



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Patentschrift
10 DE 199 05 913 C 1

51 Int. Cl.⁷:
C 12 N 15/11
C 07 H 21/00

- 21 Aktenzeichen: 199 05 913.6-41
- 22 Anmeldetag: 12. 2. 1999
- 43 Offenlegungstag: -
- 45 Veröffentlichungstag der Patenterteilung: 15. 2. 2001

DE 199 05 913 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

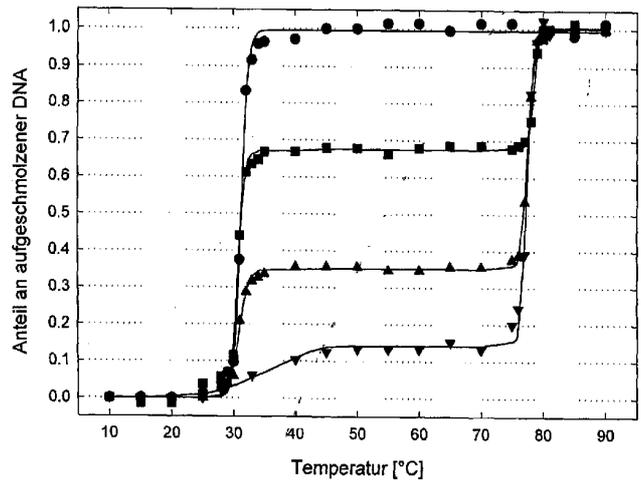
73 Patentinhaber:
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 06108
Halle, DE

72 Erfinder:
Esser, Dirk, 06114 Halle, DE; Böhm, Gerald, Dr.,
06114 Halle, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
Biochemistry 34, S. 10063-10077, 1995;

54 Verfahren zur Stabilisierung von doppelsträngigen Nukleinsäuren

57 Doppelsträngige Nukleinsäuren zeigen unter üblichen Lösungsmittelbedingungen ein Auftrennen der beiden gepaarten Einzelstränge, wenn die Umgebungstemperatur den Schmelzpunkt der Nukleinsäuren überschreitet; der Schmelzpunkt ist unter anderem von Art und Länge der Nukleinsäuren abhängig. Dieses Aufschmelzen kann in einigen medizinischen und vielen biotechnologischen Prozessen und Anwendungen unerwünscht sein. Das neue Verfahren erlaubt eine signifikante thermische Stabilisierung des doppelsträngigen Charakters der Nukleinsäuren durch die Verwendung von einfach und kostengünstig herstellbaren rekombinanten Proteinen. Die doppelsträngige Nukleinsäure wird mit einem nukleinsäurebindenden Protein aus einem hyperthermophilen Organismus, im gewählten Beispiel das HU-Protein aus dem Eubakterium *Thermotoga maritima*, inkubiert. Das Protein kondensiert die Nukleinsäure und schützt sie gleichzeitig vor Aufschmelzen wie auch vor enzymatischem Verdau. Dabei kann beispielsweise eine thermische Stabilisierung von synthetischem poly-dAdT um 47 C beobachtet werden, d. h. eine Verschiebung der Schmelztemperatur von 31 C ohne HU (●) auf 78 C mit HU (X) vgl. Zeichnung. Bereitstellung von doppelsträngigen Nukleinsäuren in medizinischen Anwendungen und in biotechnologischen Prozessen.



DE 199 05 913 C 1

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Stabilisierung von doppelsträngigen Nucleinsäuren (dsDNA, dsRNA, DNA/RNA-Hybride, doppelhelikale intramolekulare Basenpaarbereiche) gegen thermisch induziertes Aufschmelzen.

DNA (Desoxyribonucleinsäure) tritt im Organismus stets als doppelt gewundene Helix auf, innerhalb der jeweils zwei Basentypen komplementär zueinander gepaart vorliegen. Die Stabilität dieser Doppelhelix beruht auf schwachen, nicht-kovalenten Wechselwirkungen; im wesentlichen sind dies (i) Wasserstoffbrücken, die sich aufgrund der spezifischen Basenpaarungen zwischen den Helixsträngen ausbilden, sowie (ii) hydrophobe Basenpaarstapelungseffekte der aromatischen Ringe der Nucleotide. Bedingt durch den nichtkovalenten Charakter der Wechselwirkungen lassen sich die Stränge durch Zufuhr von thermischer Energie voneinander trennen. Dieser Prozeß wird als das Aufschmelzen von DNA bzw. die thermische Denaturierung von DNA bezeichnet; ein wichtiger Teil der PCR-Methode (Polymerase Chain Reaction) beispielsweise besteht aus wiederholten derartigen Aufschmelzvorgängen.

Die Schmelztemperatur, das ist per definitionem diejenige Temperatur, bei der 50% der Basen nicht mehr gepaart vorliegen, wird im wesentlichen von der Länge des DNA-Fragmentes sowie von seiner Zusammensetzung aus den möglichen Basenpaaren zwischen Adenin und Thymin einerseits und Guanin und Cytosin andererseits bestimmt. Darüber hinaus modulieren Lösungsbedingungen wie z. B. die Ionenstärke, Puffer-Additive oder der pH-Wert die Schmelztemperatur eines DNA-Fragmentes. Das Aufschmelzen eines homogenen DNA-Fragmentes ist dabei ein hoch kooperativer Prozeß.

Verschiedene technische und medizinische Anwendungen erfordern die Bereitstellung stabiler doppelsträngiger Nucleinsäuren (z. B. doppelsträngige Desoxyribonucleinsäure, doppelsträngige Ribonucleinsäure oder doppelsträngige Hybride davon) auch unter thermischen und/oder physikochemischen Bedingungen, unter denen diese Doppelsträngigkeit natürlicherweise nicht gegeben ist. Einzelsträngige Nucleinsäuren sind biologisch jedoch nicht in gleicher Weise wirksam wie doppelsträngige Nucleinsäuren, und sie werden unter physiologischen Bedingungen schneller enzymatisch abgebaut, sofern sie nicht durch tiefe Temperatur oder bestimmte strukturelle Merkmale geschützt werden. Weiterhin sind kurze Oligonucleotide mit geringem GC-Gehalt (Anteil an Guanin und Cytosin) unter typischen physiologischen Bedingungen nicht als Doppelstrang-Struktur stabil. Einzelsträngige Nucleinsäuren (z. B. mRNA, Ribozyme, tRNA) bilden oft intramolekulare Doppelstrang-Bereiche aus, die für ihre biologische Funktion wichtig sind. Schließlich wird zur Sterilisierung von biologischen Proben oft eine Autoklavierung unter hohen Temperatur- und Druckbedingungen verwendet; unter diesen Bedingungen sind doppelsträngige Nucleinsäurestrukturen jedoch nicht mehr stabil und liegen einzelsträngig vor.

Nach dem Stand der Technik sind nur wenige Agentien bekannt, die das Schmelzverhalten von doppelsträngiger DNA modulieren; dazu gehören beispielsweise hochkonzentrierte Salzlösungen. Diese sind jedoch für viele Anwendungen, z. B. im medizinischen Bereich, ungeeignet, da keine dauerhafte, direkte Wechselwirkung vorliegt.

Des weiteren ist aus der Literatur ein aus *Sulfolobus acidocaldarius* gewonnenes Sac7d-Protein bekannt, welches doppelsträngige Nucleinsäuren stabilisiert und gegen thermisches Aufspalten schützt (Biochemistry 34, 1995). Aufgrund der Schmelztemperatur von 92,7°C ist das rekombinant hergestellte Sac7d bei typischen technischen Prozessen wie der Polymerase-Kettenreaktion, bei der Aufschmelzprozesse bei 95°C durchgeführt werden, bzw. bei der Autoklavierung oder Hybridisierung nicht mehr stabil und somit nicht einsetzbar. Anzumerken ist gleichfalls, daß die Stabilität von nativem und rekombinantem Sac7d-Protein außergewöhnlich unterschiedlich ist, welches auf Heterogenitäten in der Herstellung und der Aufarbeitung des Proteins hinweist. Natives Sac7 ist weiterhin sehr heterogen. Darüber hinaus ist Sac7d bei rekombinanter Herstellung nach der Literatur toxisch, was eine geringe Ausbeute bei der rekombinanten Herstellung und Aufarbeitung zur Folge hat (1 mg Sac7d aus 1 g *E. coli*-Zellmasse).

Der im Patentanspruch 1 angegebenen Erfindung liegt das Problem zugrunde, die genannten Nachteile des Standes der Technik zu beseitigen, ein einfach und kostengünstig herzustellendes Agens bereitzustellen, das doppelsträngige Nucleinsäuren vor thermisch und physikochemisch induziertem Aufschmelzen schützt und die Doppelstrangstruktur auch unter Bedingungen in technischen Prozessen erhält, bei deren Temperaturbereichen diese normalerweise nicht mehr gegeben ist.

Dieses Problem wird gemäß Patentanspruch 1 dadurch gelöst, daß ein Agens verwendet wird, das aus dem hyperthermophilen Organismus *Thermotoga maritima* stammt, einem bei Umgebungstemperaturen von 75 bis 90°C existierenden Lebewesen. Vorzugsweise werden dabei histonähnliche Proteine verwendet. Histone sind DNA-bindende Proteine in eukaryontischen Zellkernen, die DNA innerhalb des Zellkerns verringern. Histonähnliche Proteine erfüllen eine analoge Aufgabe in den einfacher strukturierten (kernlosen) prokaryontischen Organismen.

Es konnte nachgewiesen werden, daß das DNA-bindende, histonähnliche Protein HU aus dem Eubakterium *Thermotoga maritima* (Gattung *Thermotogales*), dessen optimale Wachstumstemperatur bei 85°C liegt, doppelsträngige DNA bindet und kondensiert. Ein wesentlicher Vorteil der Erfindung besteht darin, daß durch das genannte Protein eine typische doppelsträngige Nucleinsäure, bestehend aus z. B. alternierenden Adenin-Thymin-Basenpaaren, derart stabilisiert wird, daß der Schmelzpunkt von ursprünglich 31°C auf 78°C (also um 47°C) erhöht wird.

Eine extrem hohe Kooperativität der Bindung an Nucleinsäuren (Hill-Koeffizient > 7 für DNA > 56 bp) ermöglicht es im relevanten Konzentrationsbereich, die Beladung der Nucleinsäuren mit TmHU sehr schnell und effizient durchzuführen. Eine derartige kooperative Bindung ist für das vorbeschriebene Sac7 nicht gegeben.

Weitere signifikante Unterschiede bestehen im Fehlen von absorbierenden Gruppen bei TmHU im UV-Bereich von 260 bis 300 nm. Dies ermöglicht eine einfache Durchführung spektroskopischer Charakterisierungen bezüglich Kontamination durch Proteine oder Nucleinsäuren bzw. eine spektroskopische Analytik der an TmHU gebundenen Nucleinsäuren. Sac7 absorbiert dagegen wie die meisten anderen Proteine in diesem Spektralbereich.

Als vorteilhaft hat sich erwiesen, daß sich das histonähnliche Protein in sehr hoher Ausbeute rekombinant im Bakterium *Escherichia coli* herstellen und einfach sowie kostengünstig auf bekannte Art und Weise in reiner Form isolieren läßt (20 mg TmHU aus 1 g *E. coli*-Zellmasse). Der hyperthermophile Ursprung macht beispielsweise eine Aufarbeitung

und Lagerung des Proteins unter Tieftemperatur-Bedingungen überflüssig. Darüber hinaus geschieht der primäre Schritt der Reinigung, die Trennung des HU-Proteins von der Masse der *Escherichia coli*-Wirtsproteine, durch eine einfache Hitzefällung, bei der das thermostabile HU-Protein in Lösung bleibt.

Beispiele

5

1) Klonierung, rekombinante Expression in *Escherichia coli* und Reinigung des Proteins HU von *Thermotoga maritima*

Nach dem Stand der Technik ist die heterologe Expression einer klonierten DNA-Sequenz in einer prokaryontischen Wirtszelle bekannt. Durch Durchführen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit den Oligonukleotid-Primern TmHU-N (5'-GGG GGT CAT ATG AAC AAA AAA GAA CTG ATC GAC AGG GTG G-3') und TmHU-C (5'-TTC CCG ATC CCT ATC ACT TGA CCT TCT CTT TGA GGG C-3') auf genomische DNA aus dem Organismus *Thermotoga maritima* kann ein 300 bp-Fragment amplifiziert und mit Standardtechniken (siehe dazu Sambrook et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press) in den prokaryontischen Expressionsvektor pET11a (Fa. Novagen) einkloniert werden. Nach Transformation des Plasmids in *E. coli*-Zellen des Stammes BL21 (DE3) (Fa. Novagen) und Selektion auf ampicillinresistenten LB-Agarplatten wird eine Vorkultur von LB-Medium, das 100 µg/ml Ampicillin enthält, mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Diese Vorkultur wird im Verhältnis 1 : 100 in die Hauptkultur, bestehend aus dem gleichen Medium, verdünnt. Die Hauptkultur wird bei 37°C im Schüttelschrank inkubiert, bis die Absorption der Bakteriensuspension bei einer Wellenlänge von 600 nm den Wert 1.0 erreicht. Die Expression des *Thermotoga maritima* HU-Gens (TmHU) wird durch Zugabe von 1 mM Isopropylthiogalactosid (IPTG) induziert.

Nach einer weiteren Wachstumszeit von eineinhalb Stunden werden die Zellen durch Zentrifugation (6000 g, 15 min, 4°C) abgetrennt, in einem Resuspensionspuffer (50 mM Natriumphosphat, pH 7.5, 300 mM Natriumchlorid, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF) aufgenommen und anschließend durch Hochdruckhomogenisierung aufgeschlossen. TmHU bleibt dabei zum größten Teil im löslichen Überstand des Zellaufschlusses. Nach Zugabe von Benzonase (Fa. Merck) wird der Zellaufschluß für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um DNA und RNA enzymatisch abzubauen.

Nach Zentrifugation zur Trennung der löslichen von den unlöslichen Bestandteilen (50000 g, 1 h, 4°C) wird der Überstand für 20 min auf 80°C erhitzt. Dabei wird der größte Teil der Wirtsproteine denaturiert und fällt als unlösliches Präzipitat aus. Das thermostabile Protein TmHU liegt nach erneuter Zentrifugation bei 50000 g in angereicherter Form im Überstand vor.

Im nachfolgenden Reinigungsschritt wird dieser Überstand durch eine Kationenaustauschchromatographie mit einer Säule vom Typ Poros HS (Fa. Perseptive Biosystems) aufgereinigt. Unter den Bedingungen des Resuspensionspuffers bindet TmHU an die Kationentauschersäule. Nach Anlegen eines linearen Salzgradienten von 0.3 bis 2.0 M NaCl kann TmHU von den restlichen, noch verbliebenen Verunreinigungen chromatographisch separiert werden. **Fig. 1** zeigt die Effizienz der einzelnen Reinigungsschritte mit Hilfe eines 18%igen SDS-Polyacrylamidgels.

Durch das hier dargestellte Verfahren kann das unter Nativbedingungen als Dimer vorliegende TmHU in spektroskopisch reiner Form mit einer Ausbeute von etwa 20 mg je Liter *E. coli*-Kultur gewonnen werden.

2) Nachweis der DNA-bindenden Eigenschaften von TmHU

Ein 60 bp-DNA-Fragment wird über 2 Primer, von denen einer biotinyliert ist, mit PCR-Technik amplifiziert und die entstehende doppelsträngige DNA an einem Streptavidin-Chip immobilisiert. Mittels Oberflächen-Plasmonresonanz (SPR), bestimmt durch ein BIACore-Gerät (Fa. Biacore AB), kann die Bindung von TmHU an die immobilisierte DNA gemessen werden. Dabei wird TmHU in verschiedenen Konzentrationen in einem Puffer, der 50 mM Natriumphosphat, pH 7.5, und 100 mM Natriumchlorid enthält, in die Flußzelle des DNA-Chips injiziert und das SPR-Signal aufgezeichnet. Die Plateaus der Signale sind direkt proportional zur gebundenen Menge an TmHU. Eine Auftragung des SPR-Signals gegen die Konzentration des nicht-gebundenen TmHU ergibt eine sigmoide Kurve (**Fig. 2**), die charakteristisch für eine kooperative Bindung ist. Der Übergangsmittelpunkt dieser Kurve, das ist definitionsgemäß die Dissoziationskonstante K_D , liegt dabei bei einer TmHU-Dimerkonzentration von 75 nM.

3) Schutz eines synthetischen DNA-Fragmentes vor thermisch induziertem Aufschmelzen

Bei den nachfolgend beschriebenen Schmelzversuchen wird stets synthetische DNA, Poly-dAdT (Fa. Sigma), verwendet. Jeweils 12 µg dieser DNA wird mit 0, 13, 26 und 50 µg TmHU in insgesamt 600 µl Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) gelöst und über Nacht gegen einen Puffer dialysiert, der 5 mM Natriumcacodylat, pH 7.0, und 0.2 mM EDTA enthält.

Das thermische Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA wird durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm verfolgt; dabei nimmt im Verlauf des Aufschmelzens die Absorption zu. Die jeweilige Probe wird in einem UV-VIS-Spektrometer mit kontrollierbarem Peltier-Thermoelement im Temperaturbereich zwischen 10 und 90°C aufgeheizt (Heizrate 0.5°C/min). Die so erhaltenen Schmelzkurven werden nach dem üblichen Normalisierungsverfahren ausgewertet. **Fig. 3** zeigt normalisierte Schmelzkurven bei steigender Konzentration an TmHU. Erkennbar ist jeweils (i) ein thermischer Übergang bei 31°C, der das Aufschmelzen ungeschützter Doppelstrang-DNA repräsentiert; sowie (ii) ein thermischer Übergang bei 78°C, dessen Amplitude mit der eingesetzten TmHU-Konzentration korreliert ist. Bei diesem zweiten Übergang handelt es sich somit um das Aufschmelzen von Doppelstrang-DNA, die durch TmHU geschützt ist.

Das Beispiel zeigt, daß nach Zugabe von TmHU zu doppelsträngiger DNA diese erheblich gegen thermisches Aufschmelzen stabilisiert werden kann; im angegebenen Beispiel wird eine thermische Stabilisierung von 47°C erreicht.

Kodierende Gensequenz von TmHU:

5 ATGAACAAAA AAGAACTGAT CGACAGGGTG GCGAAGAAAG CAGGTGCGAA
 GAAAAAGGAT GTAAAATTGA TTCTCGACAC CATCCTTGAA ACGATCACAG
 AAGCTCTCGC AAAGGGTGAA AAGGTTTCTG TCGTTGGATT CGGAAGCTTC
 GAAGTGAGGA AGGCCGCTGC AAGAAAAGGC GTGAATCCTC AGACAAGAAA
 10 ACCCATCACC ATTCCCGAAA GAAAGGTCCC GAAGTTCAA CCCGGAAAAG
 CCCTCAAAGA GAAGGTCAAG

Aminosäuresequenz von TmHU:

15 MNKKELIDRV AKKAGAKKKD VKLILDTILE TITEALAKGE KVQIVGFGSF
 EVRKAAARKG VNPQTRKPIT IPERKVPKFK PGKALKEKVK

Patentansprüche

- 20 1. Verfahren zur Stabilisierung von doppelsträngigen Nukleinsäuren, **dadurch gekennzeichnet**, daß doppelsträngige Nukleinsäuren mit unspezifisch oder spezifisch bindendem HU-Protein der Aminosäuresequenz MNKKELIDRV AKKAGAKKKD VKLILDTILE TITEALAKGE KVQIVGFGSF EVRKAAARKG VNPQTRKPIT IPERKVPKFK PGKALKEKVK inkubiert werden.
- 25 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein mit der doppelsträngigen Nukleinsäure in direkte Wechselwirkungen tritt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein rekombinant exprimiert wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Doppelsträngigkeit von DNA stabilisiert wird.
- 30 5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Doppelsträngigkeit von RNA stabilisiert wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß ein doppelsträngiges Hybrid aus RNA und DNA stabilisiert wird.
- 35 7. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß ein synthetisches Nukleinsäureanalogon wie PNA (Peptide Nucleic Acid) stabilisiert wird.
8. Verfahren nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß intramolekulare Basenpaarungen einer Einzelstrang-Nukleinsäure stabilisiert werden.
9. Verfahren zur Stabilisierung von doppelsträngigen Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß bei thermisch oder physikochemisch aufgeschmolzenen Nukleinsäuren nach Zugabe des Proteins gemäß Anspruch 1 die doppelsträngige Basenpaarung wiederhergestellt und stabilisiert wird.
- 40

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

45

50

55

60

65

- Leerseite -

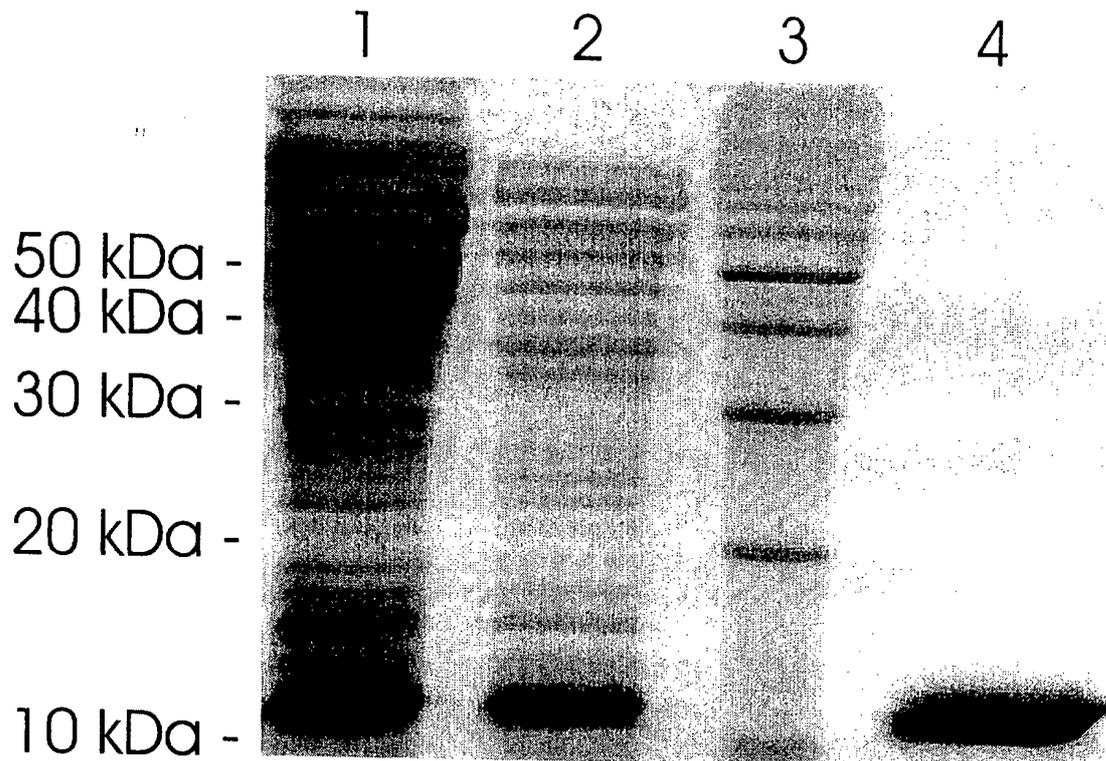


Fig. 1: Reinigung von TmHU nach rekombinanter Expression in *Escherichia coli*. Bahn 1, Zell-Rohextrakt; Bahn 2, Überstand nach Hitzefällung und Zentrifugation; Bahn 3, Molekularmassenstandard; Bahn 4, Eluat des Kationentauschers (gereinigtes TmHU-Protein).

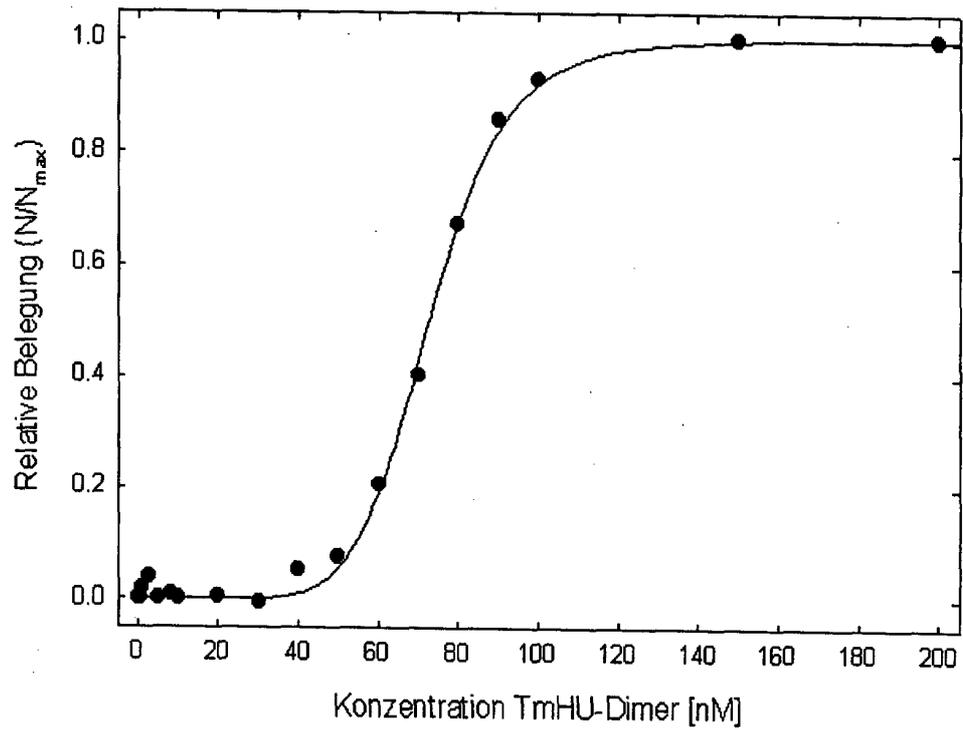


Fig. 2: Bindung von TmHU an ein DNA-Fragment. Gezeigt ist die relative Belegung des immobilisierten DNA-Fragmentes in Abhängigkeit von der Konzentration an nicht-gebundenem TmHU-Dimer.

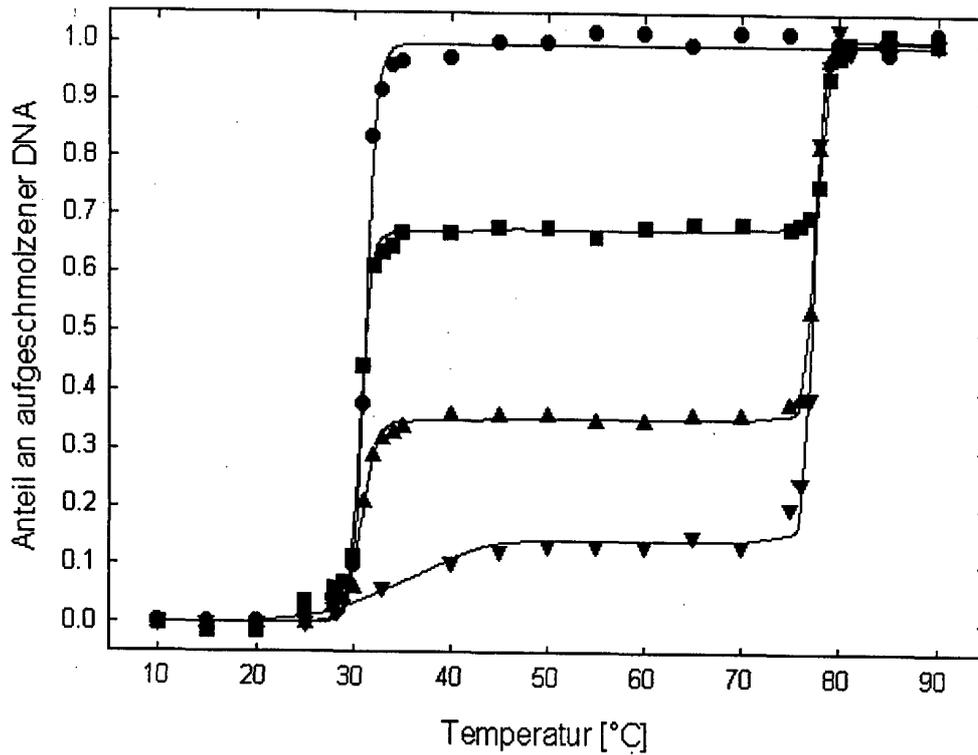


Fig. 3: Schmelzkurven von doppelsträngiger DNA, sowie Schutz der DNA vor dem Aufschmelzen nach Zugabe von steigenden Mengen von TmHU. (●), 0 µg TmHU pro 12 µg DNA; (■), 13 µg TmHU pro 12 µg DNA; (♦), 26 µg TmHU pro 12 µg DNA; (▼), 50 µg TmHU pro 12 µg DNA.