

Genotypisierung – von genomischer DNA zum Genotyp in einem Schritt

Michael Strerath und Andreas Marx*

Stichwörter:

DNA · DNA-Erkennung · Einzelnucleotid-Polymorphismen · Genomik · Polymerasekettenreaktion

Nucleotidvariationen im menschlichen Genom, wie single-nucleotide polymorphisms (SNPs), sind mit wachsendem Interesse erforscht worden, seit klar wurde, dass es eine direkte Verbindung zwischen diesen Abweichungen und verschiedenen Krankheiten und Arzneimittelnebenwirkungen gibt. Für die tägliche Laborpraxis werden zur Untersuchung genomischer DNA Methoden benötigt, die Zeit, Arbeit und Kosten sparend sind. Diese Kriterien werden von so genannten Closed-Tube-Methoden erfüllt, die ohne Voramplifizierung direkt auf genomische DNA angewendet werden können.

1. Einleitung

In der Gesamtheit des menschlichen Genoms, bestehend aus ca. drei Milliarden Basenpaaren, unterscheiden sich einzelne Individuen in ungefähr 0.1 % ihrer Nucleotidsequenz.^[1,2] Am häufigsten unter diesen drei Millionen Nucleotidvariationen sind Einzelnucleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphisms), so genannte SNPs.^[3–5] Als SNPs sind solche Stellen im Genom definiert, an denen die seltenere Allelvariante bei mindestens 1 % der Bevölkerung vorkommt. Zwischen diesen Variationen und bestimmten Krankheiten kann ein direkter Zusammenhang bestehen, der in der Pharmakogenomik untersucht wird. Außerdem konnten unterschiedliche Arzneimittelverträglichkeiten bei Patienten direkt mit bestimmten SNPs in Verbindung gebracht werden.^[3,5,6] Dementsprechend befassen sich viele Forschungsprogramme mit dem Auffinden neuer SNPs sowie der Aufklärung ihres Zusammenhangs mit verschiedenen medizinisch relevanten Phänotypen. Bis heute konnten mithilfe vielfältiger Methoden 1.8 Millionen SNPs gefunden und charakterisiert werden. In einem ersten Schritt werden Methoden gebraucht, durch die unbekannte Nucleotidvariationen identifiziert werden können, um diese anschließend auf ihre medizinische Relevanz zu untersuchen. Sobald der

exakte Sequenzkontext bekannt ist, werden andere Methoden benötigt, die das Durchmustern von Bevölkerungsgruppen nach bekannten SNPs oder die Analyse von Individuen im Hinblick auf bestimmte SNP-Muster ermöglichen. Dafür sind Analyseme-

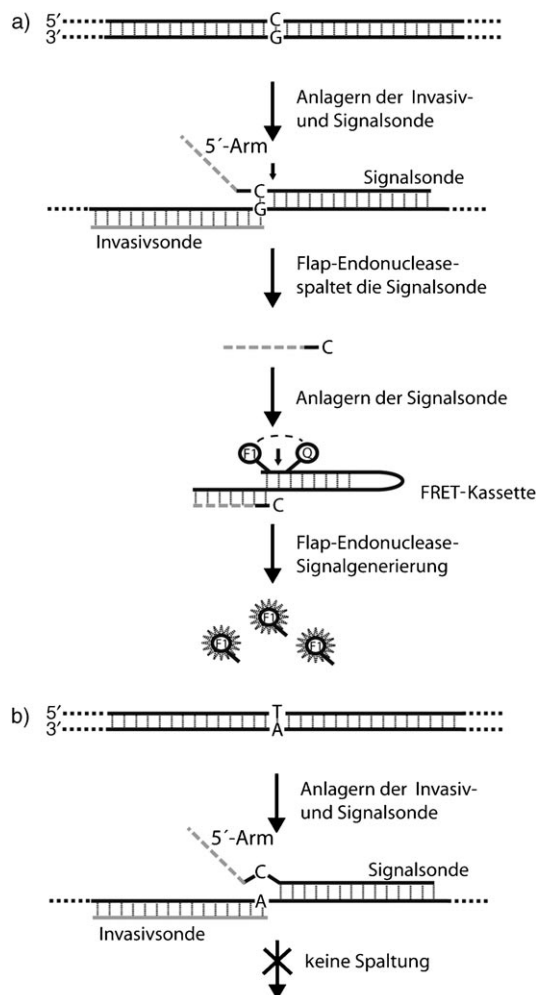
thoden notwendig, die eine Zeit, Arbeit und Kosten sparende Untersuchung von Nucleotidvariationen in der täglichen Laborpraxis ermöglichen.^[7–15] Die Zuverlässigkeit dieser Methoden ist entscheidend für weitere Fortschritte in der Pharmakogenetik, durch die zukünftig in bestimmten Fällen eine Therapie möglich sein könnte, die an die individuelle genetische Ausstattung des Patienten angepasst ist. Die Behandlung mit Wirkstoffen, die aufgrund der genetischen Besonderheiten des jeweiligen Patienten ineffektiv sind oder starke Nebenwirkungen verursachen, könnte so vermieden werden.

Heute sind viele Methoden zur SNP-Diagnostik bekannt, aber keine konnte sich bisher durchsetzen.^[8–15] Ein wichtiger Fortschritt wäre, die Zahl der benötigten Arbeitsschritte auf ein Minimum zu verringern. Die meisten bekannten Methoden erfordern eine Voramplifizierung der genomischen Zielsequenz durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) vor dem eigentlichen analytischen Detektierungsschritt. Diese Methoden bestehen also aus zwei oder mehr Arbeitsschritten.^[7–14] Erstrebenswert sind dagegen einstufige Methoden, für die keine Voramplifizierung erforderlich ist. Wir werden uns in diesem Kurzaufsatz auf die Beschreibung solcher Methoden beschränken. Es werden Verfahren behandelt, die die Amplifizierung mit der Analyse in einem geschlossenen Gefäß (closed tube) in einem einzigen Arbeitsschritt verbinden. Ferner beschränken wir uns auf Anwendungen, die die Eigenschaft zahlreicher Enzyme nutzen, bevorzugt kanonisch (nach der Watson-Crick-Regel) paarende DNA-Konstrukte zu prozessieren. Für einen generelleren Überblick über Methoden, die in der DNA-Diagnostik eingesetzt werden, möchten wir auf mehrere kürzlich veröffentlichte Übersichtsartikel verweisen.^[7–15]

[*] Dipl.-Chem. M. Strerath, Prof. Dr. A. Marx
Fachbereich Chemie
Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, M 726, 78457 Konstanz (Deutschland)
Fax: (+49) 7531-885-140
E-mail: Andreas.Marx@uni-konstanz.de

2. Sequenzspezifische invasive Spaltung von Oligonucleotidsonden: der Invader-Assay

Der Invader-Assay kann in zwei Reaktionen unterteilt werden:^[16,17] Zuerst werden zwei als „Signalsonde“ und „Invasivsonde“ bezeichnete Oligonucleotide gleichzeitig mit genomischer Ziel-DNA hybridisiert. Die Sequenzen beider Sonden sind so aufgebaut, dass sie eine charakteristische Struktur bilden, wenn sie an die Zielsequenz binden (siehe Schema 1 a).



Die Signalsonde besteht aus zwei Regionen: einer Region, die komplementär zur Zielsequenz ist, und der 5'-Arm-Region (flap), die nicht komplementär zur Zielsequenz und zur Invasivsonde ist. Die gebildete Struktur wird durch bestimmte 5'-3'-Nucleasen, z. B. die Flap-Endonuclease I von *Archaeoglobus fulgidus* oder die DNA-Polymerase von *Thermus aquaticus* (Taq), die eine 5'-3'-Exonucleaseaktivität trägt, erkannt. Die Signalsonde wird dann an der markierten Position gespalten und setzt ein Oligonucleotid frei,^[18] das aus der 5'-Arm-Region und einem Nucleotid aus der spezifischen Zielsequenzregion besteht. Bemerkenswert ist, dass die Spaltungsgeschwindigkeit durch die Invasivsonde signifikant erhöht wird.^[18,19] Für die Spaltung ist zudem entscheidend, dass die Signalsonde vollständig komplementär zur Zielsequenz an der Stelle des SNPs ist. Beim Invader-Assay basiert somit die Unterscheidung zwischen Einzelbasenvariationen auf der Fähigkeit des Enzyms, selektiv kanonische Komplexe aus Zielsequenz und Signalsonde zu spalten. Einzelbasenvariationen in der Zielregion, z. B. aufgrund eines SNPs, führen zu einem fehlgepaarten Komplex, der deutlich schlechter gespalten wird (Schema 1 b). Werden die Reaktionen bei erhöhten Temperaturen und mit einem Überschuss an Signalsonde durchgeführt, so kann das generierte Fluoreszenzsignal durch die Abdissoziation der geschnittenen Sonde von der Zielsequenz und das wiederholte Anlagern einer ungeschnittenen Signalsonde amplifiziert werden.^[19]

Durch einen nachgelagerten zweiten Reaktionsschritt kann das Signal noch weiter verstärkt werden. In diesem Schritt lagert sich der geschnittene Strang der Signalsonde an

Schema 1. Genotypisierung durch den Invader-Assay. Durch das Anlagern von zwei Oligonucleotidsonden (Signal- und Invasivsonde) wird an der zu untersuchenden Position eine Triplexstruktur gebildet. a) Im Fall des kanonischen Triplex wird die Signalsonde an der markierten Position durch eine Flap-Endonuclease geschnitten, und der 5'-Arm der Sonde wird frei. Der freie 5'-Arm dringt sequenzspezifisch in eine FRET-Kassette ein und katalysiert somit deren Restriktion durch die Flap-Endonuclease. Durch die Restriktion tritt eine räumliche Trennung von Fluorophor- (F) und Quencher (Q) ein, und ein Fluoreszenzsignal wird generiert. b) Wird aufgrund einer Einzelbasenvariation ein nicht perfekt kanonischer Triplex gebildet, verhindert dies eine Spaltung der Struktur. Daraus folgt, dass die Spaltung der Fluoreszenzresonanz-Energietransfer (FRET)-Kassette nicht katalysiert wird und das Fluoreszenzsignal weiter unterdrückt bleibt.



Michael Strerath studierte Chemie an der Universität Düsseldorf und fertigte im Jahr 2001 bei Stefan Kubik seine Diplomarbeit an. 2001 wechselte er an die Universität Bonn und später an die Universität Konstanz, wo er im Arbeitskreis von Andreas Marx seine Doktorarbeit anfertigte. Deren Thema waren chemische und genetische Ansätze zur Entwicklung effizienter Methoden für die Genomanalyse. Im August 2005 wechselte er zur DIREVO Biotech AG in Köln.



Andreas Marx studierte Chemie in Freiburg, Sussex und Bochum, wo er 1994 bei Peter Welzel sein Diplom erhielt. Im Anschluss promovierte er bei Bernd Giese an der Universität Basel. Nach einem Postdoktorat als EU/JSPS-Stipendiat bei Hisashi Yamamoto an der Universität Nagoya begann er 1999 seine unabhängigen Arbeiten auf dem Gebiet der chemischen Biologie der Nucleinsäuren an der Universität Bonn. Dort habilitierte er 2003 in den Fächern Organische Chemie und Biochemie bei Michael Famulok. Seit 2004 ist er Professor für Organische Chemie und Zelluläre Chemie an der Universität Konstanz.

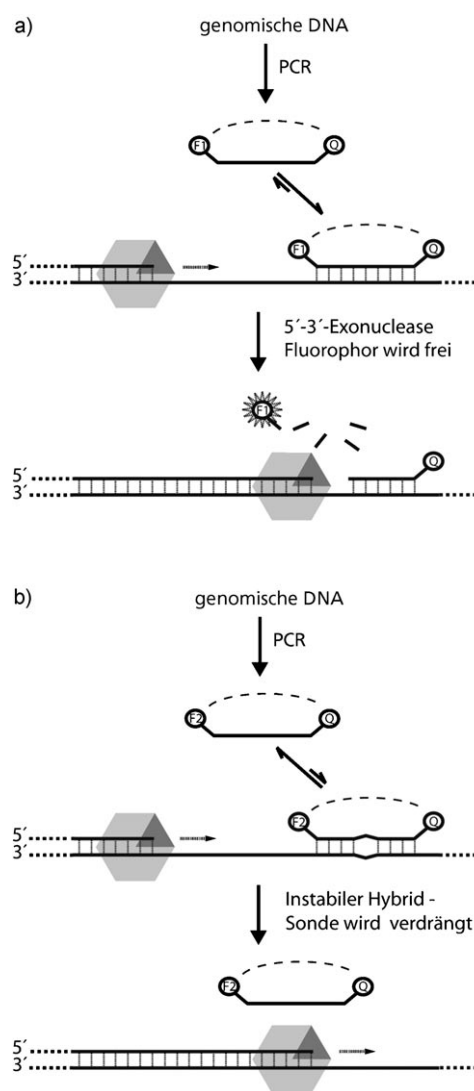
eine Fluoreszenzresonanz-Energietransfer(FRET)-Kassette an und dringt in eine kurze Haarnadelstruktur ein, die an ihrem 5'-Ende ein Fluorophor-Quencher-Paar trägt. Die Spaltung des Konstruktes an der markierten Position wird erneut durch die 5'-3'-Nucleasefunktion der oben beschriebenen Enzyme bewirkt. Die Spaltung setzt den Farbstoff frei und führt zur Generierung eines Fluoreszenzsignals durch die Trennung von Fluorophor und Quencher. Die gespaltene Signalsonde katalysiert also die Spaltung der FRET-Kassette und führt im zweiten Schritt des Invader-Assays zum Freiwerden des Fluorophors.^[20] In der Praxis werden beide Reaktionen im selben Reaktionsgefäß durchgeführt, und es wird innerhalb von vier Stunden eine 10^7 -fache Signalverstärkung beobachtet. Eine direkte SNP-Analyse kann von Proben mit 10–100 ng genomischer DNA durchgeführt werden.^[17]

3. Genotypisierung durch die 5'-3'-Exonucleaseaktivität von DNA-Polymerasen: Der TaqMan-Assay

Beim TaqMan-Assay wird die 5'-3'-Nucleasefunktion von DNA-Polymerase von *Thermus Aquaticus* genutzt.^[21] Die charakteristischen Schritte dieser Methode sind die DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase, teilweises Verdrängen des Doppelstranges und die Spaltung einer FRET-DNA-Sonde durch das Enzym. Durch die Spaltung werden Fluorophor und Quencher voneinander getrennt, wodurch ein Fluoreszenzsignal generiert wird (Schema 2).^[21–24]

Mehrere Faktoren ermöglichen es, zwischen unterschiedlichen Einzelnucleotidvariationen zu unterscheiden. So bilden komplementäre Sonden Duplexe mit der Zielregion, die deutlich stabiler als Duplexe sind, die Fehlpaarungen enthalten.^[22] Folglich können durch sorgfältige Abstimmung von Anlagerungstemperatur (Annealing-Temperatur) und Verlängerungstemperatur Bedingungen geschaffen werden, unter denen bei der PCR die Bildung der perfekt gepaarten Duplexe gegenüber der einfach fehlgepaarter Duplexe bevorzugt ist. Die Duplexbildung ist für die 5'-3'-Nucleasefunktion der DNA-Polymerase zwingend notwendig. Erkennung und Spaltung durch das Enzym finden am gegabelten Ende eines Duplex statt. Dafür müssen 1–3 Nucleotide am 5'-Ende der Sonde abgelöst werden, bis die Sonde gespalten werden kann. Fehlgepaarte Duplexe werden durch das Ablösen weiter destabilisiert, und eine Dissoziation der Sonde ist die Folge, was ihre Spaltung und damit die Generierung des Fluoreszenzsignals verhindert. Ein wesentlicher Parameter für den Erfolg dieser Methode ist die Gestalt der Sonde: Sie muss lang genug sein, um bei der Verlängerungstemperatur in der PCR (ca. 70 °C) einen stabilen Duplex zu bilden – sie muss aber auch kurz genug sein, um eine ausreichende Diskriminierung der Sondenspaltung bei Fehlpaarungen, bedingt durch Einzelbasenvariation in der Zielregion, zu bewirken.

Es wurde gezeigt, dass Sonden, die mit einem Binder für die kleine Furche der DNA konjugiert sind, eine höhere Bindungsaffinität für vollständig komplementäre Sequenzen haben und immer noch durch das Enzym prozessiert werden können (Abbildung 1).^[22,25,26] Dies ermöglicht die Verwen-



Schema 2. Der TaqMan-Assay. a) Der Sequenzraum der Zielregion wird in einer PCR durch Taq-DNA-Polymerase, die eine 5'-3'-Nucleaseaktivität aufweist, amplifiziert. Die Sondensequenz ist komplementär zu einer Allelvariante. b) Im Fall eines anderen Allels bildet sich ein fehlgepaarter Komplex. Der perfekt kanonisch gepaarte Hybrid (a) ist bei den Versuchstemperaturen thermodynamisch stabiler als der einfach fehlgepaarte Hybrid (b). Wenn die Strangverlängerung voranschreitet, spaltet die 5'-3'-Nucleaseaktivität der Taq-DNA-Polymerase kanonisch gebundene Sonden und setzt einen Fluorophor frei, woraus ein Fluoreszenzsignal resultiert. Im Fall des nicht kanonischen Sonde-Zielsequenz-Komplexes wird infolge der Verdrängung eines Teils der Sonde durch die DNA-Polymerase die thermodynamische Stabilität weiter reduziert, und die Sonde dissoziiert ab. Dadurch wird eine Spaltung der Sonde verhindert, und es wird kein Fluoreszenzsignal erhalten.

dung verkürzter fluorogener Proben, die eine höhere Sequenzspezifität aufweisen.

Die ganze Reaktion findet in einem geschlossenen Gefäß statt und erfordert keine weitere Prozessierung nach der PCR. Außerdem kann die Analyse in Echtzeit durchgeführt und verfolgt werden. Diese Methode ist sehr empfindlich und erfordert nur kleinste Mengen genomischer DNA (2–20 ng).^[22]

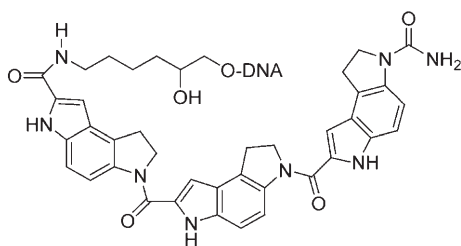
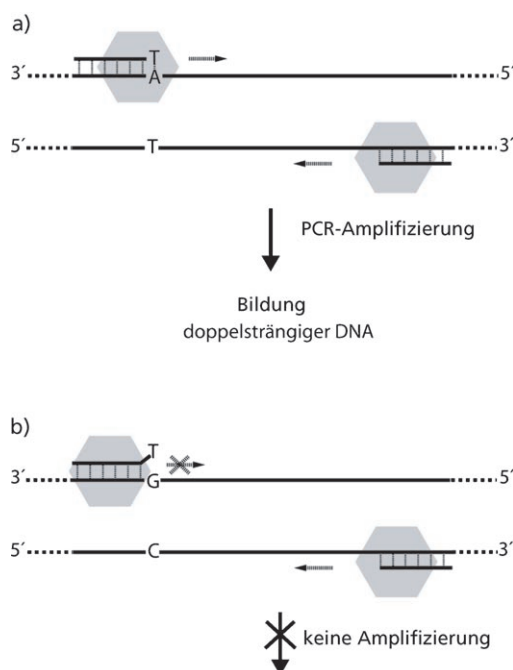


Abbildung 1. Struktur des Konjugats aus DNA und einem Binder für die kleine DNA-Furche.

4. Genotypisierung unter Verwendung der DNA-Polymerase-Selektivität: allelspezifische Amplifizierung

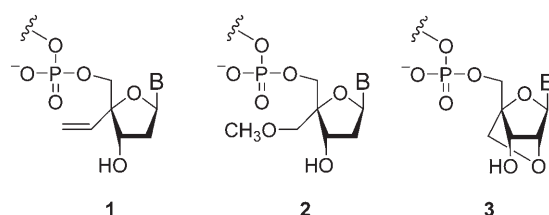
Ein konzeptionell sehr einfacher Ansatz zur Identifizierung von Allelvarianten ist in der allelspezifischen Amplifizierung (ASA) verwirklicht. Die ASA bestimmt Nucleotidvariationen durch das Auftreten oder Ausbleiben von DNA-Produkt nach der PCR-Amplifizierung. Das Prinzip der ASA basiert auf der Bildung von kanonischen oder nicht kanonischen Primer-Templat-Komplexen am Ende von allelspezifischen Primersonden. An einem korrekt gepaarten 3'-Primerende kann die Amplifizierung durch eine DNA-Polymerase stattfinden, bei einem fehlgepaarten Primerende hingegen sollte die Verlängerung gehemmt sein (Schema 3).^[27–34]



Schema 3. Allelspezifische Amplifizierung. Das PCR-Primerpaar ist so entworfen, dass ein Ausschnitt der interessierenden genomischen DNA amplifiziert wird. Ein 3'-Ende eines der Primer ist so positioniert, dass es der SNP-Position gegenüberliegt. Daraus resultiert ein kanonischer gepaarter (a) oder ein einfach fehlgepaarter Komplex (b) je nach Art des Nucleotides in der Zielsequenz. Liegt ein kanonischer Hybrid vor, kann die DNA-Polymerase den Primer verlängern. Daraus ergibt sich eine exponentielle Amplifizierung. Die Verlängerung des fehlgepaarten Primers und damit die Bildung eines PCR-Produktes sind gehemmt.

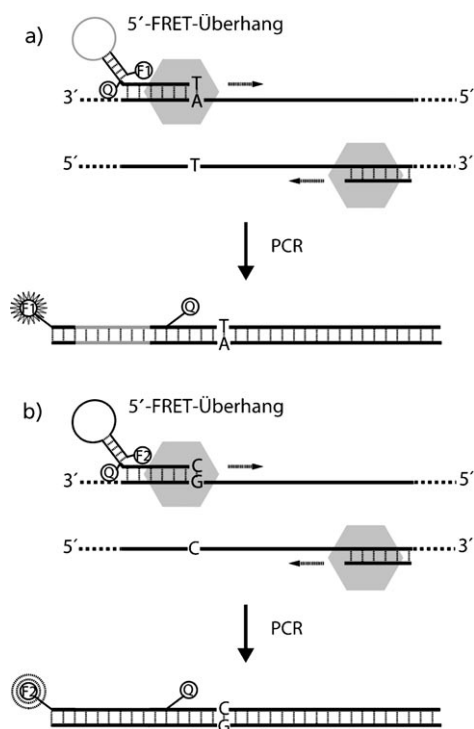
Im Idealfall sollte die Verlängerung eines fehlgepaarten Primerendes durch die DNA-Polymerase diskriminiert werden. Im Fall einer Fehlpaarung ist die exponentielle Produktbildung in der PCR verhindert, im Unterschied zu dem Fall, in dem beide Primer komplementär zur Zielsequenz sind. Die Produktbildung kann durch Gelchromatographie analysiert werden, aber auch eine Verfolgung in Echtzeit ist möglich, wenn ein spezifisch an doppelsträngige DNA bindender Fluoreszenzfarbstoff (z.B. SybrGreen I) verwendet wird, der nach einer sequenzunabhängigen Bindung an DNA fluoresziert.^[35] Der Hauptvorteil dieser Methode ist, dass keine teuren Fluoreszenzsonden verwendet werden müssen. Da aber nur die Zunahme an doppelsträngigen PCR-Produkten ohne jegliche Sequenzspezifität beobachtet wird, werden Produkte aus unspezifischen Amplifizierungen, wie Primerdimere, falsch-positiv detektiert. Um die Detektierung von Fehlamplifikaten zu verhindern, werden sequenzspezifische FRET-Sonden, z.B. Signalmoleküle (molecular beacons), eingesetzt. Diese binden sequenzspezifisch an das gewollte Amplifikat und verknüpfen somit die Signalerzeugung mit der Vervielfachung des interessierenden Sequenzraumes.^[36] Oft erfordert diese Methode aber eine aufwändige zeit- und kostenintensive Optimierung der Reaktionsbedingungen. Faktoren, die sich positiv auf die Selektivität und Zuverlässigkeit der allelspezifischen-PCR auswirken, sollten auch einen starken Einfluss auf die Zuverlässigkeit und Robustheit der direkten SNP-Detektierung durch ASA haben.

Kürzlich wurde berichtet, dass die Genauigkeit der allelspezifischen PCR durch Einführung chemisch modifizierter Primersonden signifikant erhöht werden kann.^[37–41] Eine deutlich erhöhte Amplifizierungsgenauigkeit wird bei Verwendung von Primersonden erreicht, die kleine 4'-C-Modifikationen wie Vinyl- (1) oder CH_3OCH_2 -Gruppen (2) an ihrem 3'-Ende tragen.^[38] Für die Amplifizierung wird eine kommerziell erhältliche 3'-5'-Exonuclease-defiziente Variante der DNA-Polymerase von *Thermococcus litoralis* (Vent(exo-)-DNA-Polymerase) verwendet (Schema 4).^[37–39]



Schema 4. Strukturen von modifizierten Primersträngen, die in der allelspezifischen PCR eingesetzt werden. B = Nucleobase.

Wie gezeigt wurde, gelingt die Identifizierung von Einzelnucleotidvariationen in Genen in Echtzeit durch die Detektion mithilfe von SybrGreen I. Dadurch wird die Echtzeit-PCR zu einem schnellen und zuverlässigen Werkzeug für die Identifizierung und Analyse von Allelvariationen. Interessanterweise haben Bausteine mit einer 2'-O-4'-C-Methylen-Brücke (3), die am 3'-Ende der Primersonde angebracht sind, ähnliche Eigenschaften (Schema 4).^[42]

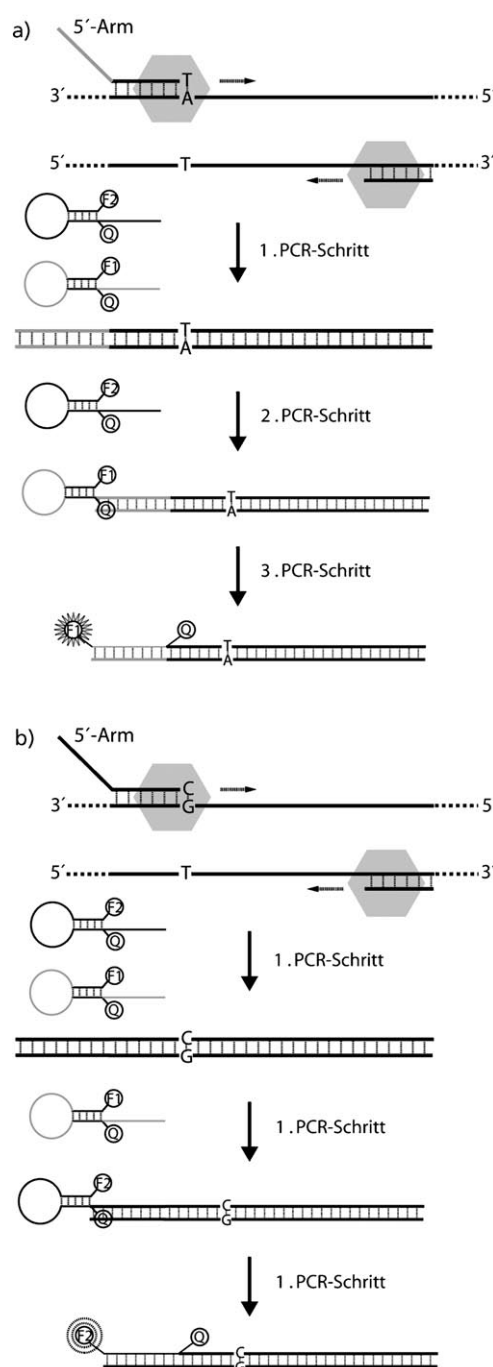


Schema 5. Parallele allelspezifische Amplifizierung. Jeder der allelspezifischen Primer ist mit einem spezifischen Oligonucleotid verbunden, das nicht mit der Zielsequenz komplementär ist und eine Haarnadelstruktur bildet. Jede dieser Strukturen trägt ein Fluorophor-Quencher-Paar. Während der PCR wird der allelspezifische Primerstrang verlängert und die Haarnadelstruktur linearisiert. Das führt zu einer Trennung von Fluorophor und Quencher, und ein Fluoreszenzsignal wird generiert. Dabei ist die Wellenlänge des Konstruktes an die Allelvariante gekoppelt, wie es exemplarisch für den Genotyp A, Signal F1 in (a), und für Genotyp G, Signal F2 in (b), gezeigt ist.

So genannte Multiplexreaktionen, bei denen die Unterscheidung beider Allelvarianten in einem einzigen Reaktionsgefäß erfolgt, können durch Einführen einer spezifischen 5'-Überhangsequenz in jeden allelspezifischen Primer realisiert werden. Dadurch wird die Signalerzeugung direkt an einen der allelspezifischen Primer bei der PCR-Amplifizierung gekoppelt. Als Überhang werden zwei Haarnadel-FRET-Strukturen mit Fluorophoren verwendet, die bei unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszieren (Schema 5).^[36] Während der PCR wird der Überhang doppelsträngig, wodurch sich die Haarnadelstruktur öffnet. Daraus resultiert ein für ein Allel spezifisches Fluoreszenzsignal.

Bei einer weiteren Methode wird eine einfache lineare Überhangsequenz eingefügt, die dann durch einen der oben beschriebenen Überhangprimer detektiert wird.^[43] Dies hat den Vorteil, dass die Primer, die die Überhang-FRET-Struktur tragen, unabhängig von der Zielsequenz und somit universell einsetzbar sind (Schema 6). Dasselbe FRET-Primerpaar kann in jedem Sequenzkontext eingesetzt werden, und nur die einfachen, allelspezifischen Primer variieren. Eine Unterscheidung zwischen Allelvarianten kann mit 40 ng genomischer DNA erreicht werden.

Eine Verbesserung der Eigenschaft des Enzyms, in der PCR ein fehlgepaartes Primerende zu diskriminieren, wurde



Schema 6. Parallele allelspezifische Amplifizierung. Jeder allelspezifische Primer trägt eine spezifische, nicht zur Zielsequenz komplementäre Überhangsequenz. Während der PCR wird der allelspezifische Primer verlängert und die Überhangsequenz an das PCR-Produkt angehängt. Ein zur eingeführten Überhangsequenz komplementärer Primer, der eine eigene Überhangsequenz mit einer Schlaufenstruktur trägt, wird eingesetzt. Während der fortschreitenden PCR wird diese Schlaufenstruktur linearisiert, und ein Fluoreszenzsignal resultiert. Dabei ist die Wellenlänge des Konstruktes an die Allelvariante gekoppelt, wie es exemplarisch für den Genotyp A, Signal F1 in (a), und für Genotyp G, Signal F2 in (b), gezeigt ist.

auch durch Mutation der DNA-Polymerase erreicht. Eine Variante der *Taq*-DNA-Polymerase wurde identifiziert, die im Vergleich zum Wildtypenzym eine deutlich erhöhte Fehl-

paarungsdiskriminierung in der PCR aufweist.^[44] Dies wurde mithilfe eines kombinatorischen Ansatzes erreicht, bei dem eine Genkassette der DNA-Polymerase randomisiert wurde und anschließend die entstehende DNA-Polymerasenbibliothek nach Varianten mit besserer Fehlpaarungsdiskriminierung durchgemustert wurde.

Methoden der DNA-Diagnostik, die keine kostspieligen fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden erfordern, sind vorteilhaft für die weitere Entwicklung hoch selektiver und robuster Analysemethoden.

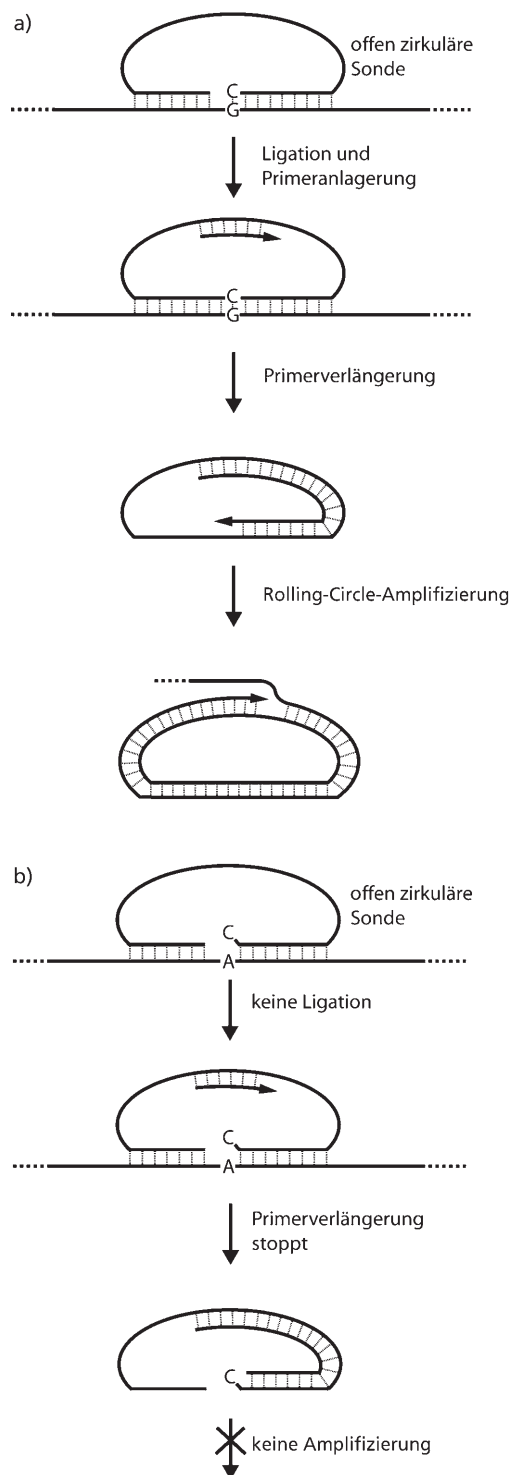
5. Isotherme Genotypisierung durch zirkularisierte Oligonucleotidsonden: Padlock-Sonden und Rolling-Circle-Amplifizierung

Padlock-Sonden sind zirkuläre einzelsträngige Oligonucleotide aus 70–110 Nucleobasen. Sie haben die Form eines offenen Kreises, der an jedem Ende eine zur Zielsequenz komplementäre Region enthält (siehe Schema 7).^[45]

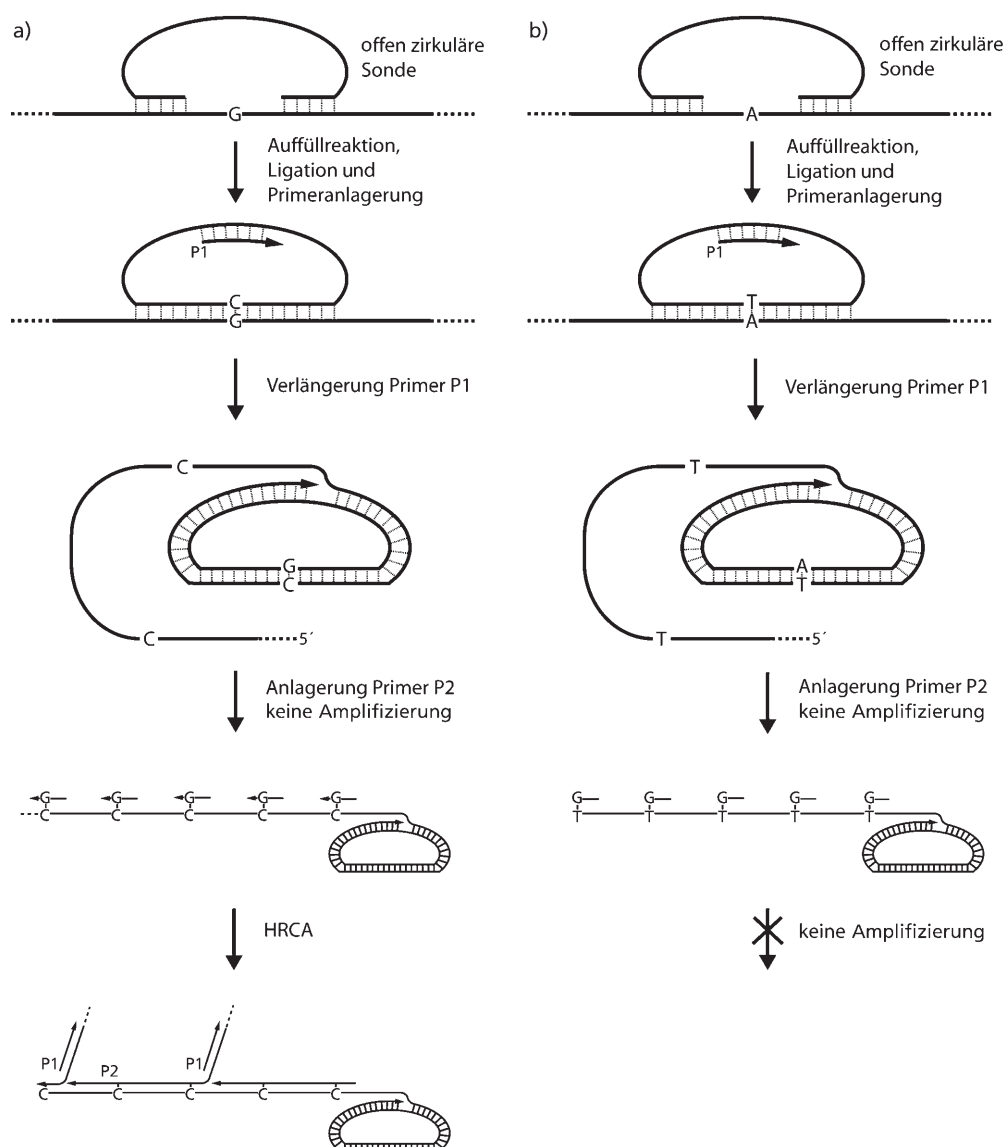
In Gegenwart einer komplementären Zielsequenz werden die beiden Enden der offenen zirkulären Form von einer DNA-Ligase kovalent zur geschlossenen zirkulären Padlock-Sonde verknüpft. Anschließend können offene zirkuläre Sonden, die aufgrund einer nicht kanonischen Zielsequenz nicht ligiert wurden, durch Behandlung mit Exonucleasen abgebaut werden. Geschlossene Sonden bleiben bei dieser Behandlung intakt. In vielen Anwendungen folgt auf die Verknüpfung zur zirkulären Padlock-Sonde eine isotherme Amplifizierung, bei der ein Primer eingesetzt wird, der aus der zentralen Region der Padlock-Sonde abgeleitet ist. Daraus resultieren Hunderte von kovalent verknüpften Kopien der Padlock-Sonde. Dieser Kopiervorgang, der als Rolling-Circle-Amplifizierung (RCA) bezeichnet wird,^[46] erfordert eine DNA-Polymerase, die doppelsträngige DNA verdrängen kann. Oft wird zu diesem Zweck die DNA-Polymerase $\phi 29$ eingesetzt, doch es gibt auch Anwendungen, die thermostabile DNA-Polymerasen nutzen.^[47,48]

Die bekanntesten Anwendungen von Padlock-Sonden auf dem Gebiet der Alleldiagnostik nutzen die Fehlpaarungsdiskriminierenden Eigenschaften von verschiedenen Enzymen,

oft kombiniert mit Hybridisierungssonden. Im Fall der auf DNA-Ligase basierenden Methoden ist die offene zirkuläre Sonde so aufgebaut, dass sich in Abhängigkeit von der Zielsequenz ein perfekt kanonisch gepaartes 3'-Ende bildet oder aber eine Fehlpaarung auftritt.^[46] Dank der Fehlpaarungsdiskriminierung durch die eingesetzte DNA-Ligase wird die Sonde im ersten Fall zirkularisiert, im zweiten Fall findet dagegen aufgrund des fehlgepaarten Primer-Zielsequenz-Komplexes keine Ligation statt.^[49] Zusätzlich sind die kom-



Schema 7. Rolling-Circle-Amplifizierung. a) In einem ersten Schritt lagert sich die offene zirkuläre Sonde mit den beiden zur Zielsequenz komplementären Teilen an die Zielsequenz an. Beide Enden liegen sich gegenüber und bilden eine Lücke, die einem Strangbruch ähnelt. Im Fall einer Allelvariante bildet sich am 3'-Ende ein perfekt kanonischer Hybrid (a), in den anderen Fällen kommt es zu einer Fehlpaarung (b). Die kanonisch gepaarten Enden werden durch eine DNA-Ligase ligiert, und es wird eine zirkuläre Sonde gebildet. Im Fall des fehlgepaarten Komplexes findet keine Ligation statt. Die Reaktionslösung enthält außerdem ein Oligonucleotid, das komplementär zu einem Teil der Sondensequenz ist und als Primer fungieren kann. Eine DNA-Polymerase verlängert diesen Primer, stoppt aber im anderen Fall (b) an der Stelle der nicht ligierten Lücke. Wurde die Sonde durch die DNA-Ligase dagegen zirkularisiert, kann die Primerverlängerung fortschreiten (a). Nach einem vollständigen Amplifizierungsschritt wird der schon mit der Sonde hybridisierte DNA-Strang durch die DNA-Polymerase verdrängt. Es resultiert ein DNA-Einzelstrang aus Tausenden verknüpfter Kopien der Sondenkomplementärsequenz.



Schema 8. Hyperverzweigende RCA. Die beiden Enden der offenen zirkulären Sonde hybridisieren unter Bildung einer Lücke mit der Zielsequenz. In einer Auffüllreaktion schließt eine DNA-Polymerase diese Lücke, indem sie einen Teil der Zielsequenz in die Sondensequenz kopiert. Anschließend wird die Sonde durch eine Ligase zirkularisiert. Im Anschluss findet eine RCA statt, ausgehend von einem mit der Sonde hybridisierenden Primer P1. Das einzelsträngige Produkt enthält Wiederholungen des kurzen, eingeführten Sequenzraumes, in dem sich die SNP-Position befindet. Ein zweites, zu diesem Sequenzraum komplementäres Oligonucleotid lagert sich so an, dass das 3'-Ende komplementär zu einer Allelvariante ist. In einer zweiten Reaktion fungiert dieses Oligonucleotid als Primer (P2). Dieser kann nur dann verlängert werden, wenn ein kanonisches Primerende gebildet wird (a); im fehlgepaarten Fall findet keine Verlängerung statt (b). Das Produkt aus diesen Verlängerungsreaktionen besteht aus der originalen Sondensequenz. Dadurch kann der erste Primer P1 an diese neu synthetisierten Produkte binden. Es resultiert die Amplifizierung eines stark verzweigten DNA-Produktes.

plementären Enden so gestaltet, dass der 5'-komplementäre Teil der Sonde fest mit der Zielsequenz hybridisiert, während sich die 3'-Region in einem Assoziations-Dissoziations-Gleichgewicht befindet, da ihre berechnete Dissoziations-temperatur ca. 10 °C unterhalb der Reaktionstemperatur von ca. 60 °C liegt.^[50] Die Genauigkeit der Ligation wird somit durch die bevorzugte Hybridisierung der perfekt kanonisch mit der Zielsequenz paarenden offenen zirkulären Form unterstützt. Im Anschluss an die Ligation kann eine lineare isotherme RCA genutzt werden, um festzustellen, ob die Sonde zirkularisiert wurde oder nicht.

Ein weiterer Ansatz basiert auf der Fehlpaarungsdiskriminierung durch DNA-Polymerasen.^[47] Die offene zirkuläre Form wird so entworfen, dass sich eine Lücke von üblicherweise sieben Nucleotiden zwischen den beiden zur Zielsequenz komplementären Teilen bildet (Schema 8). Diese Lücke umfasst den Sequenzkontext, der die zu untersuchende Position in der Zielsequenz umgibt. Im ersten Schritt wird eine DNA-Polymerase verwendet, um die Lücke in der offenen zirkulären Sonde aufzufüllen. Dies geschieht durch Einkopieren des Zielsequenzkontextes. Nach dieser Auffüllreaktion wird eine DNA-Ligase genutzt, um die Sonde zu schließen.

Danach wird die zirkuläre Padlock-Sonde durch RCA amplifiziert. Das lineare einzelsträngige Produkt trägt dann Hunderte von miteinander verknüpften Kopien der Padlock-Sonde mit dem eingefügten Sequenzkontext. Diese Sequenzabschnitte hybridisieren mit einem allelspezifischen Primer (P2) und bilden entweder einen perfekt gepaarten Hybrid (Schema 8a) oder eine Fehlpaarung am 3'-Ende (Schema 8b).

Im Anschluss werden die fehlpaarungsdiskriminierenden Eigenschaften von DNA-Polymerasen wie Vent(exo-) genutzt, um die möglichen Allele durch allelspezifische Amplifizierung zu unterscheiden. Die Produkte dieses Amplifizierungsschrittes bilden wiederholte Kopien der ursprünglichen zirkulären Sonde. Diese Sequenzen tragen wiederum viele Bindestellen für den ersten RCA-Primer (P1). Durch die Verlängerung dieses Primers wird ein sich wiederholendes Muster aus doppelsträngiger DNA mit Verzweigungen generiert; diese Methode wird deshalb hyperververzweigende RCA (HRCa) genannt. Im Unterschied zur allelspezifischen PCR wird eine Fehlpaarungsverlängerung nicht propagiert, da die fehlgepaarte Base nur einmal in den Primer eingebaut und nicht wiederholt abgelesen wird. Mit dieser Methode können von einer zirkulären Sonde bis zu 10^9 Kopien in 90 min generiert werden.^[47]

2001 wurde von Qi et al. eine Anwendung vorgestellt, die eine Sondenligation und anschließende RCA unter identischen Reaktionsbedingungen ermöglicht.^[48] Dadurch wird die Durchführung in einem geschlossenen Gefäß oder einer geschlossenen Mikroplatte möglich.

6. Ausblick

Alle aktuellen Methoden haben Vor- und Nachteile, und bis heute hat sich noch keine der hier beschriebenen Methoden allgemein durchsetzen können. Für die Zukunft ist eine erleichterte Anwendung in der täglichen Laborpraxis erstrebenswert.

Selektivität und Robustheit von Methoden, die auf dem Einsatz von Enzymen in diskriminierenden Schritten basieren, sollten sich durch geeignete Mutagenese der Enzyme erhöhen lassen. Die hohen Kosten bleiben allerdings ein wichtiger Punkt. Eine Kostenverringerung könnte durch die Weiterentwicklung von Methoden erreicht werden, die keine Sonden mit kovalent verknüpften Farbstoffen benötigen, deren Synthese zeit- und kostenintensiv ist.

Dank der Entwicklung kostengünstiger und schneller Closed-Tube-Detektionmethoden scheint das Ziel, die SNP-Detektion zu einer generellen Methode in der klinischen Praxis zu machen, in Reichweite zu liegen.

Eingegangen am 27. April 2005

Online veröffentlicht am 10. Oktober 2005

-
- [1] J. C. Venter et al., *Science* **2001**, 291, 1304.
 - [2] R. Sachidanandam et al., *Nature* **2001**, 409, 928.
 - [3] W. E. Evans, M. V. Relling, *Science* **1999**, 286, 487.
 - [4] L. Licinio, M. Wong, *Pharmacogenomics*, Wiley-VCH, Weinheim, **2002**.

- [5] J. J. McCarthy, R. Hilfiker, *Nat. Biotechnol.* **2000**, 18, 505.
- [6] M. V. Relling, T. Dervieux, *Nat. Rev. Cancer* **2001**, 1, 99.
- [7] B. W. Kirk, M. Feinsod, R. Favis, R. M. Kliman, F. Barany, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 3295.
- [8] A. C. Syvanen, *Nat. Rev. Genet.* **2001**, 2, 930.
- [9] M. M. Shi, *Am. J. Pharmacogenomics* **2002**, 2, 197.
- [10] I. G. Gut, *Hum. Mutat.* **2001**, 17, 475.
- [11] R. M. Twyman, S. B. Primrose, *Pharmacogenomics* **2003**, 4, 67.
- [12] R. M. Twyman, *Curr. Top. Med. Chem.* **2004**, 4, 1423.
- [13] P. Y. Kwok, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2001**, 2, 235.
- [14] P. Y. Kwok, X. Chen, *Curr. Issues Mol. Biol.* **2003**, 5, 43.
- [15] K. Nakatani, *ChemBioChem* **2004**, 5, 1623.
- [16] L. Fors, K. W. Lieder, S. H. Vavra, R. W. Kwiatkowski, *Pharmacogenomics* **2000**, 1, 219.
- [17] „Single Nucleotide Polymorphisms“: V. Lyamichev, B. Neri in *Methods in Molecular Biology*, Bd. 212 (Hrsg.: P.-Y. Kwok), Humana, Totowa, NY, **2003**, S. 229.
- [18] V. Lyamichev, M. A. Brow, J. E. Dahlberg, *Science* **1993**, 260, 778.
- [19] V. Lyamichev, A. L. Mast, J. G. Hall, J. R. Prudent, M. W. Kaiser, T. Takova, R. W. Kwiatkowski, T. J. Sander, M. de Arruda, D. A. Arco, B. P. Neri, M. A. Brow, *Nat. Biotechnol.* **1999**, 17, 292.
- [20] J. G. Hall, P. S. Eis, S. M. Law, L. P. Reynaldo, J. R. Prudent, D. J. Marshall, H. T. Allawi, A. L. Mast, J. E. Dahlberg, R. W. Kwiatkowski, M. de Arruda, B. P. Neri, V. I. Lyamichev, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 8272.
- [21] P. M. Holland, R. D. Abramson, R. Watson, D. H. Gelfand, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, 88, 7276.
- [22] „Single Nucleotide Polymorphisms“: K. J. Livak in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 212 (Hrsg.: P.-Y. Kwok), Humana, Totowa, NY, **2003**, S. 129.
- [23] L. G. Lee, C. R. Connell, W. Bloch, *Nucleic Acids Res.* **1993**, 21, 3761.
- [24] P. M. Holland, R. D. Abramson, R. Watson, D. H. Gelfand, *Clin. Chem.* **1992**, 38, 462.
- [25] a) I. Afonina, M. Zivarts, I. Kutyavin, E. Lukhtanov, H. Gamper, R. B. Meyer, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 2657; b) I. V. Kutyavin, E. A. Lukhtanov, H. B. Gamper, R. B. Meyer, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 3718.
- [26] I. V. Kutyavin et al., *Nucleic Acids Res.* **2000**, 28, 655.
- [27] S. Germer, R. Higuchi, *Genome Res.* **1999**, 9, 72.
- [28] R. A. Gibbs, P. N. Nguyen, C. T. Caskey, *Nucleic Acids Res.* **1989**, 17, 2437.
- [29] S. Germer, M. J. Holland, R. Higuchi, *Genome Res.* **2000**, 10, 258.
- [30] D. Y. Wu, L. Ugozzoli, B. K. Pal, R. B. Wallace, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 2757.
- [31] L. Shively, L. Chang, J. M. LeBon, Q. Liu, A. D. Riggs, J. Singer-Sam, *Biotechniques* **2003**, 34, 498.
- [32] Z. Guo, Q. Liu, L. M. Smith, *Nat. Biotechnol.* **1997**, 15, 331.
- [33] Y. Ishikawa, K. Tokunaga, K. Kashiwase, T. Akaza, K. Tadokoro, T. Fuji, *Hum. Immunol.* **1995**, 42, 315.
- [34] J. Wilhelm, H. Reuter, B. Tews, A. Pingoud, M. Hahn, *Biol. Chem.* **2002**, 383, 1423.
- [35] J. Wilhelm, A. Pingoud, *ChemBioChem* **2003**, 4, 1120.
- [36] I. A. Nazarenko, S. K. Bhatnagar, R. J. Hohman, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 2516.
- [37] M. Strerath, A. Marx, *Angew. Chem.* **2002**, 114, 4961; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 4766.
- [38] M. Strerath, J. Gaster, D. Summerer, A. Marx, *ChemBioChem* **2004**, 5, 333.
- [39] M. Strerath, J. Gaster, A. Marx, *ChemBioChem* **2004**, 5, 1585.
- [40] J. Gaster, A. Marx, *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 1861.
- [41] B. Tews, J. Wilhelm, D. Summerer, M. Strerath, A. Marx, P. Friedhoff, A. Pingoud, M. Hahn, *Biol. Chem.* **2003**, 384, 1533.
- [42] D. Latorra, K. Campbell, A. Wolter, J. M. Hurley, *Hum. Mutat.* **2003**, 22, 79.

- [43] M. V. Myakishev, Y. Khripin, S. Hu, D. H. Hamer, *Genome Res.* **2001**, *11*, 163.
- [44] D. Summerer, N. Z. Rudinger, I. Detmer, A. Marx, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4791–4794; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4712–4715.
- [45] M. Nilsson, H. Malmgren, M. Samiotaki, M. Kwiatkowski, B. P. Chowdhary, U. Landegren, *Science* **1994**, *265*, 2085.
- [46] J. Baner, M. Nilsson, M. Mendel-Hartvig, U. Landegren, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 5073.
- [47] P. M. Lizardi, X. Huang, Z. Zhu, P. Bray-Ward, D. C. Thomas, D. C. Ward, *Nat. Genet.* **1998**, *19*, 225.
- [48] X. Qi, S. Bakht, K. M. Devos, M. D. Gale, A. Osbourn, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, E116.
- [49] U. Landegren, R. Kaiser, J. Sanders, L. Hood, *Science* **1988**, *241*, 1077.
- [50] A. F. Faruqi, S. Hosono, M. D. Driscoll, F. B. Dean, O. Alsmadi, R. Bandaru, G. Kumar, B. Grimwade, Q. Zong, Z. Sun, Y. Du, S. Kingsmore, T. Knott, R. S. Lasken, *BMC Genomics* **2001**, *2*, 4.

Quality counts...

The best of chemistry every week

Wiley-VCH
P.O. Box 10 11 61
69451 Weinheim
Germany
Phone +49 (0) 6201-606-400
Fax +49 (0) 6201-606-184
e-mail: angewandte@wiley-vch.de
www.angewandte.org

Angewandte Chemie International Edition is a journal of the GDCh, the German Chemical Society

GDCh

WILEY-VCH

12180404_gu