

Direkte, programmierbare Detektion epigenetischer Cytosin-Modifikation in DNA durch Nutzung von TALEs

Anwendungsgebiet

Epigenetische Modifikationen an der 5-Position von Cytosin in DNA geben wichtige Hinweise auf Krankheiten wie neurologische Störungen und verschiedenen Arten von Krebs.

Deshalb ist eine einfache und sichere Methode zur Unterscheidung zwischen nicht modifizierten Cytosinresten und modifizierten Cytosinresten (wie z.B. 5-Methyl-Cytosin (^{5m}C) und 5-Hydroxymethyl-Cytosin (^{5hm}C)) für die Diagnose und Therapie von beispielsweise Tumoren unabdingbar. Durch den Einsatz von TALEs (transcription-activator-like effectors) ermöglicht es die vorliegende Erfindung, an benutzerdefinierten Punkten direkt und mit hoher Auflösung Modifikationsstatus und -grad von epigenetischen Cytosin-Modifikationen zu erkennen.

Stand der Technik

Bislang sind unterschiedlichste Methoden zur Erkennung von Cytosin-Modifikationen im Einsatz, wie die Bisulfit-Konversion oder Antikörperbasierte Methoden (z.B. (h)MeDIP). Diese Methoden sind indirekt, d.h. sie bieten keine inhärente, programmierbare Sequenz-Selektivität. Zudem erfordern sie harsche Bedingungen und sind optimierungintensiv (Bisulfit) oder liefern nur qualitative Informationen mit niedriger Auflösung ((h)MeDIP).

Innovation

Wissenschaftler der Universität Konstanz entwickelten nun ein Verfahren, mit dem direkt, d.h. ohne vorherige chemische Modifikation der Proben-DNA, der epigenetische Modifikationsstatus an der 5-Position von Cytosin (wie ^{5m}C und ^{5hm}C) in beliebigen, durch den Anwender definierten Sequenzen detektiert werden kann.

Hierbei machen sich die Erfinder die Eigenschaft von TALEs (transcription-activator-like effectors) zu Nutze, doppelsträngige DNA mit frei wählbarer Sequenz erkennen zu können. Durch ihre hohe Modularität und Flexibilität können TALEs so aufgebaut werden, dass sie in einer DNA-Probe an eine spezifische Zielsequenz binden. Die Erkennung der Zielsequenz findet über 2 Aminosäurereste pro Modul statt (repeat variable diresidue oder RVD).

Die Erfinder haben TALEs so programmiert, dass sie sequenz- und punktspezifisch an eine Region des DNA-Moleküls binden, die den Cytosinrest beinhaltet. Da der Modifikationsstatus an der 5-Position von Cytosin die Bindungsaffinität der RVD beeinflusst, findet die Bindung nicht statt, wenn der modifizierte Cytosinrest ^{5m}C oder ^{5hm}C vorliegt. DNA-Polymerase wird zum Nachweis der Bindung genutzt.

Auf diese Weise wird nicht nur das Vorhandensein von ^{5m}C oder ^{5hm}C geprüft, sondern auch der Grad der Modifikation.

Ihre Vorteile auf einen Blick

- ✓ Direkte, Bisulfit-freie Detektion von Cytosin-5-Modifikationen in DNA-Molekülen
- ✓ Erkennung an benutzerdefinierten genomischen Lokationen durch inhärente, programmierbare Sequenz-Selektivität
- ✓ Einfache, direkte Nachweismethode mit hoher Auflösung
- ✓ Quantitative Bestimmung des Modifikationsgrades möglich
- ✓ Kombinierbar mit einer Vielzahl von Nachweisverfahren
- ✓ Möglichkeit der In-vivo- und In-vitro-Detektion

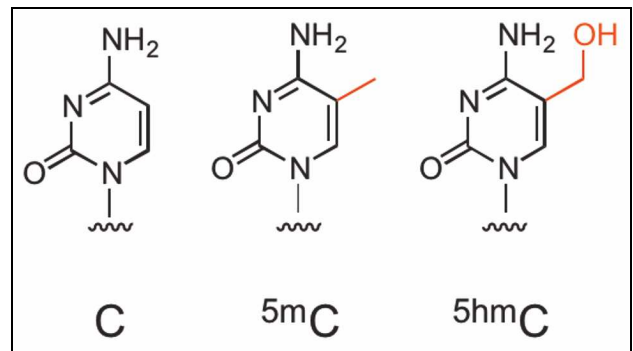


Abbildung: Cytosin-Modifikationen

Technologietransfer

Die Technologie-Lizenz-Büro GmbH ist mit der Verwertung der Technologie beauftragt und bietet Unternehmen die Möglichkeit der Lizenznahme.

Patent-Portfolio

Patente in Europa und den USA sind anhängig.

Kontakt

Sebastian Schilling, MSc

schilling@tlb.de

Technologie-Lizenz-Büro (TLB)

der Baden-Württembergischen Hochschulen GmbH

Ettlinger Straße 25, D-76137 Karlsruhe

Tel. 0721 79004-0, Fax 0721 79004-79

www.tlb.de

Referenz-Nummer: 13/014TLB