

Erhöhung der PCR-Genauigkeit durch chemisch modifizierte Primersonden**

Michael Strerath und Andreas Marx*

Professor Peter Welzel zum 65. Geburtstag gewidmet

Seit Veröffentlichung der ersten menschlichen Genomsequenzen im Jahr 2001 konzentriert sich die Forschung auf die Entdeckung individueller genetischer Unterschiede wie Einzelbasenvariationen (z.B. single nucleotide polymorphisms, SNPs).^[1] Die Bedeutung derartiger Erkenntnisse liegt darin, dass zunehmend ersichtlich wird, dass Einzelbasenvariationen im Genom mit unterschiedlicher Arzneimittelverträglichkeit oder Prädisposition für verschiedene Krankheiten verknüpft sind.^[1] In Zukunft könnte es die Kenntnis medizinisch relevanter Nucleotidvariationen ermöglichen, Therapien der individuellen genetischen Ausstattung anzupassen und die Behandlung mit Medikamenten zu vermeiden, die ineffektiv sind oder zu schweren Nebenwirkungen führen.^[1] Entwicklungen, die eine zeit- und kosteneffiziente Identifizierung von Nucleotidvariationen ermöglichen, sollten zu weiteren Fortschritten in der Pharmakogenetik führen.^[1,2]

Viele Methoden zur Erkennung von Nucleotidvariationen sind bereits beschrieben.^[2] Jede dieser Methoden hat Vor- und Nachteile, aber keine von ihnen konnte sich bisher durchsetzen. Den meisten bekannten Methoden geht eine Amplifikation der genomischen Zielsequenz durch eine Polymerasekettenreaktion (PCR) voraus. Dazu wird, nach der Isolierung des genetischen Materials, die interessierende Sequenz vor der eigentlichen Analyse durch PCR amplifiziert und angereichert.^[2] Methoden zur direkten Bestimmung von Nucleotidunterschieden durch PCR sind selten. Die Methode der allelspezifischen Amplifikation (ASA) bestimmt Nucleotidvariationen durch die An- oder Abwesenheit von DNA-Produkt nach der PCR-Amplifikation.^[3] Das Prinzip der ASA basiert auf der Bildung von kanonischen oder nichtkanonischen Primer-Templat-Komplexen am Ende allelspezifischer Primersonden. An einem korrekt gepaarten 3'-Primerende kann Amplifikation durch eine DNA-Polymerase stattfinden, bei einem fehlgepaarten Primerende hingegen sollte die Verlängerung gehemmt sein. Diese Methode ist jedoch nur wenig selektiv, sodass weitere aufwendige und damit zeit- und kostenintensive Optimierungsschritte notwendig sind.^[4] Neuerungen, die eine höhere Selektivität der allelspezifischen PCR-Amplifikation bewirken, sollten einen signifikanten

Einfluss auf die Verlässlichkeit und die Robustheit der direkten SNP-Analyse durch PCR haben.

Kürzlich berichteten wir, dass die Selektivität des Nucleotideinbaus durch eine DNA-Polymerase mit chemischen Mitteln durch Verwendung von 4'-alkylierten Nucleotiden erhöht werden kann.^[5] Wir nehmen an, dass die zusätzlichen kleinen Modifikationen in 4'-alkylierten Nucleotiden eine geringere Flexibilität im DNA-Polymerase-Substrat-Komplex bewirken, was zu einer geringeren Toleranz bei der Bildung eines geometrisch veränderten Nucleotidpaares führt.^[5,6] Ausgehend von diesem Modell vermuteten wir, dass durch Modifikationen die Flexibilität am 3'-Primerende ebenfalls gesenkt werden kann. Dadurch sollte eine geringere Neigung der DNA-Polymerase zur Verlängerung von geometrisch veränderten fehlgepaarten Primer-Templat-Komplexen resultieren. Solch ein System könnte wiederum die Basis für die Entwicklung einer neuen, hochspezifischen ASA-Methode sein. Hier berichten wir, dass dieses Konzept anwendbar ist und zeigen eine signifikante Erhöhung der Genauigkeit der PCR durch die Verwendung chemisch modifizierter Primersonden. Unsere Ergebnisse sind ein wesentlicher Beitrag in der Entwicklung von robusten Methoden zur Bestimmung von Nucleotidvariationen durch PCR.

Zunächst synthetisierten wir DNA-Stränge mit 4'-modifizierten Thymidinresten am 3'-Ende und verwendeten diese als Primer in Primerverlängerungsstudien.^[5b,7] Wir untersuchten mehrere thermostabile DNA-Polymerasen auf ihre Fähigkeit, 4'-modifizierte Primerenden zu verlängern, die entweder auf einem Templat nach Watson-Crick-Regeln gebunden waren oder eine einfache Fehlpaarung wegen einer Einzelbasenmutation aufwiesen (Abbildung 1).^[8] Zur Simulation von einem Zyklus in der PCR nutzten wir typische Reaktionsbedingungen und die vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer.^[7] Von den käuflichen, thermostabilen DNA-Polymerasen erwies sich die Vent-DNA-Polymerase (Vent-

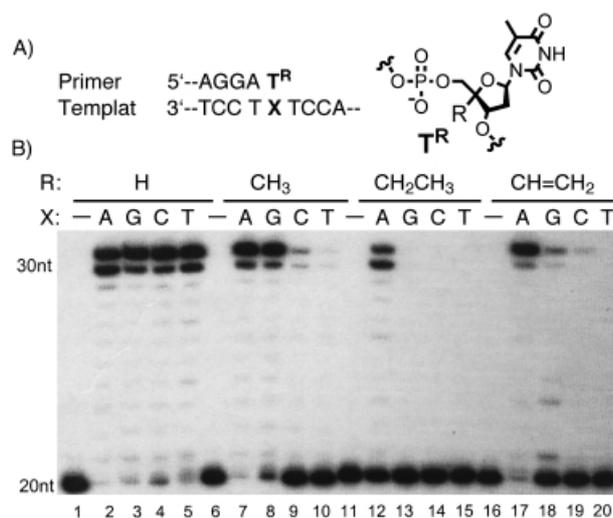


Abbildung 1. Effekte der 4'-Modifikation auf die durch Vent⁻katalysierte Primerverlängerung. A) Ausschnitt aus der verwendeten Primer-Templat-Sequenz. B) Ergebnisse der Primerverlängerung mit jeweils dem kanonischen (X = A) und den nichtkanonischen (X = G, C oder T) Primerenden. Die jeweilige Templat-Nucleobase und der 4'-Substituent sind in der Abbildung angegeben. In den Spuren 1, 6, 11 und 16 wurde nur Primer eingesetzt.^[7]

[*] Dr. A. Marx, Dipl.-Chem. M. Strerath
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Universität Bonn
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)
Fax: (+49)228-73-5388
E-mail: a.marx@uni-bonn.de

[**] Diese Arbeit wurde von der DFG, dem Fonds der Chemischen Industrie und der Volkswagenstiftung unterstützt. Wir danken Prof. Dr. M. Famulok für seine ständige Unterstützung und Prof. Dr. A. Pingoud und seinen Mitarbeitern für viele stimulierende Diskussionen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Mutante mit fehlender Exonuclease-Aktivität) in Primer-Verlängerungsstudien mit 4'-modifizierten Oligonucleotiden als das für unsere Untersuchungen am besten geeignete Enzym. Die bei den Verlängerungsstudien mit Vent⁻ in Kombination mit unmodifizierten Primern erhaltenen Daten zeigen, dass das Enzym die Verlängerung auch bei fehlgepaarten Primerenden signifikant unterstützt (Abbildung 1, Spuren 2–5).

4'-Modifikationen am Primerende hingegen bewirken in den meisten Fällen eine deutliche Erhöhung der Diskriminierung zwischen gepaarten und fehlgepaarten Primer-Templat-Komplexen (Abbildung 1, Spuren 6–20). Wir stellen fest, dass die Primer-Verlängerung von der Größe der 4'-Modifikation abhängt. Im Falle des T^{Me}/A- und des T^{Me}/G-Komplexes werden 4'-methylierte Primerstränge effizient von der DNA-Polymerase verlängert; die Verlängerung im Falle der T^{Me}/C- und T^{Me}/T-Fehlpaarungen hingegen ist deutlich gehemmt (Abbildung 1, Spuren 6–10). Die Erhöhung des sterischen Anspruchs der 4'-Modifikation durch die Einführung eines Ethylrestes führt zu einer erhöhten apparenten Fehlpaarungsdiskriminierung, die aber auf Kosten der Effizienz bei der Verlängerung von korrekt gepaarten Primerenden geht (Abbildung 1, Spuren 11–15). Interessanterweise bieten im Vergleich zu den ethylierten Sonden 4'-Vinyl-modifizierte Primer unter den verwendeten Bedingungen immer noch gute diskriminierende Eigenschaften, kombiniert mit einer deutlich erhöhten Verlängerungseffizienz im Fall korrekter Paarung (Abbildung 1, Spuren 16–20). Die Kombination dieser

Eigenschaften lässt die 4'-Vinyl-Modifikation als am besten geeignet für weitere Untersuchungen erscheinen.

Für die Genotypisierung synthetisierten wir als nächstes die entsprechenden 4'-vinylierten 2'-Desoxycytidin-Sonden. Durch anschließende Untersuchung der Wirkung dieser Sonden auf DNA-Polymerasen sollte sich zeigen, ob die bisher beobachteten Effekte der Fehlpaarungsdiskriminierung ausschließlich auf den Thymidinrest zurückzuführen sind. Dazu stellten wir 1^[9] her, das wir anschließend in die entsprechend modifizierte Festphase 2 mit geeignet geschütztem 4'-vinyliertem 2'-Desoxycytidinrest überführten (Abbildung 2 A).^[10]

Die benötigten 4'-modifizierten Primer wurden durch Einsatz der modifizierten Festphase in der automatisierten DNA-Synthese erhalten. Die anschließenden Studien zur Verlängerung der 4'-vinylierten Primer mit Vent⁻ ergaben unter identischen Bedingungen wie in den Experimenten mit den 4'-modifizierten Thymidin-Sonden ähnliche Ergebnisse: Die 4'-vinylierten 2'-Desoxycytidinreste führten ebenfalls zu enzymatischen Primerverlängerungen mit stark erhöhter Diskriminierung von Fehlpaarungen.

Ermutigt durch diese vielversprechenden Beobachtungen untersuchten wir als nächstes, ob diese Ergebnisse zu einer hoch allelspezifischen PCR weiterentwickelt werden können. Zunächst untersuchten wir die PCR-Amplifikation eines 63nt-Genfragmentes aus der humanen sauren Ceramidase durch Vent⁻. Gegenüber dem 3'-Ende des verwendeten Primers tritt in dieser Sequenz eine einzelne Nucleotidvariation auf.^[8] Um den Einfluss der 4'-Vinyl-Modifikationen in Primern auf die Diskriminierung in der ASA zu erfassen, wurde jede mögliche Nucleotidvariation im Templatstrang untersucht. Wie in Abbildung 3 gezeigt, führt die Verwendung

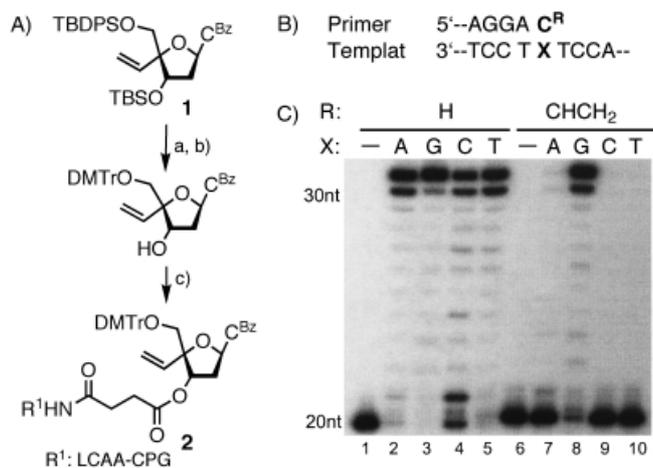


Abbildung 2. Synthese der 4'-vinylierten 2'-Desoxycytidin-Primersonden und ihre Wirkung auf die Primerverlängerung. A) Synthese der mit einem 4'-vinylierten 2'-Desoxycytidinrest beladenen Festphase. Reagentien und Bedingungen: a) TBAF, THF, 25°C, 4 h; b) DMTrCl, kat. DMAP, Pyridin, 25°C, 7 h, 55% (für zwei Schritte); c) succiniliertes LCAA-CPG, DMAP, EDC, NEt₃, Pyridin, 25°C, 16 h; dann 4-Nitrophenol, 25°C, 14 h; dann Piperidin, 25°C, 5 min; dann Acetanhydrid, DMAP, Pyridin, 25°C, 14 h. C^{Bz} = Benzoyl-geschütztes Cytosin, TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl, TBDPS = *tert*-Butyldiphenylsilyl, DMTr = 4,4'-Dimethoxytrityl, DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, LCAA-CPG = long chain alkyl amine modified controlled pore glass, EDC = 1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid Hydrochlorid. B) Ausschnitt aus der verwendeten Primer-Templat-Sequenz. C) Ergebnisse der Primerverlängerung mit jeweils dem kanonischen (X = A) und den nichtkanonischen (X = G, C oder T) Primerenden. Die jeweilige Templat-Nucleobase und der 4'-Substituent sind in der Abbildung angegeben. In den Spuren 1 und 6 wurde nur Primer eingesetzt.^[7]

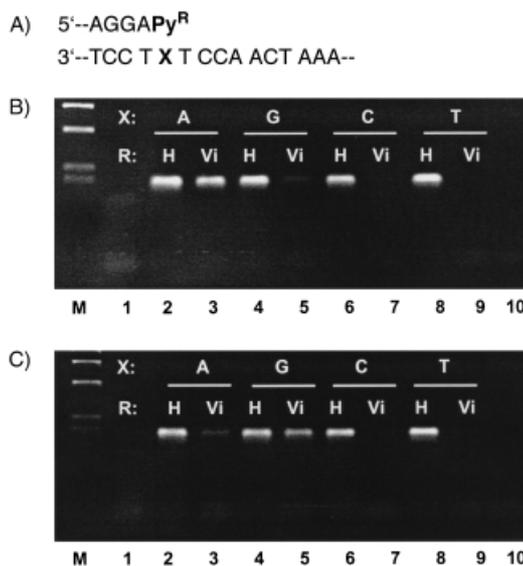


Abbildung 3. Effekte der modifizierten Primersonden auf die Selektivität der PCR-Amplifikation A) Ausschnitt aus den verwendeten Sequenzen. Py^R = Pyrimidinreste, die entweder ein 4'-Wasserstoffatom oder eine 4'-Vinyl-Modifikation tragen; X = entsprechende Nucleobase, wie in (B) und (C) beschrieben. B) Ergebnisse, die mit den 4'-vinylierten Thymidin-Primersonden erhalten wurden. C) Ergebnisse, die mit den 4'-vinylierten 2'-Desoxycytidin-Primersonden erhalten wurden. M = Längenmarker; Spuren 1 und 10: Experimente, die ohne Templat durchgeführt wurden, jeweils mit dem unmodifizierten oder dem 4'-vinylierten Primer.^[7]

von unmodifizierten Primern nur zu einer sehr geringen Diskriminierung zwischen korrekt- und fehlgepaarten Primer-Templat-Komplexen. Die Verwendung der am 3'-Ende einen 4'-vinylierten Tymidinrest tragenden Primer führt zu einer deutlich herabgesetzten DNA-Amplifikation im Falle der Fehlpaarung. Dieser Effekt ist signifikant bei einer Primer-Pyrimidin/Templat-Purin-Fehlpaarung (T^{vi}/G ; C^{vi}/A), jedoch deutlich ausgeprägter bei Pyrimidin/Pyrimidin-Fehlpaarungen. Für letztere war die Produktamplifikation unter den verwendeten Bedingungen unterhalb der Detektionsgrenze (Abbildung 3). Es wurde mehrfach gezeigt, dass die Diskriminierung von Pyrimidin/Purin-Fehlpaarungen am 3'-Ende (z. B. T/G) durch die PCR äußerst schwierig ist.^[4] Unsere Beobachtungen der signifikant erhöhten Selektivität bedingt durch 4'-modifizierte Primersonden bedeuten einen deutlichen Fortschritt zum Erreichen dieser Diskriminierung.

Um weitere detaillierte quantitative Erkenntnisse über diesen Prozess zu erhalten, verwendeten wir in 5'-Position radioaktiv markierte Primer und analysierten den Anteil an amplifiziertem Produkt nach jedem Zyklus.^[7] Die erhaltenen Ergebnisse zeigen die Effekte der modifizierten Primersonden auf die Erhöhung der Selektivität der PCR-Amplifikation (Abbildung 4). Im Fall der korrekten Paarung werden die 4'-vinylierten Primerenden verlängert, wenn auch mit einer etwas geringeren Effizienz als die unmodifizierten Primer.

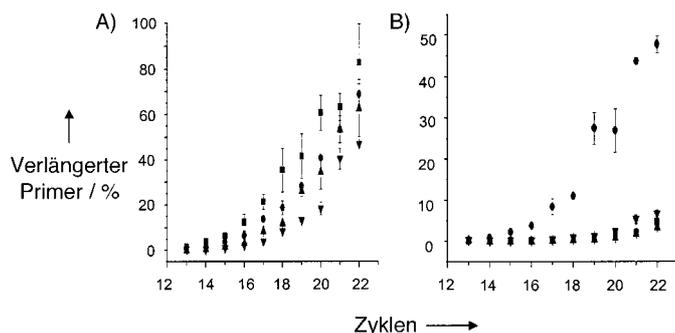


Abbildung 4. Quantifizierung der PCR-Produkte. Die Ergebnisse wurden unter den zu Abbildung 3 identischen Bedingungen durch Verwendung $5'$ - ^{32}P -markierter Primer erhalten. Jedem Zyklus wurden Proben entnommen und durch denaturierende PAGE- und Phosphorimager-Technologie analysiert. Der prozentuale Anteil des Produktes relativ zur Gesamtradioaktivität einer Spur wurde gegen die Zahl der Zyklen aufgetragen. Die Fehlerbalken ergeben sich aus mehrfach durchgeführten Experimenten. A) Ergebnisse aus den Experimenten mit nichtmodifizierten Thymidinresten am 3'-Ende des Primers. B) Ergebnisse aus den Experimenten mit Primern, deren 3'-Ende einen 4'-vinylierten Tymidinrest trägt. Die jeweils verwendeten Primer/Templat-Duplexe sind durch die folgenden Symbole verdeutlicht: ● T^R/A , ▼ T^R/G , ▲ T^R/C , ■ T^R/T .^[7]

Einzelne Fehlpaarungen am Primerende verhindern jedoch deutlich die Amplifikation im Fall der 4'-modifizierten Sonden im Vergleich zu nichtmodifizierten Primern. Dies führt zu einer deutlich selektiveren PCR-Amplifikation in Bezug auf Einzelbasenmutationen gegenüber dem Primerende.

Wir haben hier über den Effekt von 4'-modifizierten Primersonden auf die Fehlpaarungsdiskriminierung in der allelspezifischen PCR-Amplifikation berichtet. In allen untersuchten Fehlpaarungen konnten wir zeigen, dass es im

Vergleich zu nicht modifizierten Primern durch Verwendung 4'-vinylierter Primer und Vent⁻-DNA-Polymerase zu einer signifikant erhöhten Genauigkeit der Amplifikation kommt. Diese Untersuchungen zeigen, dass durch kleine chemische DNA-Modifikationen ausgeprägte Wirkungen auf die enzymatische Reaktion erreicht werden können, die mit nicht-modifizierten Substraten nur schwer zugänglich sind. In Anbetracht der aktuellen Entwicklungen bei der Anwendung der quantitativen Echtzeit-PCR zur Erkennung von Nucleotidvariationen,^[11] sollten diese Beobachtungen einen großen Einfluss auf die Entwicklung robuster und verlässlicher Methoden haben.

Eingegangen am 15. Juli 2002 [Z19731]

- [1] Beispiele: a) A. D. Ross, *Nature* **2000**, *405*, 857–865; b) J. J. McCarthy, R. Hilfiker, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 505–508; c) W. E. Evans, M. V. Relling, *Science* **1999**, *286*, 487–491; d) P. W. Kleyn, E. S. Vesell, *Science* **1998**, *281*, 1820–1821.
- [2] Beispiele: a) M. M. Shi, *Clin. Chem.* **2001**, *47*, 164–172; b) I. G. Gut, *Hum. Mutat.* **2001**, *17*, 475–492; c) M. Chicurel, *Nature* **2001**, *412*, 580–582; d) P. Y. Kwok, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2001**, *2*, 235–258.
- [3] D. Y. Wu, L. Ugozzoli, B. K. Pal, R. B. Wallace, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 2757–2760.
- [4] Als Beispiel: a) Z. Guo, Q. Liu, L. M. Smith, *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 331–335; b) Y. Ishikawa, K. Tokunaga, K. Kashiwase, T. Akaza, K. Tadokoro, T. Juji, *Hum. Immunol.* **1995**, *42*, 315–318; c) P. R. Wenham, C. R. Newton, W. H. Price, *Clin. Chem.* **1991**, *37*, 241–244; d) C. R. Newton, A. Graham, L. E. Heptinstall, S. J. Powell, C. Summers, N. Kalsheker, J. C. Smith, A. F. Markham, *Nucleic Acids Res.* **1989**, *17*, 2503–2516.
- [5] a) D. Summerer, A. Marx, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 3806–3808; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3693–3695; b) D. Summerer, A. Marx, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 910–911; c) M. Strerath, D. Summerer, A. Marx, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 578–580.
- [6] E. T. Kool, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 191–219.
- [7] Experimentelles und verwendete DNA-Sequenzen sind in den Hintergrundinformationen aufgeführt.
- [8] Alle hier beschriebenen Experimente mit DNA-Polymerasen wurden im Sequenzzusammenhang der sauren humanen Ceramidase unter Verwendung der beschriebenen Mutation an A107 durchgeführt. Siehe: J. Bär, T. Linke, K. Ferlinz, U. Neumann, E. H. Schuchman, K. Sandhoff, *Hum. Mutat.* **2001**, *17*, 199–209.
- [9] N. Nomura, S. Shuto, M. Tanaka, T. Sasaki, S. Mori, S. Shigata, A. Matsuda, *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2901–2908.
- [10] R. T. Pon in *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* (Hrsg.: S. L. Beaucage, D. E. Bergstrom, G. D. Glick, R. A. Jones), Wiley, **2000**, Kap. 3.2.1–3.2.23.
- [11] *Rapid Cycle Real-Time PCR* (Hrsg.: S. Meuer, C. Wittwer, K. Nakagawara), Springer, Berlin, **2001**.