

Eine Fluoreszenzsonde zur quantitativen Detektion der DNA-Polymerase-Reaktion in Echtzeit**

Daniel Summerer und Andreas Marx*

Das Design neuer Assays für das schnelle und parallele Screening von Enzymfunktionen spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung neuer Produkte und Reagenzien für Anwendungen in industriellen Prozessen bis hin zur Diagnostik.^[1] Wirkstoffentwicklung und Protein-Engineering werden dabei zunehmend mit kombinatorischen Ansätzen verfolgt, deren Weiterentwicklung eng an die Entwicklung von Assays geknüpft ist, die ein paralleles Screening gewünschter Enzymeigenschaften im Hochdurchsatz ermöglichen.^[1]

DNA-Polymerasen sind an der gesamten in der Natur stattfindenden DNA-Synthese beteiligt. Ihre entscheidende Rolle in biologischen Schlüsselprozessen hat diese Enzyme zu attraktiven Wirkstoff-Targets gemacht.^[2] DNA-Polymerasen werden außerdem als „Arbeitspferde“ in vielen wichtigen molekularbiologischen Kerntechnologien eingesetzt, z.B. in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), cDNA-Klonierung, Genomsequenzierung und Detektion von Nucleotidvariationen in Genen.^[3,4] Das Auftreten von Wirkstoffresistenzen und die Notwendigkeit, DNA-Polymerasen für neu entstehende Techniken maßzuschneidern – etwa für die zuverlässige genomweite Detektion von Nucleotidvariationen –, verstärkt die Suche nach weiteren Entwicklungen in diese Richtung.^[4,5] Mehrere Ansätze für das Screening von DNA-Polymerasen sind beschrieben worden, die jedoch alle erhebliche Nachteile aufweisen:^[6] Sie umfassen arbeitsintensive gelbasierte Methoden und/oder beruhen auf der Nutzung von radioaktiven Isotopen zur Produktdetektion.^[6a,b] Mehrere fluoreszenzbasierte Testsysteme wurden beschrieben, die allerdings auf bestimmte DNA-Polymerasen (z.B. in der PCR verwendete, thermostabile Enzyme) beschränkt sind,^[7] oder auf der Endpunktbestimmung durch kostenintensive Hilfsreagentien und Proteine zur Signalerzeugung beruhen.^[6c-f]

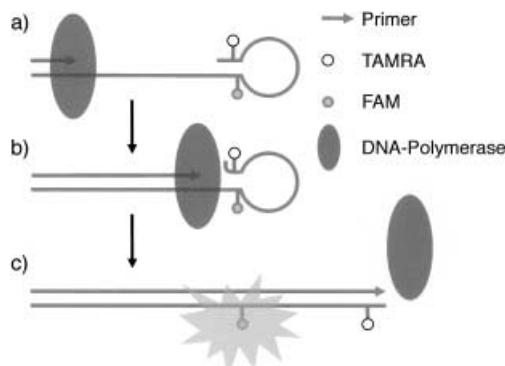
Hier berichten wir über ein neues Screening-System, bei dem das Voranschreiten der DNA-Synthese in Echtzeit durch ein Fluoreszenzsignal detektiert wird. Die beschriebene Methode nutzt kommerziell erhältliche Reagenzien und ermöglicht die quantitative Detektion der enzymatischen DNA-Synthese im Mikrotiterplatten-Format auch in Rohlysaten von DNA-Polymerase-überexprimierenden Zellen. Das vorgestellte Testsystem übertrifft bekannte Screening-Methoden für diese wichtigen Enzyme.

[*] Dr. A. Marx, Dipl.-Chem. D. Summerer
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Universität Bonn
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)
Fax: (+49) 228-73-5388
E-mail: a.marx@uni-bonn.de

[**] Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit, Dr. S. Brakmann für die Bereitstellung des Plasmids pQKlenowExo⁻ und Prof. Dr. M. Famulok für seine fortwährende Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Wir entwarfen ein DNA-Reportermolekül in der Weise, dass der Templatstrang eine stabile Haarnadelstruktur bildet (Schema 1a). Der Doppelstrangbereich ist mit einem Farbstoff (Carboxyfluorescein, FAM) ausgestattet, dessen Fluoreszenz durch Resonanz-Energietransfer (RET) zu einer



Schema 1. Design des Testsystems zur Echtzeitdetektion der DNA-Polymerase-Reaktion. a) Die mit einem Fluorophor (Carboxyfluorescein, FAM) und einer Aczeptoreinheit (*N,N'*-Tetramethylrhodamin, TAMRA) markierte Templatsonde weist vor Beginn der Reaktion eine Haarnadelverlängerung in geschlossener Konformation auf. b) Beim Voranschreiten der Verlängerung öffnet die DNA-Polymerase den Doppelstrangbereich und verhindert die Rückfaltung durch Duplexbildung. c) Die Vergrößerung des Abstands zwischen den beiden Farbstoffsubstituenten wird durch eine Wiederherstellung der FAM-Emission ausgelesen.

durch die Haarnadelstruktur in räumliche Nähe gebrachten Aczeptoreinheit (*N,N'*-Tetramethylrhodamin, TAMRA) gelöscht wird.^[8,9] Fluoreszenz- und Aczeptoreinheit sind beide an die C5-Position von 2'-Desoxyuridinen geknüpft, die von DNA-Polymerasen passiert werden können.^[10] Ein verlängertes 3'-Ende des Haarnadeltemplates ermöglicht die Bindung eines Primerstranges an seine komplementäre Stelle (Schema 1b). Eine DNA-Polymerase löst die Öffnung des Haarnadel-Doppelstrangbereichs mit fortschreitender Primerverlängerung aus. Dies resultiert in einer räumlichen Trennung von Fluoreszenz- und Aczeptoreinheit und führt zu einer Wiederherstellung der FAM-Emission (Schema 1c).

Zunächst testeten wir das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* (exo⁻-Mutante, KF⁻), ein Enzym, das als Modell für Mechanismen und Funktion von DNA-Polymerasen intensiv genutzt wird.^[11] Wir führten Primerverlängerungsreaktionen im 96-Well-Plate-Format mit einem Fluoreszenz-Kinetik-Lesegerät mit automatisierter Flüssigkeitsinjektion aus. Standardreaktionen wurden durch Zugabe von MgCl₂ zu einer Lösung aus DNA-Polymerase und Haarnadeltemplat-Primer-Komplex im geeigneten Reaktionspuffer unter Verwendung aller vier Desoxynucleosidtriphosphate (dNTPs) gestartet. Die Reaktion wurde durch zeitliche Messung der FAM-Fluoreszenzintensität verfolgt. Abbildung 1a zeigt den Anstieg der Fluoreszenz mit zunehmender Reaktionszeit und belegt die Anwendbarkeit des Konzepts. In Blindreaktionen ohne dNTP, Magnesiumionen oder Enzym wurde jeweils kein Anstieg der Fluoreszenz beobachtet, was stark darauf hinweist, dass die zeitabhängige Signalerzeugung tatsächlich auf die Wirkung der DNA-Polymerase zurückzuführen ist.

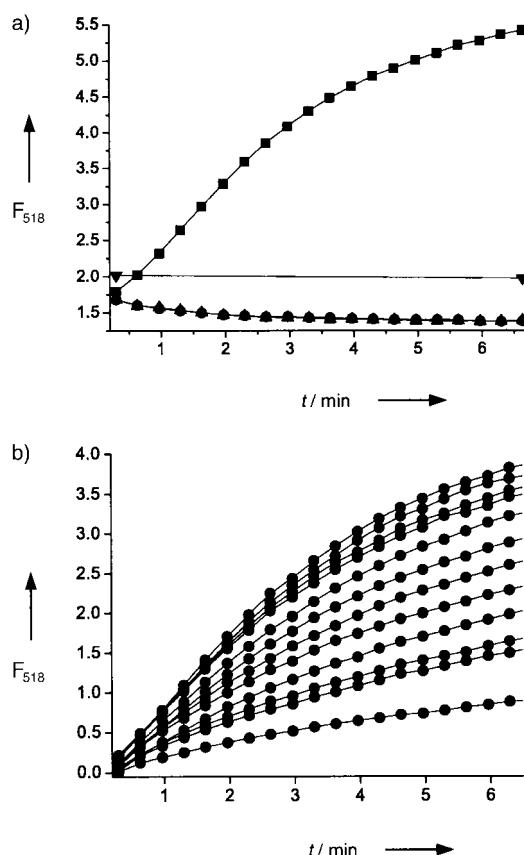


Abbildung 1. Echtzeitdetektion der Fluoreszenz bei der KF^- -katalysierten DNA-Synthese unter Verwendung der Haarnadeltemplatsonde. a) ■: Reaktion bei 37°C mit 200 nm Haarnadeltemplat-Primer-Komplex, KF^- , je $62.5 \mu\text{M}$ dNTP und 10 mM MgCl_2 in Standardreaktionspuffer.^[13] FAM-Fluoreszenzintensitäten wurden bei 518 nm gemessen. Blindmessungen wurden unter gleichen Reaktionsbedingungen, aber ohne dNTP (●), KF^- (▲) oder MgCl_2 (▼) ausgeführt. Die gezeigten Graphen resultieren aus Rohdaten ohne Korrektur für Ausbleichen des Fluorophors oder geräteabhängige Effekte. b) Fluoreszenz-Zeit-Verläufe bei unterschiedlichen dNTP-Konzentrationen. Die KF^- - und dNTP-Konzentrationen betrugen $1.25 \mu\text{M}$ (niedrigste Kurve) bis $37.5 \mu\text{M}$ (höchste Kurve). Die Daten resultieren aus Mehrfachexperimenten, Fehlerbalken sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt. Entsprechende Blindmischungen ohne KF^- wurden parallel detektiert und die Daten jeweils subtrahiert.^[13]

Die Kinetik der enzymatischen DNA-Synthese lässt sich mit einem Michaelis-Menten-Ansatz beschreiben, sodass aus Experimenten mit konstanter Enzymkonzentration und variablen Substratkonzentrationen Michaelis-Konstanten K_M erhalten werden können.^[12] Wir untersuchten die KF^- -katalysierte Reaktion bei unterschiedlichen dNTP-Konzentrationen. Die aus diesen Experimenten erhaltenen Fluoreszenz-Zeit-Kurven steigen zunächst linear an, und die Reaktionsgeschwindigkeit geht mit steigender Substratkonzentration in einen Sättigungsbereich über (Abbildung 1b). Der K_M -Wert von $3.6 \pm 0.2 \mu\text{M}$ stimmt gut mit dem Wert überein, den wir unabhängig in einer konventionellen radiometrischen Studie erhielten ($3.9 \pm 1.1 \mu\text{M}$).^[13]

Wir untersuchten, ob mit dem Assay Wechselwirkungen zwischen DNA-Polymerasen und Inhibitoren erfasst werden können und verwendeten hierzu HIV-1-Reverse-Transkriptase (HIV-1-RT) als Modell. In der gegenwärtigen HIV-Wirkstofftherapie werden zwei Klassen von Inhibitoren der

RT angewendet, die sich in ihrem Wirkmechanismus unterscheiden:^[5] nichtnucleosidische RT-Inhibitoren (NNRTIs), die als allosterische Inhibitoren der RT-Funktion betrachtet werden, und nucleosidische RT-Inhibitoren (NRTIs), die zunächst durch zelluläre Prozesse in 5'-O-Triphosphat transformiert und dann durch RT in den naszierenden DNA-Strang inkorporiert werden, und so Kettenabbruch verursachen. Um zu prüfen, ob unser Assay für die schnelle Identifizierung von HIV-1-RT-Inhibitoren beider Wirkmechanismen geeignet ist, untersuchten wir Nevirapin und 3'-Azido-2',3'-didesoxythymidintriphosphat (AZTTP) als Beispiele für gut charakterisierte NNRTIs bzw. NRTIs.

Wie Abbildung 2 zeigt, ermöglicht unser Assay die Echtzeitdetektion der Inhibition der HIV-1-RT unabhängig vom Wirkmechanismus. Die Inhibitionsprofile und entsprechenden IC_{50} -Werte konnten in einem einzelnen Messdurchlauf aus Parallelexperimenten erhalten werden. Die resultierenden IC_{50} -Werte stimmten für Nevirapin ($0.13 \pm 0.03 \mu\text{M}$) und AZTTP ($2.10 \pm 0.22 \mu\text{M}$) gut mit bisher beschriebenen Werten überein. Dies belegt, dass der Assay für die zuverlässige Charakterisierung von Inhibitoren geeignet ist.^[14]

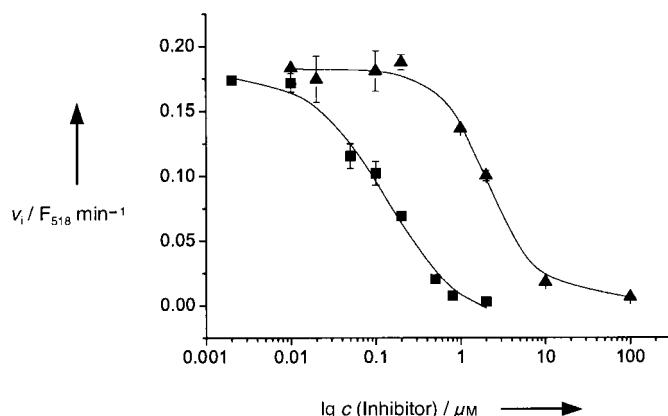


Abbildung 2. HIV-1-RT-Inhibitionsprofile von Reaktionen mit HIV-1-RT, 200 nm Haarnadeltemplat-Primer-Komplex und je $50 \mu\text{M}$ dNTP bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen. ▲: AZTTP, ■: Nevirapin. Entsprechende Blindmischungen ohne RT wurden parallel detektiert und die Daten jeweils subtrahiert.^[13] Die Anfangsgeschwindigkeiten v_i wurden aus den Anfangssteigungen der einzelnen Fluoreszenz-Zeit-Kurven ermittelt. Die Daten resultieren aus Mehrfachexperimenten.^[13]

Das vorgestellte Format sollte für das Hochdurchsatz-Screening von Bibliotheken von Varianten der DNA-Polymerase ideal geeignet sein. In ersten Studien in diese Richtung testeten wir die Anwendbarkeit der molekularen Sonde für die Messung der enzymatischen Aktivität in Rohlysaten von DNA-Polymerase-überexprimierenden Zellen. Eine solche Anwendung würde das parallele Screening von Mutantenbibliotheken durch Vermeidung von aufwändigen und kostenintensiven Reinigungsschritten erheblich vereinfachen und beschleunigen. Allerdings ist dies eine herausfordernde Aufgabe, da die große Zahl von DNA-bindenden und -modifizierenden Proteinen in bakteriellen Zelllysaten hohe Ansprüche an Assays stellt, die auf der Anwendung eines DNA-Reportermoleküls basieren. Um eine solche Anwendbarkeit zu demonstrieren, untersuchten wir Lysate

von KF⁻-überexprimierenden *E. coli*-Zellen in fluoreszenten Primerverlängerungsreaktionen mit der molekularen Sonde.^[13] Auffallenderweise wurde ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz im untersuchten Zeitraum nur beobachtet, wenn Lysate von expressionsinduzierten Zellen verwendet wurden, die KF⁻-kodierende Vektoren enthielten (Abbildung 3a).

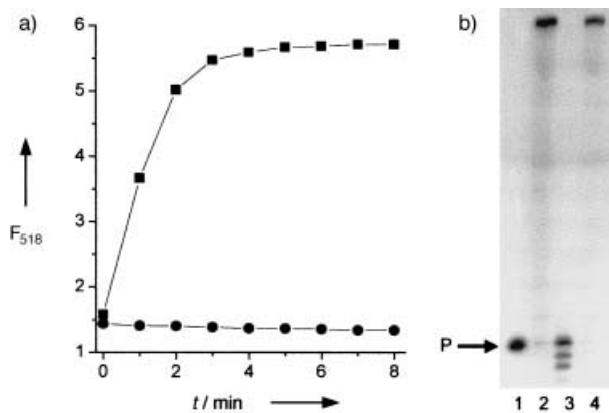


Abbildung 3. Anwendung der Haarnadeltemplatsonde zur Detektion der von Rohlysaten aus KF⁻-exprimierenden *E. coli*-Kulturen katalysierten Primerverlängerungsreaktion. a) Fluoreszente Messung: Reaktionen wurden bei 37°C mit 200 nm Haarnadeltemplat-Primer-Komplex, je 200 µm dNTP, 10 mM MgCl₂ und Lysat von expressionsinduzierten *E. coli*-Kulturen in Standardreaktionspuffer ausgeführt.^[13] ■: Reaktion unter Verwendung von Lysat von *E. coli*-Zellen, die das KF⁻-kodierende Plasmid pQKlenowExo⁻ tragen, 4 h nach Induktion der Expression. ●: Reaktionen unter Verwendung von Lysat von *E. coli*-Zellen, die das nichtkodierende Plasmid pQE30Xa tragen, 4 h nach Induktion der Expression. Die Daten resultieren aus Mehrfachexperimenten und die Graphen aus Rohdaten ohne Korrektur für Ausbleichen des Fluorophors oder geräteabhängige Effekte. b) Autoradiogramm einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Analyse von Primerverlängerungsreaktionen unter Verwendung von ³²P-markiertem Haarnadeltemplat-Primer-Komplex. Die Reaktionszeit betrug in allen Fällen 10 min. Spur 1: ³²P-markierter Haarnadeltemplat-Primer-Komplex und dNTP in KF⁻-Reaktionspuffer (P = Primer). Spur 2: Reaktion unter Verwendung von kommerziell erhältlichem KF⁻. Spur 3: Reaktionen unter Verwendung von Lysat von *E. coli*-Zellen, die das nichtkodierende Plasmid pQE30Xa tragen, 4 h nach Induktion der Expression. Spur 4: Reaktionen unter Verwendung von Lysat von *E. coli*-Zellen, die das KF⁻-kodierende Plasmid pQKlenowExo⁻ tragen, 4 h nach Induktion der Expression.^[13]

Mit Lysaten, die von Zellen erhalten wurden, die Vektoren ohne KF⁻-kodierende Sequenz trugen, wurde kein Anstieg der Fluoreszenz beobachtet. Um zu bestätigen, dass das Signal tatsächlich von einer DNA-Synthese herrührt, die durch exprimierte KF⁻ katalysiert ist, wiederholten wir die Experimente mit ³²P-markiertem Primer und anschließender Analyse durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abbildung 3b). Die Ergebnisse zeigen, dass eine Primerverlängerung nur zu beobachten ist, wenn Lysate von induzierten Zellen verwendet werden, die KF⁻-kodierende Vektoren tragen, was stark darauf hinweist, dass die Signal-erzeugung tatsächlich ihren Ursprung in der erwünschten DNA-Polymerase-Funktion hat.

Zusammenfassend berichten wir hier über einen auf einer einzigen molekularen Sonde basierenden neuen Assay, der die quantitative Echtzeitdetektion der DNA-Polymerase-katalysierten DNA-Synthese ermöglicht. Mit dem Assay

gelingt die schnelle und quantitative Charakterisierung von kleinen Molekülen, die mit der DNA-Polymerase-Funktion interferieren. Wir konnten experimentell zeigen, dass mit dem Reportersystem die DNA-Polymerase-Funktion unmittelbar aus Lysaten von DNA-Polymerase-exprimierenden Zellen in Echtzeit verfolgt werden kann. Unseres Wissens erfüllt keine der bislang bekannten Methoden diese Anforderungen. Wegen seiner hervorragenden Eigenschaften ist zu erwarten, dass der vorgestellte Assay breite Anwendung finden wird.

Eingegangen am 10. Juni 2002 [Z19502]

- [1] Aktuelle Übersichten: a) M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 1391–1394; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1335–1338; b) M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 292–320; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 284–310; c) D. Wahler, J.-L. Reymond, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 152–158; d) D. Wahler, J.-L. Reymond, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 535–544; e) R. P. Hertzberg, A. J. Pope, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 445–451; f) M. Olsen, B. Iverson, G. Georgiou, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11*, 331–337.
- [2] A. Kornberg, T. A. Baker, *DNA Replication*, 2. Aufl., Freeman, New York, **1991**.
- [3] a) J. Sambrook, D. W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **2001**; b) H.-J. Müller, *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*, Spektrum, Berlin, **2001**.
- [4] a) M. Chicurel, *Nature* **2001**, *412*, 580–582; b) M. M. Shi, *Clin. Chem.* **2001**, *47*, 164–172; c) I. G. Gut, *Hum. Mutat.* **2001**, *17*, 475–492; d) A.-C. Syvänen, *Hum. Mutat.* **1999**, *13*, 1–10; e) *Rapid Cycle Real-Time PCR* (Hrsg.: S. Meuer, C. Wittwer, K. Nakagawa), Springer, Berlin, **2001**.
- [5] a) L. K. Naeger, M. D. Miller, *Curr. Opin. Invest. Drugs* **2001**, *2*, 335–339; b) J. Tozser, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2001**, *946*, 145–159; c) D. Pillay, S. Taylor, D. D. Richman, *Rev. Med. Virol.* **2000**, *10*, 231–253.
- [6] a) D. L. Earnshaw, A. J. Pope, *J. Biomol. Screening* **2001**, *6*, 39–46; b) S. Lutz, P. Burgstaller, S. A. Benner, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 2792–2798; c) M. A. Griep, *Anal. Biochem.* **1995**, *232*, 180–189; d) M. Seville, A. B. West, M. G. Cull, C. S. McHenry, *Biotechniques* **1996**, *21*, 664–672; e) H. Tveit, T. Kristensen, *Anal. Biochem.* **2001**, *289*, 96–98; f) J. H. Zhang, T. M. Chen, S. H. Nguyen, K. R. Oldenburg, *Anal. Biochem.* **2000**, *281*, 182–186.
- [7] a) S. Tyagi, D. Bratu, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 49–53; b) A. S. Piatek, S. Tyagi, A. C. Pol, A. Telenti, L. P. Miller, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 359–363.
- [8] S. Tyagi, F. R. Kramer, *Nat. Biotechnol.* **1996**, *14*, 303–308.
- [9] D. M. Lilley, T. J. Wilson, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 507–517.
- [10] a) O. Thum, S. Jäger, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 4112–4115; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3990–3993; b) S. Brakmann, S. Löbermann, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 1473–1476; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1427–1429; c) S. Brakmann, P. Nieckchen, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 773–777; d) I. A. Nazarenko, S. K. Bhatnagar, R. J. Hohman, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 2516–2521.
- [11] a) C. M. Joyce, T. A. Steitz, *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, *63*, 777–822; b) P. H. Patel, M. Suzuki, E. Adman, A. Shinkai, L. A. Loeb, *J. Mol. Biol.* **2001**, *308*, 823–837.
- [12] A. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science*, Freeman, New York, **2000**.
- [13] Für experimentelle Details siehe Hintergrundinformationen.
- [14] a) J. E. Reardon, W. H. Miller, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 20302–20307; b) V. J. Merluzzi, K. D. Hargrave, M. Labadia, K. Grozinger, M. Skoog, J. C. Wu, C. K. Shih, K. Eckner, S. Hattox, J. Adams, A. S. Roseenthal, R. Faanes, R. J. Ecker, R. A. Koup, J. L. Sullivan, *Science* **1990**, *250*, 1411–1413.