

# Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku - část 9

MUDr. Emil Pavlík,

Univerzita Karlova, 1. LF UK, Ústav pro lékařskou mikrobiologii, Praha 2  
a Oddělení molekulárně biologické diagnostiky Ústavu biochemie  
a pathobiochemie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Praha 10

*Od doby, kdy jsme se na začátku našeho seriálu (Labor aktuell CS 4/98 a 1/99) věnovali problematice hybridizačních sond, došlo v jejich využití k významnému posunu, jenž značně rozšiřuje možnosti jejich diagnostického uplatnění. Řada nových produktů se postupně dostává na trh rutinních diagnostik. Považuji tedy za prospěšné, abychom se dnes k této problematice vrátili.*

## PNA - PEPTIDE NUCLEIC ACID

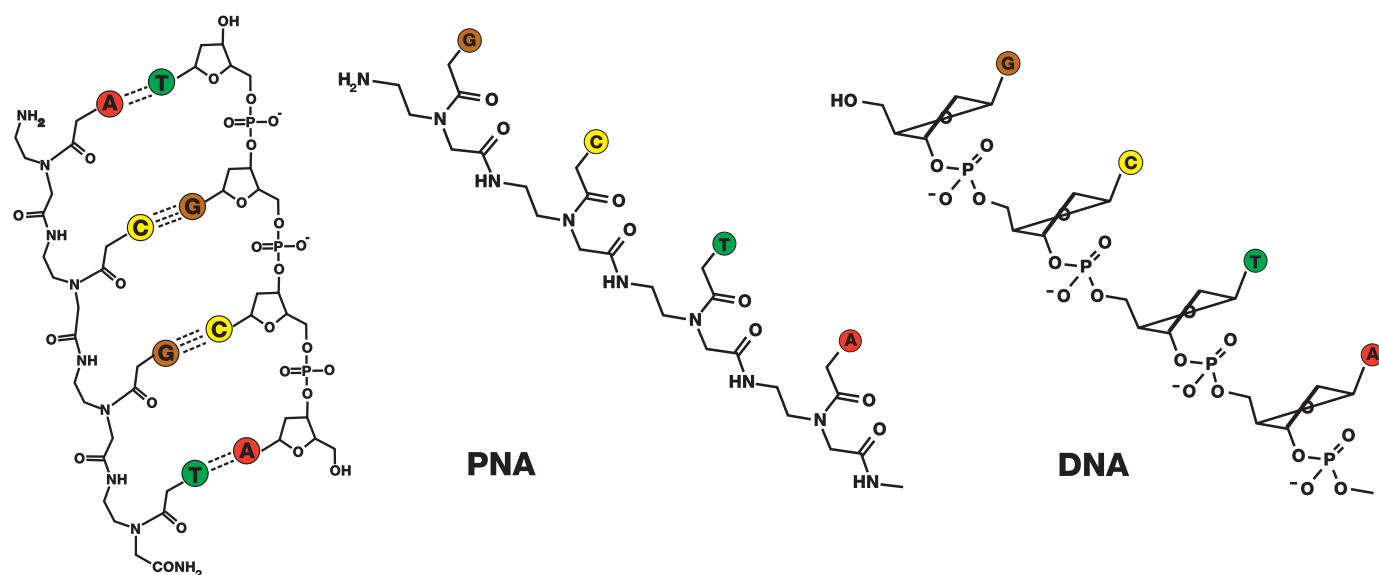
PNA je chemický analogon nukleových kyselin, jehož páteří je arteficiální acyklický achirální neutrální N-(2-aminoethyl) glycinpolyamid. Přestože se tato páteř výrazně liší od pentózové páteře nukleových kyselin (98,99), má PNA základní Wat-

son-Crickovské hybridizační vlastnosti (100). Navíc párování purinových a pyrimidinových bazí podle Watson-Crickova schématu má u PNA ve srovnání s DNA vyšší afinitu a specifitu (101). Proto jsou oligomery PNA přímo ideálně využitelné jako hybridizační sondy v celé škále molekulárně biologických laboratorních technik, ať již jde o bloty (Southern, Northern), hybridizaci in situ, záchytnou hybridizaci (cap-

ture probes) nebo amplifikační metody (101,102), ale i pro řadu dalších aplikací.

Primární chemická struktura PNA v porovnání s primární strukturou DNA je patrná ze vzorců na obrázku č. 1.

Objev Nielsenovy skupiny z roku 1991 byl pro odbornou veřejnost dosti překvapující, neboť je známo, že poměrně malé změny ve struktuře oligonukleotidů jako např. nahrazení atomu kyslíku sírou (fosfothionáty) nebo neutrální methylovou skupinou (methylfosfonáty) vede ke snížení vazebné afinity (103). Důsledkem drastických změn ve struktuře je naopak **zvýšená vazebná afi-**



Obr. 1: Struktura PNA a DNA. Párování bazí mezi PNA a DNA.

nita PNA ke komplementární DNA nebo RNA v porovnání s nemodifikovanými oligonukleotidy.

Vyšší vazebná afinita však není jedinou výhodou PNA. Ta je ve srovnání s nukleovými kyselinami **chemicky stabilnější** a odolná vůči nukleázám. Rovněž neváže proteiny. Lze ji snadno modifikovat a značit. Její rozpustnost při pH 1 je v rozsahu 100  $\mu\text{M}$  až 5 mM, při pH 7 v rozsahu 1-100  $\mu\text{M}$ . U DNA je schopna nahradit část původního řetězce (Strand Displacement). Je schopná vazby jak v paralelní, tak v antiparalelní orientaci. Tendenci k precipitaci a agregaci jeví sekvence s vysokým obsahem purinů a autokomplementární. Agregáty PNA lze však opět rozpustit při teplotě 50°C. PNA lze skladovat při pokojové teplotě a nepoškodí ji ani několikanásobný cyklus zmrazení a rozmrazení. Na druhé straně však má horší průnik do buněk a **neslouží jako substrát pro enzymy** zprostředkávající syntézu DNA nebo RNA. Samotná PNA tak může sloužit pouze jako hybridizační sonda, nikoli jako primer. Na této skutečnosti je založena technika tzv. clampingu, používaná např. k průkazu bodových mutací u hereditárních onemocnění (104).

Z komplementárních komplexů je nejstabilnější dvouřetězcová PNA, komplex PNA/DNA je však stabilnější než dvouřetězcová DNA (105). Stabilitu lze posoudit z údajů uvedených v tabulce č. 2.

Duplexy PNA-DNA nejsou substrátem pro RNasu H.

Průnik PNA do buněk lze zajistit různými postupy: mikroinjektáží, elektroporací, pomocí streptolyzínu O, konjugací PNA s peptidovými nosiči, pomocí protilátek konjugovaných se streptavidinem.

## PNA-DNA CHIMERY

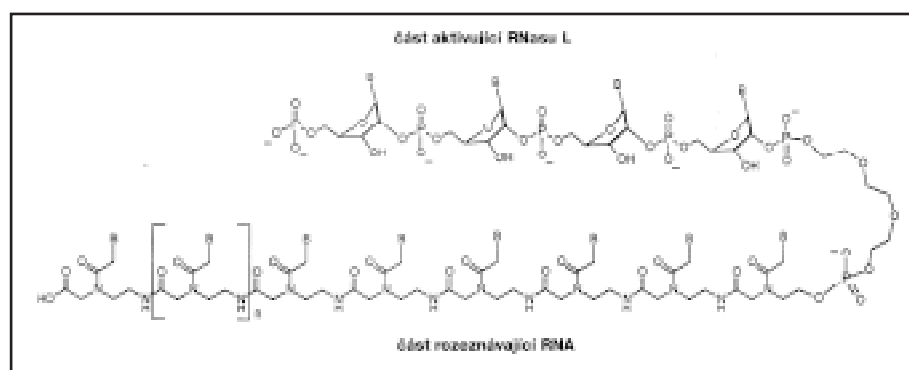
Pokud by fakt, že PNA není substrátem pro enzymy podílející se na syntéze nukleových kyselin, byl na závalu, lze tento „nedostatek“ odstranit použitím tzv. **PNA-DNA chimer**. Kombinace PNA a DNA v jedné

Tab. 2:

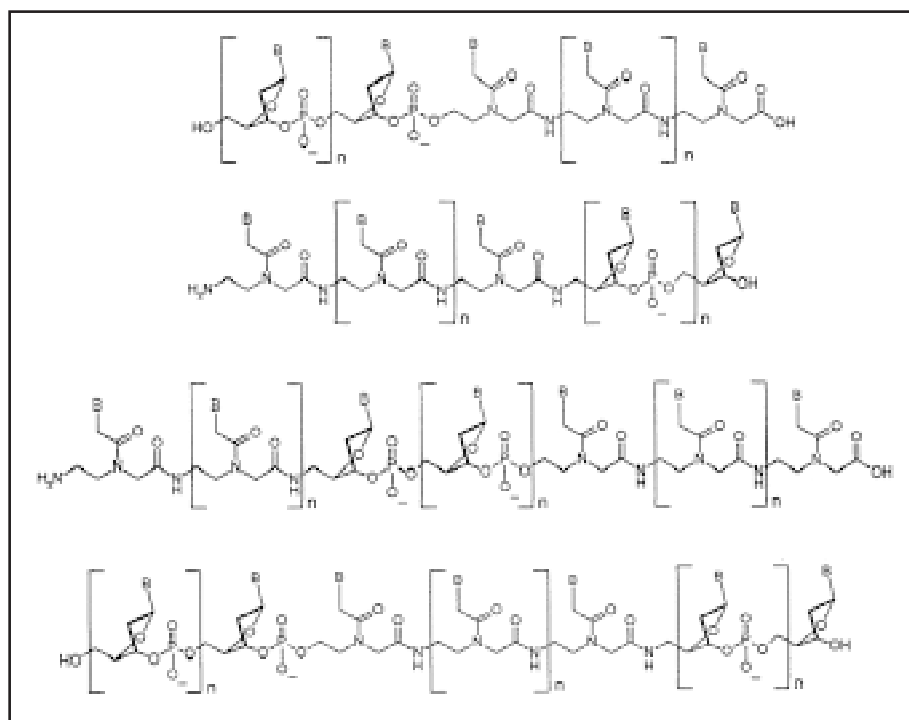
Stabilita a Specifita	
15-mer	$T_M$
PNA/DNA	69.5 °C
PNA/RNA	72.3 °C
DNA/DNA	53.3 °C
$\Delta T_M$ pro mismatch	
PNA/DNA	8-21 °C
DNA/DNA	4-16 °C



Erikson, M. & Nielsen, P.E.  
"Solution structure of a peptide nucleic acid-DNA duplex. Nature Struct. Biol. 3, 410-413 (1996)



Obr. 4: PNA-(2'5')tetraadenylát (Uhlmann et. al. - 106)



Tab. 3: Příklady různých typů PNA/DNA chimer (106)

**molekule** (přesněji v jednom řetězci) přináší řadu nových vlastností. Tyto chimery se v porovnání s čistou PNA vyznačují vyšší rozpustností ve vodě a zvýšeným vstupem do buněk. Navíc se za fyziologických podmínek vážou ke komplementární DNA nebo RNA výlučně **antiparalelně**. Nejvýznamnější však je, že řada enzymů účastnících se syntézy nukleových kyselin rozeznává tyto chimery jako substrát. Proto mohou plnit různé biologické funkce - např. sloužit jako primer pro DNA-polymerasy.

DNA-PNA chimery obsahující více než 4 nukleotidy jsou rovněž schopny stimulovat štěpení (cleavage) RNA RNasou H při tvorbě duplexu RNA s chimerou (106).

Uhlmann a spol. syntetizovali rovněž PNA-(2'5')tetraadenylát. Tato chimera se PNA-sekvencí váže ke komplementárnímu úseku RNA, zatímco (2'5')tetraadenylát indukce buněčnou RNasu L schopnou katalyzovat štěpení RNA od specifické sekvence (106) (Obr. 4).

Příklady různých typů PNA-DNA chimer uvádí tabulka č. 3. Jejich syn-

téza probíhá v automatizovaných syntetizérech rozdílným chemismem, jak je patrné ze schématu na obrázku č.5. Na vazebnou afinitu PNA-DNA chimer k RNA má vliv vzájemný poměr PNA: DNA - viz obrázek č. 6. Při elongaci chimerových primerů se ze 13 zkoušených polymeráz nejlépe osvědčily tyto tři:

KF E. coli, Tth Thermus thermophilus a Pwo Pyrococcus woseii (106). PNA-DNA chimery mohou být rovněž ligovány do dsDNA, musí však obsahovat na 3' konci větší počet nukleotidů. Jeden nukleotid na 3' konci PNA není pro zajištění ligace dostačující.

## FISH - FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION

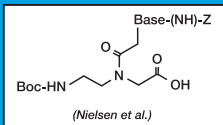
Technika FISH je hybridizační technika nejčastěji používaná při studiu telomer savčích chromosomů (107, 108, 109). PNA hybridizační sondy značené fluorochromem zavedli do FISH např. Chen a spol. (110) a Taneja (111). Mezi první aplikace v lékařské mikrobiologii patří využití této techniky k diferenciaci tuberkulozních a netuberkulozních mykobakterií Rasmussenem a spol. (112). Další PNA-sondy byly použity k detekci ribosomální RNA *Pseudomonas aeruginosa* a některých dalších bakterií.

Rasmussenova assay byla ověřována na 350 nátěrech vyšetřovaných paralelně barvením podle Ziehl-Neelsenova s následnou mikroskopií a FISH-assayí využívající 2 různé PNA-sondy značené fluoresceinem, z nichž jedna se vážala na sekvenci specifickou pro *Mycobacterium tuberculosis* complex a druhá na sekvenci společnou pro 12 nejčastěji se vyskytujících druhů netuberkulozních mykobakterií (MOTT) včetně *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. goodii* a *M. kansasii*. Ke kultivaci mykobakterií bylo použito systému MB-Bact (Organon-Teknica), druhové určení bylo provedeno klasickými biochemickými testy.

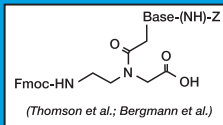
Specifita každé z PNA-sond byla 100 %, sensitivita u MTBC 100 %

### Synthesis of PNA / DNA chimeric molecules

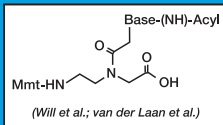
- ▲ BOC chemistry  
- not compatible with DNA synthesis
- ▲ Fmoc chemistry  
- DNA chemistry must be adjusted
- ▲ Monomethoxytrityl chemistry  
- compatible with standard DNA synthesis



(Nielsen et al.)

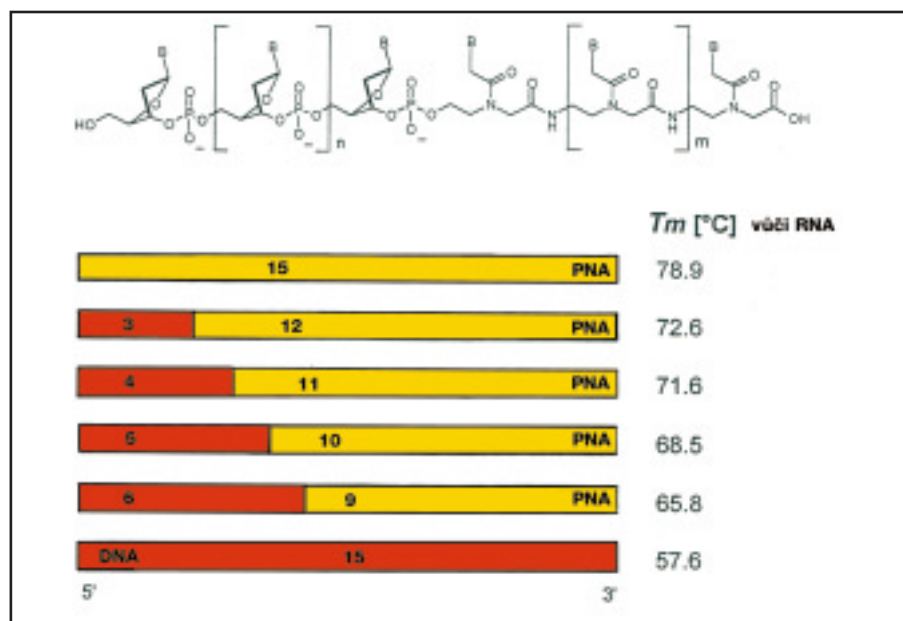


(Thomson et al.; Bergmann et al.)

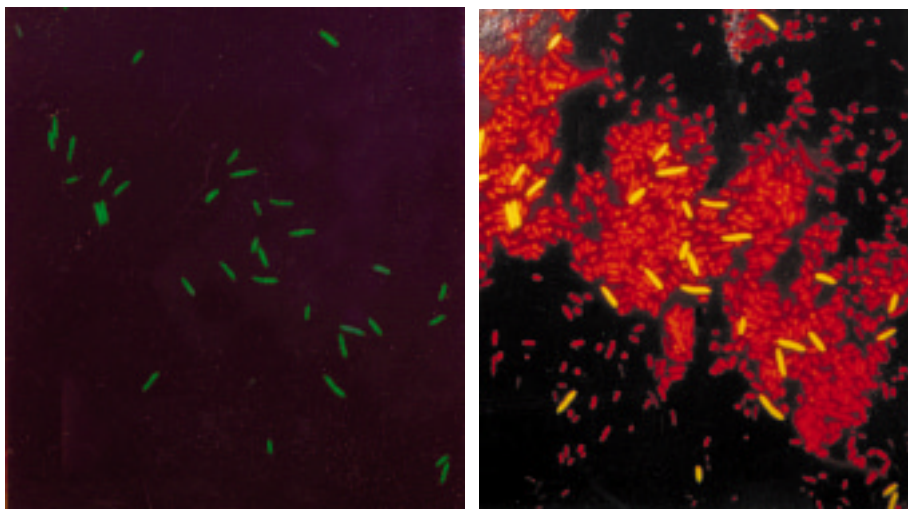


(Will et al.; van der Laan et al.)

Obr. 5: Tři způsoby syntézy PNA/DNA chimer (podle Uhlmann)



Obr. 6: Vliv vzájemného poměru PNA:DNA v chimerách na vazebnou afinitu vůči RNA



Obr. 7: Průkaz rRNA bakterií FISH s PNA sondou. Vlevo použit zelený, vpravo duální filtr.

a MOTT sondy 94%, což bylo způsobeno neschopností sondy detekovat *M. xenopi*.

Cílovou strukturou pro PNA-sondy byla ribosomální RNA. Nebylo použito žádné ošetření stěny mykobakterií pro zajištění penetrace sond. Ty pronikaly skrze bakteriální stěnu díky své hydrofobní povaze. Assay probíhala přímo na sklíčku, jediné přístrojové vybavení představoval fluorescenční mikroskop s duálním červeno-zeleným filtrem. Doba potřebná pro celý průběh vyšetření činila 210 minut. Výhodou FISH assaye kromě jednoduchosti provedení je i vysoká pozitivní prediktivní hodnota.

## RTF-PCR A PNA-CLAMPING

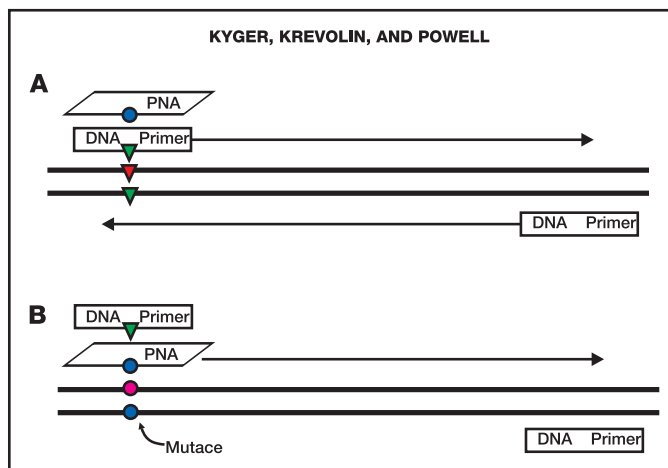
Tuto techniku vyvinuli Kyger, Krevolin a Powell v roce 1998 k detekci genových mutací u hereditární hemochromatózy (104). Je vlastně spojením 3 technologií: PCR v rapid-cykleru, PNA-sond a využití nového fluorescenčního barviva selektivního pro dsDNA - Sybr Green I. Technika využívá LighCycler a je schopna odlišit nemocné hereditární hemochromatózou, nosiče genetické informace a zdravé jedince. Princip metody je patrný z obrázku č. 8. Spočívá v tom, že jeden z dvojice primerů pro amplifikaci DNA je komplementární k úseku, ve kterém se vyskytuje příslušná mutace. Není-

li mutace přítomna, nasedne DNA primer a probíhá normálně amplifikace, což se v LightCycleru projeví fluorescenčním signálem uvolněným Sybr Green I. V případě existence mutace, nasedne na místo primeru pro mutaci komplementární PNA-sonda. Jelikož PNA není substrátem pro polymerasu, amplifikace neproběhne a fluorescenční signál není vyslán.

### Literatura:

98. Nielsen, P.E., Egholm, M., Berg, R.H. and Buchardt, O.: Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine substituted polyamide *Science* 254, p. 1497- 1500, 1991. 99. Egholm, M., Buchardt, O., Nielsen, P.E. and Berg, R.H.: Peptide nucleic acids (PNA) Oligonucleotide analogues with an achiral peptide backbone. *J. Am. Chem. Soc.* 114, p. 1895 - 1897, 1992. 100. Egholm, M. et al.: PNA hybridizes to

complementary nucleotides obeying the Watson-Crick Hydrogen bonding rules. *Nature* 365, p. 566 - 568, 1993. 101. Nielsen, P.E., Egholm, M. and Buchardt, O.: Peptide Nucleic Acid (PNA). A DNA mimic with a peptide backbone. *Bioconjugate Chemistry* 5, p. 3 - 7, 1994. 102. Dueholm, K.L. and Nielsen, P.E.: Chemistry, properties and applications of PNA (Peptide nucleic acid). *New J. Chem.* 21, p. 19 - 31, 1997. 103. Uhlmann, E., Peyman Anusch, Breipohl, G. and D.W. Will: PNA: Synthetic Polyamide Nucleic Acids with Unusual Binding Properties. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37, Wiley-VCH Verlag GmbH Weinheim 1998, p. 2796 - 2823, 1998. 104. Kyger, E.M., Krevolin, M.D. and Powell, M.J.: Detection of the Hereditary Hemochromatosis Gene Mutation by Real-time Fluorescence Polymerase Chain Reaction and Peptide Nucleic Acid Clamping. *Analytical Biochemistry* 260, p. 142-148, 1998. 105. Eriksson, M. and Nielsen, P.E.: Solution structure of a peptide nucleic acid-DNA duplex. *Nature Struct. Biol.* 3, p. 410 - 413, 1996. 106. Uhlmann, E.: PNA/DNA chimeras: Properties and Potential Applications in Therapy and Diagnostics přednáška v rámci Cambridge Healthtech Institute's 7th Annual „Nucleic Acid-based Technologies: DNA/RNA/PNA Diagnostics“ June 1999 Washington, D.C. 107. Landsdorp, P.M. et al.: Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Human Mol. Gen.* 5, p.685 - 691, 1996. 108. Martens, U.M. et al.: Short telomeres on human chromosome 17p. *Nature Genetics* 1998, p. 76 - 80. 109. Landsdorp, P.M. et al.: Telomeres in the haemopoietic system. *Telomeres and telomerase* 1997, p. 209 - 222. 110. Chen, C., Hong, Y.K., Ontiveros, S.D., Egholm, M. and Strauss, W.M.: Single base discrimination of GENP-B repeats on mouse and human Chromosomes with PNA-FISH. *Mamm Genome* 10, p.8 - 13, 1999. 111. Taneja, K.L.: Localization of trinucleotide repeat sequences in myo-



Obr. 8: RTF-PCR a PNA-clamping

tonic dystrophy cells using a single fluorochrome-labelled PNA probe. *BioTechniques* 24, p. 472 - 476, 1998. 112. Rasmussen, O.F. et al.: A PNA-FISH assay for differentiation between tuberculous and nontuberculous mycobacteria in Acid Fast positive cultures. *Cambridge Healthtech Institute's 7th Annual „Nucleic Acid-based Technologies: DNA/RNA/PNA Diagnostics“*, Washington D.C., June 2000