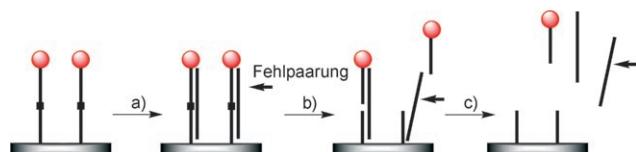


Selektiver DNA-Strangbruch an fester Phase – eine Methode zur Detektion von Basenfehlpaarungen**

Sandra Thoeni, Christoph J. Kressierer und Bernd Giese*

Die zurzeit intensive Erforschung genetisch bedingter Krankheiten, die durch einen Einzelnucleotidpolymorphismus (SNP) ausgelöst werden, bringt einen Bedarf an analytischen Methoden zur Detektion dieser SNPs mit sich. Diese sollen schnell, verlässlich und billig sein. Methoden, die in den vergangenen Jahren vorgestellt wurden, basieren auf der Polymerasekettenreaktion (PCR),^[1] auf enzymatischem Verdau^[2] und elektrochemischen Reaktionen^[3] sowie auf Techniken, bei denen die Doppelstrangbildung mit der Zielsequenz direkt eine Fluoreszenzänderung bewirkt.^[4] Wir präsentieren hier ein neues Konzept zur Detektion von Basenfehlpaarungen (mismatches), das auf der chemischen Spaltung von DNA an fester Phase beruht (Schema 1). Bei

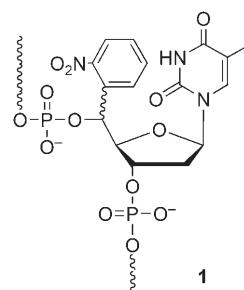


Schema 1. Konzept der Methode zur Detektion von Basenfehlpaarungen: Ein Oligonukleotid, das mit einer photolabilen Sollbruchstelle in der Strangmitte (schwarze Quadrate) und einer Markierung am Strangende (rote Kreise) modifiziert ist, wird an einer Festphase angebracht. Nach Hybridisierung mit der Zielsequenz (a) und photolytischer Spaltung des DNA-Strangs (b) verbleibt die Markierung entweder an der Festphase (bei korrekter Basenpaarung) oder wird freigesetzt (bei Basenfehlpaarung). c) Eine anschließende Wärmebehandlung setzt die Markierung quantitativ frei.

dieser Methode ist ein einzelner DNA-Strang, der eine Sollbruchstelle an der Strangmitte und einen Detektionsmarker am 5'-Ende enthält, über das 3'-Ende an eine Festphase angebracht. Der DNA-Strang bildet mit dem Zieloligonukleotid einen Doppelstrang. Bei Bestrahlung wird der DNA-Strang gespalten, und falls sich im Doppelstrang eine Basenfehlpaarung befindet, wird das Fragment mit der Markierung freigesetzt. Der höhere Schmelzpunkt im Fall korrekter Basenpaarung („matched case“) verhindert die Dehybridisierung des Doppelstrangs.

Als Sollbruchstelle wird das modifizierte Nucleotid 5'-o-Nitrophenylthymidin (**1**, **T***; Schema 2) in die DNA einge-

baut. Dieses bildet mit Adenosin selektiv Basenpaare und wird bei Bestrahlung (360 nm) in Lösung quantitativ gespalten, wodurch auch der gesamte DNA-Strang gespalten wird.^[5]



Schema 2. Das photolytisch spaltbare, modifizierte Nucleotid **1**.

Zum Einbau von **1** wurde die Phosphoramidit-Methode verwendet, und das resultierende modifizierte 21mer **2** wurde an Agarose immobilisiert (Bildung von **3**; Schema 3).^[6] Als Markierung verwendeten wir Dispersrot 1 (DR1).^[7] Nach der Bestrahlung (10°C, 10 min, $\lambda = 360$ nm) konnten wir unmittelbar eine Farbänderung der Festphase beobachten. Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurde das markierte Fragment **4**, das sich nach der Bestrahlung in Lösung befand, durch HPLC-Analyse detektiert. Im Festphasensystem verbleibendes markiertes Fragment **4** wurde nach der Bestrahlung durch Erwärmen quantitativ freigesetzt (Schema 3 und *Experimentelles*).^[8]

Durch Bestrahlung der immobilisierten Einzelstränge **3** wurden 98 % des Photolyseprodukts **4** freigesetzt, und die Festphase entfärbte sich. Dies belegt, dass der modifizierte Strang nicht nur in Lösung^[5] sondern auch an Agarose quantitativ gespalten wird. Das Ergebnis ist in Einklang mit früheren Photolyseexperimenten mit Agarose als fester Phase.^[9]

Bei Zugabe eines geringen Überschusses des Gegenstrangs zur modifizierten Festphase **3** wurde eine quantitative Doppelstrangbildung beobachtet. Die Doppelstrangbildung war auch dann quantitativ, wenn der Gegenstrang ein oder zwei Fehlpaarungen enthielt (*Experimentelles*). Im Unterschied zu den Einzelstrangexperimenten wurde nach Bestrahlung des korrekt gepaarten Doppelstrangs bei 10°C nur eine geringe Menge des 10mers **4** in der Lösung detektiert (15 %), und die Festphase blieb rot. Eine anschließende Wärmebehandlung setzte den abgespaltenen Strang **4** quantitativ frei, wobei sich die Festphase entfärbte.^[10] Ein ganz anderes Verhalten wurde beobachtet, wenn der Gegenstrang Fehlstellen enthielt. Durch Bestrahlung von Strängen mit zwei Fehlstellen bei 10°C wurden zwischen 70 und 98 % des 10mers **4** in die Lösung freigesetzt (Tabelle 1).

[*] Dr. S. Thoeni, Dr. C. J. Kressierer, Prof. Dr. B. Giese

Departement Chemie

Universität Basel

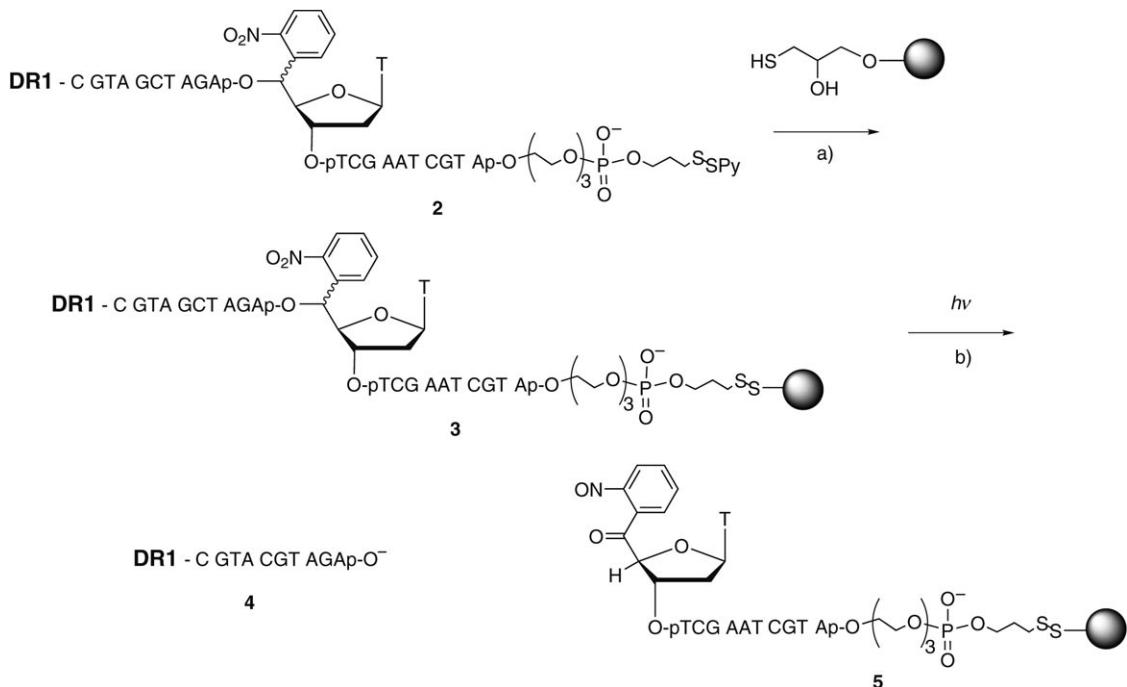
St. Johanns-Ring 19, 4056 Basel (Schweiz)

Fax: (+ 41) 61-267-1105

E-Mail: bernd.giese@unibas.ch

Homepage: <http://www.chemie.unibas.ch/~giese/index.html>

[**] Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds (NCCR Nanoscale Science) unterstützt.



Schema 3. a) Immobilisierung des modifizierten Oligonukleotids **2** an Agarose (1 h, pH 4.4, 35 °C); b) Photolyse des Einzelstrangs **3** (10 min, pH 7.0, $\lambda = 360$ nm, 10 °C). Py = 2-Pyridyl.

Tabelle 1: Ergebnisse für Bestrahlungen von Doppelsträngen mit zwei Fehlpaarungen zwischen dem immobilisierten Oligonukleotid **3** und den Gegensträngen **6–12**.

	DR1-CGTAGCTAGAT*TCGAATCGTA ^[a]	4 [%] ^[b]
6	3'-GCATCGAGCTA AGATTAGCAT	78
7	3'-GCATCGAT G TA AGATTAGCAT	85
8	3'-GCATCGAAGTA AGCTTAGCAT	94
9	3'-GCATCGAT G CA AGCTTAGCAT	85
10	3'-ACATCGAT G TA AGCTTAGCAT	89
11	3'-GCATCGAT G TA AGCT C AGCAT	70
12	3'-TCATCGATCTA AGCTTAGCAG	98

[a] Immobilisierter Einzelstrang **3**, der mit den Gegensträngen **6–12** hybridisiert; Mutationen in fetter Schrift. [b] Ausbeute des Photolyseprodukts **4** in der Lösung bei 10 °C.

Demnach wurden die Schmelzpunkte des photolytisch gespaltenen Systems durch die beiden Fehlstellen soweit herabgesetzt, dass das markierte Fragment **4** in die Lösung freigesetzt wurde. Experimente in homogener Lösung bestätigten diesen Befund. Der Schmelzpunkt eines Doppelstranges bestehend aus der Sequenz **2** (mit T anstelle von T*) und einem komplementären 21mer-Gegenstrang betrug 62.6 °C (10 mM KH₂PO₄, 0.5 M NaCl, pH 7.0). Die Hybridisierung des 21mers mit zwei passenden 10mer-Fragmenten, die die Situation nach der Bestrahlung imitieren sollten, setzte den Schmelzpunkt auf 32.2 °C herab. Wurden in dieses System jedoch eine oder zwei Fehlstellen eingeführt, konnte kein Schmelzpunkt über 15 °C beobachtet werden.

Wie die Ergebnisse in Tabelle 2 zeigen, können auch einzelne Fehlstellen (Einzelnukleotidpolymorphismen, SNPs) detektiert werden (Stränge **13–22**, 45–86 % freigesetztes **4** bei 10 °C). Nur wenn sich der SNP neben dem gegenüber T* liegenden Adenosin befand, fiel die Ausbeute an **4** auf 17 bzw.

Tabelle 2: Ergebnisse für Bestrahlungen von Doppelsträngen mit einer Fehlpaarung zwischen dem immobilisierten Oligonukleotid **3** und den Gegensträngen **13–25**.

	DR1-CGTAGCTAGAT*TCGAATCGTA ^[a]	4 [%] ^[b]
13	3'-GCATCGATCTA AGCT C AGCAT	45
14	3'-CCATCGACCTA AGCTTAGCAT	49
15	3'-GCATCGAACTA AGCTTAGCAT	50
16	3'-GCATCGATCTA AGTTAGCAT	51
17	3'-GCATCTATCTA AGCTTAGCAT	68
18	3'-ACATCGATCTA AGCTTAGCAT	70
19	3'-GCATCGATCTA AGGTTAGCAT	74
20	3'-GCATCGATCTA AGATTAGCAT	79
21	3'-GCATCTATCTA AGCTTAGCAT	82
22	3'-GCATCGATCTA AGCTTACCAT	86
23	3'-GCATCGATCTA AGCTTAGCAT	17
24	3'-GCATCGATCTA TGCTTAGCAT	30
25	3'-GCATCGATCTA AGCTTAGCAG	31

[a] Immobilisierter Einzelstrang **3**, der mit den Gegensträngen **13–25** hybridisiert; Mutationen in fetter Schrift. [b] Ausbeute des Photolyseprodukts **4** in der Lösung bei 10 °C.

30 % (Stränge **23** und **24**); allerdings blieb die Effizienz der photolytischen Spaltung durch die Gegenwart dieser SNPs unbeeinträchtigt. Vermutlich beeinflussen SNPs am Ende eines DNA-Strangs den Schmelzpunkt nicht stark. Diese Vermutung ist in Einklang mit Ergebnissen von Richert et al. in flüssiger Phase.^[11] Die Ausbeute an freigesetztem **4** war ebenfalls gering, wenn sich die Fehlstelle am „unteren“ Ende (5'-Ende) der Zielsequenz befand (Strang **25**). Dagegen war die Ausbeute an Photolysefragment **4** hoch (70 %, Strang **18**), wenn sich der SNP neben der Markierung DR1 (am „oberen“ Ende der Zielsequenz) befand. Dies wird durch die π -Wechselwirkung der endständigen aromatischen Markierung mit der endständigen DNA-Base begründet.^[11]

Zur Anwendung dieser Methode zur Detektion von medizinisch relevanten SNPs, die die Anlage zur Ausbildung von Krankheiten haben, müssen immobilisierte Stränge verwendet werden, bei denen sich die entsprechenden Mutationen mindestens zwei Basenpaare entfernt von der Sollbruchstelle und dem Abstandhalter befinden. Der Farbwechsel der Festphase zeigt das Vorliegen eines SNP an, und die Lösung sollte analysiert werden. Im besten Fall generiert ein spezifischer SNP eine typische Ausbeute an freigesetztem markiertem Fragment. Dabei zeigt sich der Vorteil dieser einfachen und raschen Methode: Ein qualitativer Befund, der aus dem Farbwechsel der Festphase resultiert, kann durch die Analyse der Lösung verlässlich quantifiziert werden, da durch anschließende Wärmebehandlung auf der Festphase verbleibendes Fragment quantitativ freigesetzt werden kann. Nicht nur die Sequenz, sondern auch die Länge des Doppelstrangs spielt hier eine Rolle. Die optimale Länge eines Doppelstrangs mit der immobilisierten Sequenz **3** war ein 21mer. Wurde der Gegenstrang auf ein 19mer verkürzt (Verkürzung um ein Nucleotid pro Ende), wurden schon im Fall korrekter Basenpaarung 65 % des Fragments **4** nach der Bestrahlung bei 10 °C freigesetzt. Überhängende Enden an der Zielsequenz hatten jedoch keinen Einfluss auf die Effizienz unserer Analysemethode.

Ein neues Konzept zur Detektion von Einzelnucleotidpolymorphismen wurde entwickelt. Hierbei wird die Markierung an der Festphase angebracht, und die unmarkierte Zielsequenz muss nicht chemisch modifiziert werden. Dieses neue Testsystem ermöglicht die rasche Detektion von SNPs, da die Hybridisierung nur 2 h und die Bestrahlung nur 10 min dauert und eine einfache Filtration direkt das Resultat liefert (Farbänderung der Festphase).

Experimentelles

Synthese und Reinigung der DNA: Die DNA wurde auf einem DNA-Synthesizer synthetisiert (PerSeptive Biosystems, Expedite). Kommerziell erhältliche Modifikationen (Phosphoramidit spacer9, modifizierte Festphase; Eurogentec) wurden wie vom Hersteller angegeben in die DNA eingebaut. Das modifizierte Nucleotid **1** wurde wie in der Literatur^[5] beschrieben eingebaut. DR1 wurde in das entsprechende Phosphoramidit überführt und an die DNA gekuppelt (15 min). Nach Entschützen, Reinigung durch denaturierende Elektrophorese (PAGE; 20 %, 130 V, 15 h) und Entsalzen der Stränge über NAP-Säulen wurden die Disulfide der Oligonucleotide mit einer Pufferlösung (Reduktionspuffer: 100 mM Dithiothreitol (DTT), 40 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), 0,5 M NaCl, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), pH 8,3) reduziert (30 min, 30 °C). Anschließend wurde die Lösung mit Essigsäureethylester extrahiert, und die Oligonucleotide wurden mit 2,2'-Dithiobipyridin inkubiert (30 min, 30 °C); anschließend wurde ein zweites Mal mit Essigsäureethylester extrahiert. Zur abschließenden Reinigung von **2** wurde eine RP-HPLC eingesetzt. Unmodifizierte Oligonucleotide (Microsynth AG) wurden nach Reinigung mit RP-HPLC eingesetzt. Alle Oligonucleotide wurden mit MALDI-TOF-MS charakterisiert.

Immobilisierung: Kommerziell erhältliche 2-Pyridyldisulfid-aktivierte Agarose (Pharmacia Biotech AB, Sepharose 6B) wurde zunächst durch den Reduktionspuffer reduziert (30 min, 30 °C). Danach wurde eine Lösung des modifizierten Oligonucleotids **2** in Immobilisierungspuffer zugesetzt (370 mM, NaOAc, 0,5 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 4,4, 1 h, 35 °C). Überschüssiges Thiol wurde desaktiviert

(Cap-Lösung I: 60 mM *S*-(2-Thiopyridyl)-2-mercaptoethanol, 40 mM MES, 40 mM MgCl₂, 0,5 M NaCl, 1 mM EDTA; Cap-Lösung II: 200 mM *S*-(2-Thiopyridyl)-2-mercaptoethanol in EtOH). Die Oberflächenbeladung wurde mit RP-HPLC bestimmt (als interner Standard wurde ein unmodifiziertes Oligonucleotid verwendet).

Hybridisierung: Lösungen der Gegenstränge (1,2–2,0 Äquiv. in Phosphatpuffer (10 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7,0) wurden zum immobilisierten Strang gegeben. Die Mischung wurde unter Röhren auf 85 °C erwärmt und während 1,5 h auf 35 °C abgekühlt. In allen Fällen waren die mit RP-HPLC bestimmten Ausbeuten praktisch quantitativ (als interner Standard diente ein Oligonucleotid).

SNP-Detektion durch Bestrahlung: Gepufferte Lösungen der Doppelstränge wurden unter Röhren mit einer Quecksilberbogenlampe ($\lambda = 360$ nm, 500 W; Osram) bestrahlt (10 °C, 10 min, pH 7,0). Die Lösungen wurden filtriert, und der Farbwechsel der Festphase wurde direkt beobachtet. Um die Effekte zu quantifizieren, wurden die Lösungen mit RP-HPLC unter Verwendung eines externen Standards analysiert. Die Lösungen konnten auch mit UV/Vis-Spektroskopie analysiert werden. Zugabe von weiterem Puffer zur Festphase, Erwärmen auf 85 °C und Filtration nach 3 min setzte verbleibendes markiertes Fragment **4** in die Lösung frei.

Eingegangen am 31. Juli 2006,
veränderte Fassung am 24. Oktober 2006
Online veröffentlicht am 5. Februar 2007

Stichwörter: Analyse Methoden · Basenfehlpaarung · DNA · Einzelnucleotidpolymorphismen · Festphasenmethoden

- [1] a) R. T. Ranasinghe, T. Brown, *Chem. Commun.* **2005**, 44, 5487; b) A. Marx, M. Strerath, *Angew. Chem.* **2005**, 117, 8052; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 7842.
- [2] a) M. Komiya, S. Ye, X. Liang, Y. Yamamoto, J.-M. Zhou, H. Aburatani, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 3758; b) M. Lu, J. G. Hall, M. R. Shortreed, L. Wang, W. T. Berggren, P. W. Stevens, D. M. Kelso, V. Lyamichev, B. Neri, J. L. Skinner, L. M. Smith, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 7924.
- [3] a) C. E. Immoos, S. J. Lee, M. W. Grinstaff, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 10814; b) J. Rahm, C. M. Lieber, *Nano Lett.* **2003**, 3, 51.
- [4] a) H. A. Ho, K. Doré, M. Boissinot, M. G. Bergeron, R. M. Tanguay, D. Boudreau, M. Leclerc, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12673; b) A. G. Frutos, S. Pal, M. Quesada, J. Lahiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2396.
- [5] A. Dussy, C. Meyer, E. Quennet, T. A. Bickle, B. Giese, A. Marx, *Chem. Biochem.* **2002**, 3, 54.
- [6] a) A. Luther, R. Brandsch, G. von Kiedrowski, *Nature* **1998**, 396, 245; b) J. R. Lorsch, J. W. Szostak, *Nature* **1994**, 371, 31.
- [7] P. Krattiger, C. McCarthy, A. Pfaltz, H. Wennemers, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 1763; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 1722.
- [8] Mit DR1 als Marker konnten μ M-Mengen detektiert werden, was genügte, um das Funktionieren des Konzepts zu belegen. Für praktische Anwendungen müssen wahrscheinlich Fluoreszenzmarker verwendet werden, die weitaus empfindlicher sind.
- [9] K. J. Olejnik, E. Krzynanska-Olejnik, K. J. Rothschild, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 361.
- [10] Die quantitative Freisetzung von verbleibendem Photolyseprodukt **4** nach der Wärmebehandlung (3 min bei 85 °C) bewies, dass eine mögliche photoinduzierte Vernetzung, die die Menge an freigesetztem 10mer **4** reduzieren würde, unter den hier verwendeten Bedingungen nicht stattfand.
- [11] Z. Dogan, R. Paulini, J. A. Rojas Stütz, S. Narayanan, C. Richter, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 4762.