft og sygdomme i hjernen, for eksempel Alzheimers, findes allerede mikro-RNA-biomarkører, der kan hjælpe med at opdage sygdommen tidligt, dog med den gamle metode, hvor man trækker RNA'et ud af cellen og mister meget information. Det skyldes både biologiske og teknologiske problemer.

På teknologisiden kræver de nuværende metoder til at opdage isolerede mikro-RNA'er mange trin, komplekse processer og dyre materialer. Til sammenligning er vores metode meget mere enkel og reducerer behovet for avanceret udstyr, dyre materialer og komplicerede processer betragteligt.

Mens det tager flere timer at bruge vores teknologi til at opdage mikro-RNA'er direkte i levende celler,

tager det kun 30 minutter at bruge den til at identificere isolerede mikro-RNA'er. Ved først at bruge teknologien til at følge RNA'ets liv direkte i levende celler, kan vi blive klogere på mikro-RNA'ernes biologi og hvilke af dem, der kan være pålidelige biomarkører for sygdomme. Den viden kan efterfølgende bruges på isolerede mikro-RNA'er fra menneskeligt væv og forhåbentlig dermed bidrage til at diagnosticere alvorlige sygdomme tidlige.

### En metode, der kan bruges til mange ting

Vi har i vores forskning vist, at vi kan ændre, hvordan sølvnanoklynger lyser, alt efter hvordan DNA er opbygget. Og det giver os nye muligheder for at bruge DNA til at finde andre biomarkører i celler end RNA.

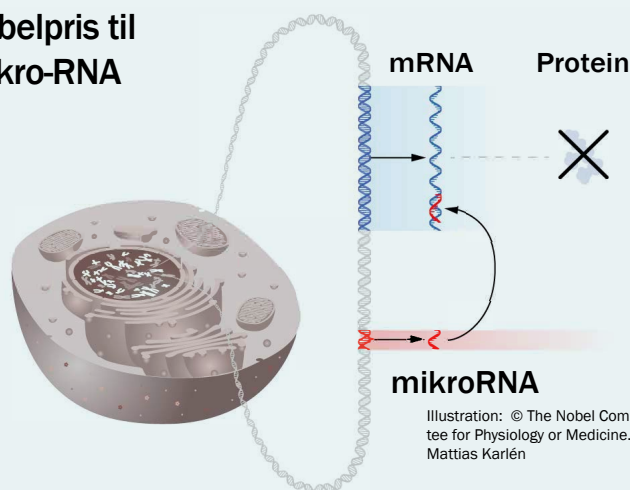
Vi har således i et andet studium brugt kombinationen af DNA og nanoklynger af sølv til at detektere reaktive oxygenforbindelser i cellerne. Reaktive oxygenforbindelser (for eksempel frie radikaler) er meget reaktive molekyler, der kan gøre betydelig skade på celler og væv.

Sådanne forbindelser er naturligt til stede i cellerne, hvor deres skadelige virkninger neutraliseres af antioxidant. Men hvis balancen forrykkes, fordi der dannes for store mængder reaktive oxygenforbindelser, kan det føre til såkaldt oxidativt stress. Og det kan være tegn på sygdomme som kræft, diabetes og neurodegenerative sygdomme som Alzheimers og Parkinsons sygdom.

Derfor er det vigtigt at kunne monitorere koncentrationen af reaktive oxygenforbindelser i cellerne. Og det er netop det, man vil kunne bruge vores teknologi til.

Alt i alt viser vores forskning, at DNA ikke bare er interessant, fordi det bærer på den arvelige genetiske information: Det kan også bruges som en biologisk kompatibel spion til at monitorere processer i vores celler. ■

## Nobelpris til mikro-RNA

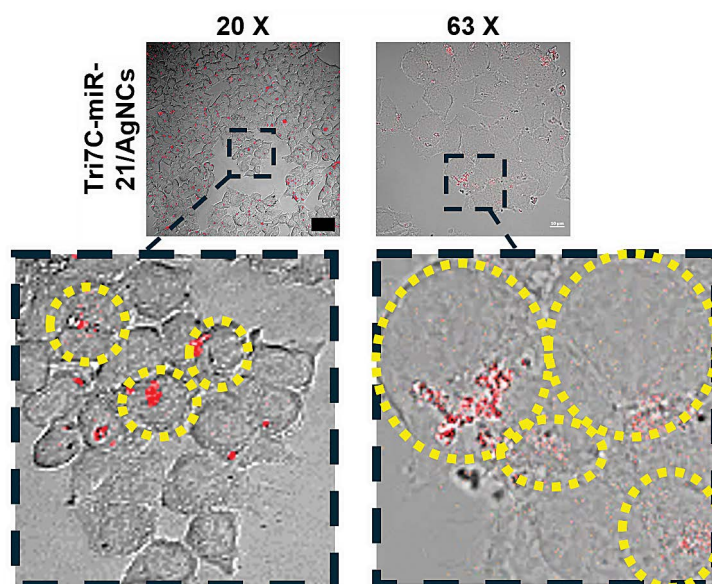


Årets Nobelpris i fysiologi eller medicin er meget relevant i forhold til den artikel, du netop nu sidder og læser. Nobelprisen blev nemlig givet til de to amerikanere Victor Ambros and Gary Ruvkun for opdagelsen af mikro-RNA og dets rolle i at regulere, hvordan generne kommer til udtryk.

Før opdagelsen af mikro-RNA var det kendt, at såkaldte transkriptionsfaktorer kunne binde sig til DNA og derved være med til at regulere, hvilke gener der bliver transkriberet (afkodet) til messenger-RNA og efterfølgende udtrykt som protein i cellen.

Opdagelsen afslørede en hel ny dimension i genreguleringen, idet mikro-RNA udøver sin funktion på et senere stadie i denne oversættelsesproces ved at binde til den komplementære sekvens på messenger-RNA. Når det sker, vil det typisk medføre, at proteinproduktionen forhindres, eller at det markerede messenger-RNA bliver nedbrudt.

Kilde: [www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org)



Figuren viser øverst billeder af celleprøver ved to forskellige forstørrelser, hvor man ser rød fluorescens fra kysende DNA-strukturer. Dette afslører tilstedeværelsen af specifikt mikro-RNA (mikro-RNA21). Nedenfor ses forstørrede udsnit af disse billeder, hvor de gule cirkler markerer grænserne for celler med forstærkede signaler.

Fotos: Hari Chandana Yadavalli

Artiklen er en redigeret udgave af artiklen *Ny teknologi bruger sølv til at få RNA til at lyse op i levende celler*, som oprindeligt er skrevet til Videnskab.dk

**Videre læsning**  
Forskningen omtalt i artiklen er publiceret i: H. C. Yadavalli et al: Tailed-Hoogsteen Triplex DNA Silver Nanoclusters Emit Red Fluorescence upon Target miRNA Sensing. *Small* 2024, 20, 2306793. [doi.org/10.1002/smll.202306793](https://doi.org/10.1002/smll.202306793)

H. C. Yadavalli et al: Energy Transfer Between i-Motif DNA Encapsulated Silver Nanoclusters and Fluorescein Amidite Efficiently Visualizes the Redox State of Live Cells. *Small* 2024, 20, 2401629. [doi.org/10.1002/smll.202401629](https://doi.org/10.1002/smll.202401629)