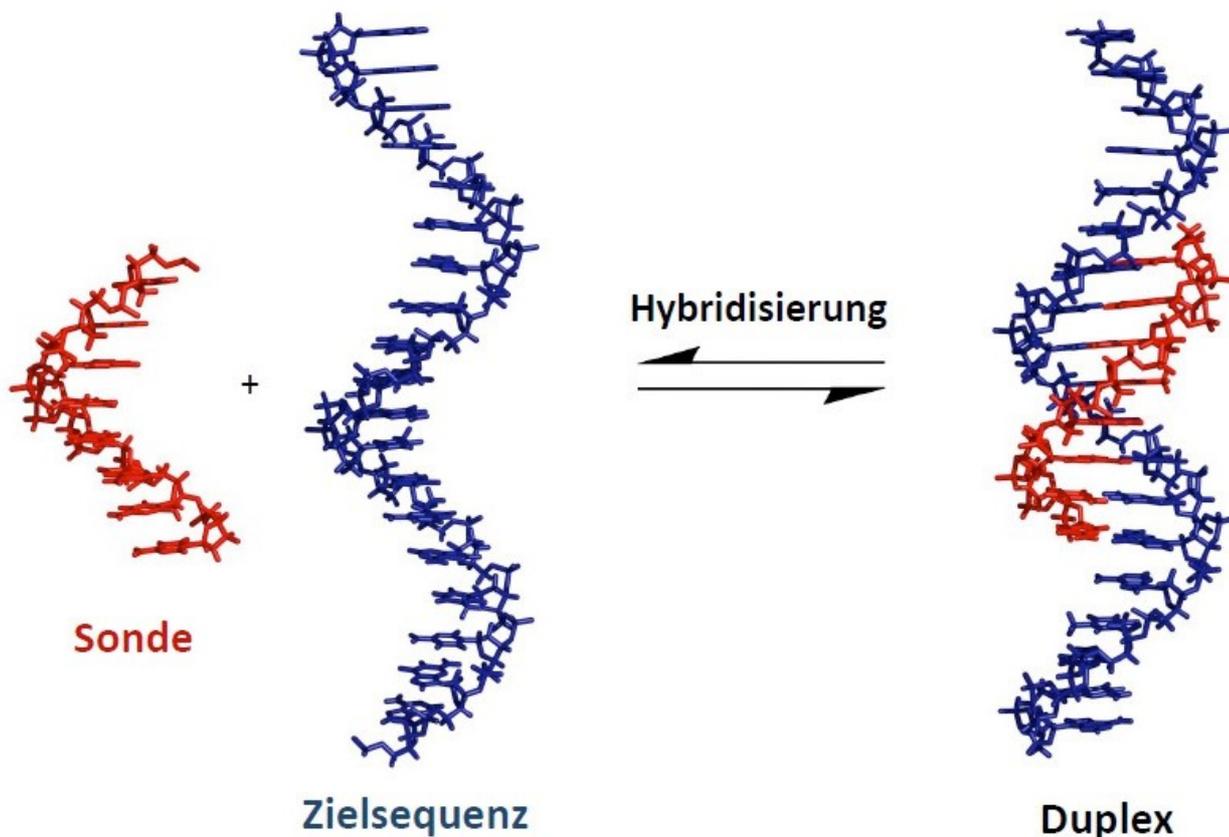


Verbesserte Basenpaarung bei DNA-Analysen

Ein Team aus der Organischen Chemie der Universität Stuttgart hat einen chemischen Ersatz für einen der vier DNA-Bausteine gefunden: für die Kernbase Thymin. Thymin kann bei analytischen DNA-Hybridisierungsexperimenten Probleme verursachen. Der Ersatz namens „E“ wie Ethinylpyridon bindet stärker und selektiver an die komplementäre Base Adenin. Davon könnten vor allem hochspezifische DNA-Tests profitieren.



Schematische Darstellung eines Hybridisierungsexperiments: Findet eine markierte Sonde aus kurzer Einzelstrang-DNA (rot) eine komplementäre Sequenz in einem Einzelstrang (blau) der zu untersuchenden DNA, können die Stränge aneinander binden. Durch die Hybridisierung entsteht ein Duplex-Strang.

© Minuth, Institut für Organische Chemie, Universität Stuttgart

Hybridisierungssonden sind bei der Analyse von DNA nicht mehr wegzudenken. Sie werden in der

Forschung ebenso benötigt wie zum Beispiel in der medizinischen Diagnostik und in der Forensik. Trotz aller Fortschritte in Handhabung, Schnelligkeit und Genauigkeit gibt es jedoch immer noch Verbesserungspotenzial, vor allem, wenn es um hochspezifische Nachweise geht.

DNA-Testverfahren beruhen generell darauf, dass an einen zu untersuchenden DNA-Einzelstrang ein Strang komplementärer Sequenz bindet und zu einer DNA-Duplex hybridisiert. Wurde der zu hybridisierende Strang zuvor markiert, etwa mit Fluoreszenzfarbstoff, lassen sich die entsprechenden Duplex-Stränge relativ einfach optisch nachweisen. So wird zum Beispiel analysiert, ob sich in einer biologischen Probe die Transkripte eines krankheitsrelevanten Gens befinden.

Nicht jede DNA-Sequenz eignet sich jedoch gleich gut zur stabilen Duplexbildung. Einer der vier DNA-Bausteine, die Kernbase Thymin, bindet nur relativ schwach an ihren komplementären Partner, die Kernbase Adenin. Die Paarungen zwischen den Kernbasen Guanin und Cytosin hingegen sind mit ihren drei Wasserstoffbrückenbindungen relativ stark.

Unterschiedliche Bindungsstärken unter natürlichen Bedingungen sinnvoll



Marco Minuth promoviert in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Clemens Richert am Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart.

© Sabirov, Institut für Organische Chemie, Universität Stuttgart

Nun ist es keineswegs so, dass die Natur die Basenpaarung nicht ausreichend optimiert hätte, wie auch Marco Minuth betont, der am Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Clemens Richert forscht. „In der Zelle muss die DNA andere Zwecke erfüllen als bei genetischen Testverfahren. An manchen Stellen müssen sich die Stränge in der Zelle sogar leicht voneinander trennen, damit ihre Sequenz zur Transkription abgelesen werden kann. Die schwache Basenpaarung ist hier also vorteilhaft.“

Bei genetischen Testverfahren kann die unterschiedliche Stabilität der Basenpaare jedoch zu Problemen führen. Hier wird zum Beispiel ein einzelner Chip, auf dem Abertausende von unterschiedlichen DNA-Einzelsträngen immobilisiert sind, unter bestimmten physikalischen und chemischen Bedingungen mit einer Probe inkubiert. Das heißt, alle Einzelstränge auf diesem Chip sind den gleichen Bedingungen ausgesetzt. Bei besonders AT-reichen oder AT-armen Sequenzen kann das zu falschen Ergebnissen führen. „AT-reiche Stränge dissoziieren bei niedrigerer Temperatur als GC-reiche Stränge, dadurch kann es im Extremfall zu falsch negativen Signalen kommen“, sagt Minuth.

Forschungsziel: Beide Basenpaare sollen annähernd gleich stabil sein



Prof. Dr. Clemens Richert

© Sabirov, Institut für Organische Chemie, Universität Stuttgart

Deshalb hat sich das Team um Richert daran gemacht, einen Weg zu finden, das AT-Basenpaar genauso stabil zu machen wie das GC-Basenpaar. „Als ich mit meiner Arbeit anfangte, hatte die Gruppe um Professor Richert bereits herausgefunden, dass ein Ethinylsubstituent an einem Analogon des Thymins eine stabilisierende Wirkung auf die Bindung mit Adenin im Vergleich zum Analogon mit fehlendem Substituent hat“, erklärt Minuth. Weitere Untersuchungen zeigten jedoch, dass dieses Analogon, an das der Ethinylrest geknüpft wurde, nicht ideal war: Die üblichen zwei Wasserstoffbrücken zu Adenin konnten sich damit nicht ausbilden. Minuth hat daraufhin einen neuen Anlauf genommen und in drei Jahren geduldiger Forschungsarbeit einen neuen Weg zu dem Nucleosid gefunden, das sowohl den stabilisierenden Ethinylrest trägt als auch zur Ausbildung der natürlichen zwei Wasserstoffbrücken befähigt ist. „Ich konnte das Basenanalogon mit dem Zucker verknüpfen und das Kopplungsprodukt dann weiter funktionalisieren, bis das – ausgehend von

Thymin als Leitstruktur entworfene – Zielmolekül synthetisiert war. Wir haben es in Kurzform „E“ genannt, da es sich strukturell um ein Ethinylpyridon handelt.“

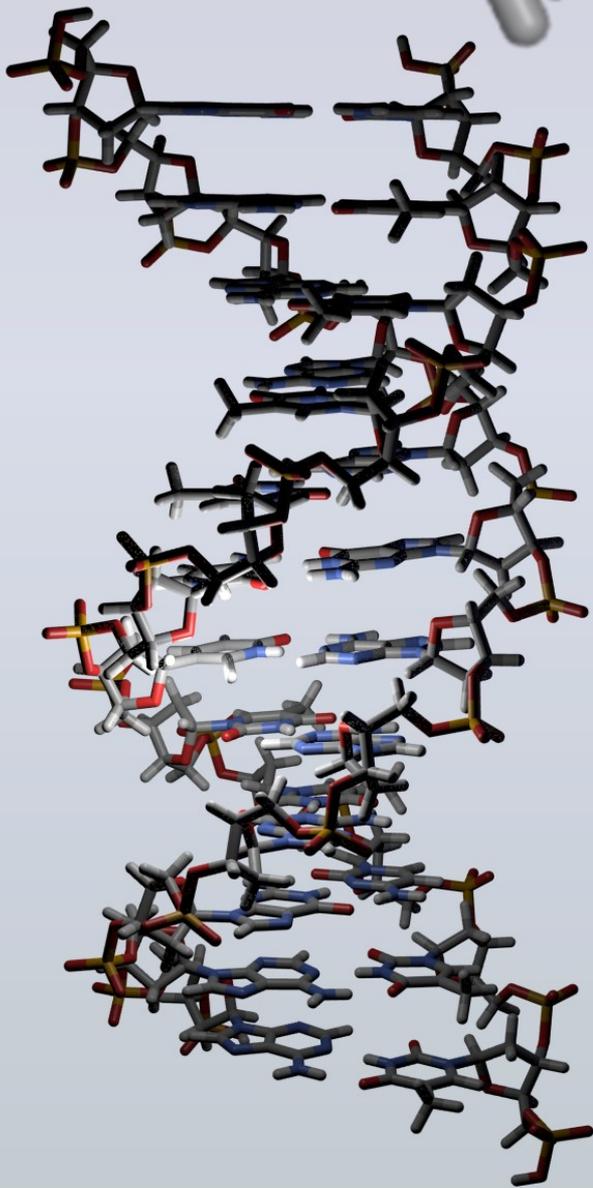
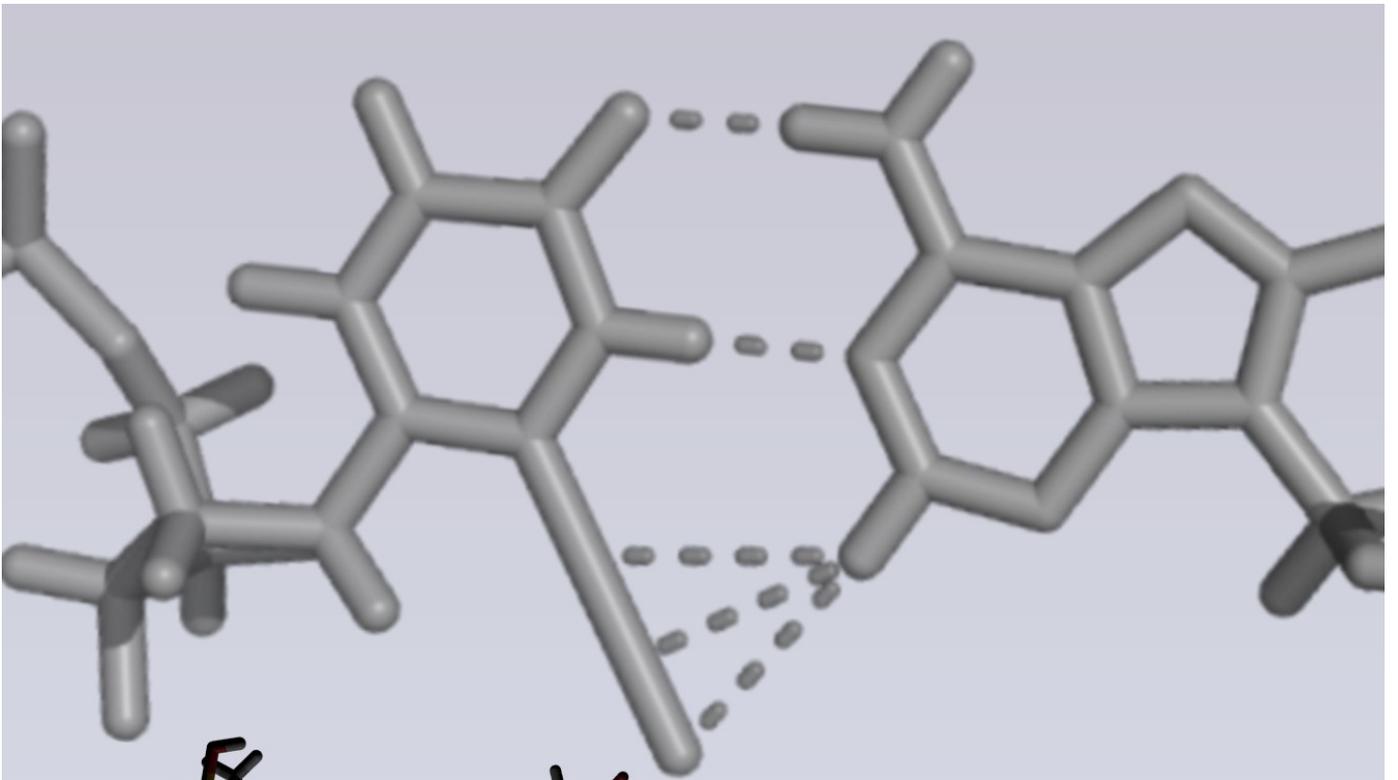
Neue "E-Basen" erhöhen Stabilität

In Hybridisierungsexperimenten konnte Minuth bereits zeigen, dass der Einbau von einem oder zwei E-Basen die Stabilität der Duplexe teilweise deutlich erhöht. Die EA-Basenpaare sind nun beinahe so stabil wie die GC-Paare. Im nächsten Schritt wollen die Stuttgarter Forscher sämtliche Thymin-Basen bei Hybridisierungsexperimenten gegen E austauschen. „Möglicherweise stabilisieren sich die Duplexstränge dann durch höhere Stapelwechselwirkungen sogar noch mehr. Dazu kommt es, wenn sich die aromatischen Ringe der benachbarten Basen übereinander legen“, sagt Minuth optimistisch.

Darüber hinaus haben die bisherigen Experimente bereits gezeigt, dass sich auch bei RNA-DNA-Duplexsträngen die Stabilität erhöht, wenn die Ersatzbase E eingebaut wird. Das dürfte auch Vorteile für RNA-Analysen mit sich bringen. Bei entsprechenden Testverfahren geht es zum Beispiel darum, aus humanen Zellen mRNA (messenger RNA) nachzuweisen, die „Produktionspläne“ für krankheitsrelevante Proteine vom Zellkern zum Ribosom, also der zelleigenen Maschinerie zur Proteinbiosynthese, transportiert.

DNA-Analysen können von erhöhter Selektivität profitieren

Die verbesserte Stabilität der Basenpaarung ist jedoch nur ein Aspekt. Hinzu kommt die erhöhte Selektivität, wie Minuth erklärt: „E bindet mit höherer Selektivität als Thymin an Adenin und eben nicht an Cytosin, Guanin oder ein Thymin im Gegenstrang. Das heißt, wenn die gegenüberliegende Base die falsche ist, passt sie durch den zusätzlichen Substituenten noch schlechter. Dabei spielen auch sterische Effekte eine Rolle.“ Die Zuverlässigkeit von Testsystemen würde sich dadurch noch weiter erhöhen. Zurzeit hat die Gruppe noch nicht den Kontakt mit interessierten Anwendern und Testentwicklern gesucht, steht entsprechenden Anfragen jedoch offen gegenüber und würde sich freuen, wenn die Erkenntnisse in Testverfahren ihren ganz praktischen Nutzen beweisen können.



**CG
TA
TA
TA
TA
CG
EA
TA
TA
CG
TA
TA**

Basenpaarung des neu entwickelten Nukleosids mit Adenin (gestrichelte Linien zeigen die verschiedenen Wechselwirkungen). Links: Doppelhelix, die das neue Basenpaar enthält, rechts: Sequenz dieser Doppelhelix.
© Minuth, Institut für Organische Chemie, Universität Stuttgart

Fachbeitrag

09.12.2013

leh

BioRegio STERN

© BIOPRO Baden-Württemberg GmbH

Weitere Informationen

Universität Stuttgart

Institut für Organische Chemie

Marco Minuth

Prof. Dr. Clemens Richert

Pfaffenwaldring 55

70569 Stuttgart

Tel.: 0711 685-64311

E-Mail: [lehrstuhl-2\(at\)oc.uni-stuttgart.de](mailto:lehrstuhl-2(at)oc.uni-stuttgart.de)

- ▶ [IOC - Institut für organische Chemie
Stuttgart](#)