

Frankfurt – DNA-Doppelstrangbruch-Forschung Segensreich

■ Ivan Dikic und seine Mitarbeiter entwickelten eine Methode zur Markierung von DNA-Doppelstrangbrüchen, die wie ein Stoßgebet klingt.

BLESS – eine griffige Abkürzung für eine coole Methode: *direct in situ breaks labeling, enrichment on streptavidin and next-generation sequencing*. Klingt kompliziert, ist es aber nicht. „Es sind nur klassische molekularbiologische Methoden, die wir einfach in die richtige Reihenfolge gebracht haben“, meint Ivan Dikic, Direktor des Instituts für Biochemie II an der Uni Frankfurt.

Unter Dikics Fittiche entwickelte sein ehemaliger Postdoc Nicola Crosetto zusam-

aber indirekt über daran gebundene Proteine identifiziert. „Ich war damals kein ChIP-Experte, wusste aber, dass diese Ansätze keine sehr hohe Sensitivität und Spezifität besitzen, sondern häufig starke Hintergrundsignale produzieren“, erzählt Crosetto. „Ich arbeitete damals mit Proteinen, die entscheidend für die Erhaltung der Genomstabilität sind. In Experimenten mit einer Knockout-Maus des Werner-*helicase interacting protein* Wrnip1 beobachtete ich eine massive Anhäufung von Doppelstrangbrüchen in der DNA und wollte wissen, wo genau sich diese Brüche im Genom ereignen.“ (Wrnip1 spielt eine Rolle bei der Entstehung des Werner-Syndroms, einem Chromosomenbruchsyndrom, das zu frühzeitig einsetzenden Alterungsprozessen in verschiedenen Körpergeweben führt.)

Eine Methode musste also her, die ver-

Bruchstellen mit Hilfe einer DNA-Ligase *in situ* an einen proximalen Linker (P-Linker) gekoppelt. Dieser zunächst einzelsträngige DNA-Linker faltet sich zu einer Haarnadel-Struktur. Dadurch entsteht ein doppelsträngiges, ligierbares Ende, das sich zusätzlich durch eine Barcode-Sequenz auszeichnet. Diese Sequenz ist eindeutig als nicht-human identifizierbar und für die spätere DNA-Sequenzierung von Bedeutung. Die DNA-Ligase kann die zwei freien, doppelsträngigen DNA-Stränge des Linkers und der DNA-Bruchstelle nun miteinander verknüpfen.

„Diese *in situ*-Ligation ist der Trick. Wir markieren die Doppelstrangbrüche, bevor irgendwelche zusätzlichen Brüche durch die weitere Präparation in der DNA entstehen können. Sie war deshalb zu Beginn auch meine größte Sorge“, erzählt



Nicola Crosetto mit Kollegin und Ehefrau Magda.



Ivan Dikic und Koraljka Husnjak

men mit Magda Bienko, einer polnischen Biotechnologiestudentin – mittlerweile mit Nicola Crosetto verheiratet und als Postdoc am MIT in Boston – die Idee für eine Methode, mit der gezielt Brüche in der doppelsträngigen DNA markiert und bis auf das Nukleotid genau identifiziert werden können.

Derartige Methoden gab es zwar bereits – bei den meist verwendeten ChIP-Technologien (Chromatin-Immunpräzipitation) werden DNA-Doppelstrangbrüche

lässlich und spezifisch die fragilen Regionen in der DNA identifizieren konnte und das möglichst simpel. „Kurz nach Weihnachten 2008, während eines Besuches bei meinen Schwiegereltern, kam mir eines Morgens die Idee“, erinnert sich Crosetto.

Am Anfang war der Trick

Zunächst wird die DNA aus den Zellkernen isoliert. Anschließend werden die freien DNA-Enden an den zu identifizierenden

Crosetto. „Dass sie so gut funktionierte, hat mich überrascht.“ Nun kann die DNA weiter prozessiert und in kleinere Fragmente zerlegt werden. Mit Hilfe eines Biotin-Moleküls am P-Linker können die markierten DNA-Fragmente über eine Streptavidin-Matrix von nicht-markierten DNA-Fragmenten getrennt und gereinigt werden. Die freien Enden der „gefischten“ Fragmente werden durch einen distalen Linker (D-Linker) gebunden, der ebenfalls eine Barcode-Sequenz besitzt. Ein Enzym

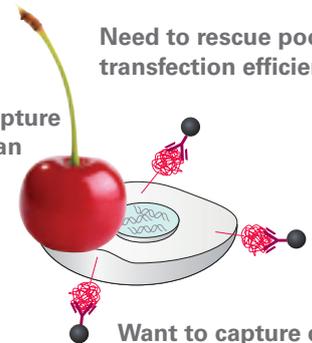
Capture, Sort and Enrich Cells in < 2 hr

No easy access to a FACS sorter?

Want to capture cells with an active promoter?

Need to rescue poor transfection efficiency?

Want to capture cells expressing your protein of interest?



CherryPicker™ Systems can help!

Find out more at



www.clontech.com/CherryPicker

entfernt schließlich einen großen Teil der Linker und hinterlässt nur die bekannten Barcodes an der DNA. Über diese können die DNA-Fragmente durch eine PCR amplifiziert und per *Next Generation Sequencing* identifiziert werden.

„Weil während der Sequenzierung auch viele kontaminierende humane Sequenzen auftauchen, bilden die Barcodes wichtige und identifizierbare Markierungen der Stellen, an denen zum einen die *in situ*-Ligation mit dem P-Linker erfolgte und zum anderen die spätere Bindung des D-Linkers stattfand“, verdeutlicht Crosetto. Im Rückschluss muss in einem sequenzierten und identifizierten humanen DNA-Fragment, das beide Barcodes aufweist, im Genom ein DNA-Doppelstrangbruch gewesen sein.

Die meiste Zeit, erinnert sich Dikic, mussten die Wissenschaftler für die Entwicklung der Kontrollen aufwenden. „Es war ein hartes Stück Arbeit, aus BLESS eine sensitive, vor allem aber auch verlässliche Methode zu machen.“ Verschiedene Ansätze sollten zeigen, dass BLESS tatsächlich funktioniert und spezifisch die Orte der DNA-Doppelstrangbrüche nachweisen kann. Ein wichtiger Validierungstest wurde in U2OS-Zellen durchgeführt. „Diese Zellen wurden genetisch so manipuliert, dass man leicht mit einem Enzym (SceI) einen Doppelstrangbruch an einem ganz bestimmten Genort (in der I-SceI-Kassette) einfügen kann“, erklärt Crosetto. Unter den klonierten und sequenzierten BLESS-Fragmenten befand sich der betroffene Genort in 13.000-fach erhöhter Dichte im Vergleich zum restlichen Genom.

„Ich war so glücklich“, grinst der Postdoc. „Endlich war ich sicher, dass meine Methode funktionieren kann.“ In Zusammenarbeit mit Philippe Pasero und Maria Joao-Silva aus Montpellier – Experten auf dem Feld der DNA-Replikation – bestätigten sie die Zuverlässigkeit ihrer Ergebnisse aus einer genomweiten BLESS-Kartierung von DNA-Doppelstrangbrüchen, die durch zellulären Stress bei der DNA-Replikation induziert wurden, zusätzlich durch eine zweite Methode namens gH2AX-ChIP.

Bless the Teamwork

Insgesamt dauerte es fast fünf Jahre, bis BLESS vollständig ausgereift und publizierbar war (*Nat Methods* 2013, 10(4):361-5). In dieser Zeit entdeckte Crosetto auch seine Leidenschaft für das Austüfteln von Methoden – „eine der spannendsten und besten Phasen meiner wissenschaftlichen Karriere“, erzählt Crosetto. „Hätte mir Ivan nicht den Freiraum zum Probieren gelassen, hätte ich BLESS nicht

etablieren können.“ Auch Dikic schwärmt von den vergangenen Jahren. „Bevor wir überhaupt die ersten Testversuche für BLESS gemacht haben, hatten Nicola und ich tolle Diskussionen. Er ist sehr kreativ. Außerdem waren wir bei der Entwicklung von BLESS auf ein großes Netzwerk an Kollaborationen angewiesen – zum Beispiel auf die Hilfe der Arbeitsgruppe von Maga Rowicka aus Texas, die die Unmengen an Reads aus der *Next Generation Sequencing*-Analyse der BLESS Fragmente für uns ausgewertet hat.“

„Wir haben keine Plattform entwickelt, um für andere Arbeitsgruppen Proben auszuwerten“, betont Dikic, „sondern jeder kann sich frei zugänglich über BLESS informieren und es selbst anwenden – es ist ja eigentlich ganz einfach.“ Auf der BLESS-Homepage (www.breakome.eu) stellen sie alle Ergebnisse und ausgearbeiteten Protokolle für die Community zusammen. „Es ist toll zu sehen, dass BLESS schon bald nach der Validierung von anderen kollaborierenden Arbeitsgruppen angewendet und reproduziert wurde“, findet Crosetto.

Krebsforscher besonders interessiert

Einer der Anwender ist etwa Krebsforscher Roberto Chiarle vom Kinderkrankenhaus in Boston, der über der Lokalisation von Chromosomentranslokationen in Lymphozyten arbeitet. Derartige Verlagerungen von Chromosomenfragmenten im Genom können dazu führen, dass die Lymphozyten zu Krebszellen transformieren. Zu wissen, wo sich die Translokationen ereignen, soll helfen zu verstehen, wodurch und mit welcher Häufigkeit die krebsauslösenden Mutationen entstehen.

Ein anderer Kooperationspartner von Dikic und Crosetto ist Andre Nussenzweig vom National Cancer Institute in Bethesda. Mit ihm wollen sie sogenannte „früh replizierende fragile Orte“ (early replicating fragile sites, ERFSSs) im Genom von B-Lymphozyten identifizieren. Mehr als 50 Prozent der Chromosomenmutationen, die zu sogenannten diffusen großzelligen B-Lymphomen führen, ereignen sich in solchen ERFSSs.

Die Gruppe arbeitet bereits an der Weiterentwicklung der BLESS-Methode. „Unsere nächste große Herausforderung ist die Entwicklung einer Single-Cell-BLESS-Methode“, erzählt Dikic. Mit ihr wollen die Frankfurter Biochemiker DNA-Doppelstrangbrüche individuell in einzelnen Zellen identifizieren.

JOHANNA FRAUNE

Takara Bio Europe

www.clontech.com

Clontech is a Takara Bio Company

tech@takara-clontech.eu • orders@takara-clontech.eu

Europe: +33 (0)1 3904 6880 • Toll free tel: Austria: 0800 296 141

• Germany: 0800 182 5178 • Switzerland: 0800 563 629

• UK: 0808 234 8063

For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures. Not for resale. CherryPicker, Clontech, the Clontech logo and all other trademarks are the property of Clontech Laboratories, Inc. unless noted otherwise. ©2013 Clontech Laboratories, Inc.



Clontech