

Gerichtete Evolution einer thermostabilen DNA-Polymerase zur Amplifikation ausgehend von stark geschädigten Templaten**

Christian Gloeckner, Katharina B. M. Sauter und Andreas Marx*

DNA bildet die Grundlage zur Speicherung und Übertragung genetischer Information von einer Generation zur nächsten. Allerdings unterliegt die DNA der spontanen Hydrolyse ihrer Phosphodiester-, N-glycosidischen und Amin-Bindungen, und sie ist ferner der Bestrahlung durch ultraviolettes (UV) Licht und dem ständigen Angriff freier Sauerstoffradikale ausgesetzt, die die Nucleobasen und das 2'-Desoxyribose-rückgrat schädigen.^[1] Die so entstehenden DNA-Läsionen behindern die DNA-Replikation massiv, und es war lange Zeit unklar, wie Zellen die DNA-Synthese über solche Läsionen hinweg weiterführen. Erst vor kurzem wurden spezialisierte DNA-Polymerasen gefunden, die in der Lage sind, Läsionen zu überlesen (Transläsionssynthese).^[2] Diese Enzyme wurden in unterschiedlichsten Organismen gefunden und sind beispielsweise an der Unterdrückung von Hautkrebs beim Menschen beteiligt.^[2] Trotz intensiver Untersuchungen sind die Mechanismen, mit der DNA-Polymerasen Läsionen als Substrate erkennen, bisher nur unzureichend verstanden. Um näheren Aufschluss über die beobachtete unterschiedliche Substrattoleranz von DNA-Polymerasen zu erhalten, unternahmen wir Experimente mit dem Ziel, aus einem DNA-Polymerasegerüst einer läsionsintoleranten DNA-Polymerase eine Variante zu entwickeln, die Läsionen im DNA-Templat erkennt.

Methoden der gerichteten Evolution erwiesen sich bereits als geeignet, um Nucleinsäure-Polymerasen mit veränderten Eigenschaften zu erzeugen.^[3] Solche Modifizierungen wurden zumeist auf der Ebene der molekularen Evolution durch genetische Komplementierung und/oder Screening,^[4] Phagen-Display^[5] oder In-vitro-Kompartimentierung^[6] vorgenommen. Hier berichten wir, wie eine läsionstolerantere Variante einer DNA-Polymerase durch Screening einer kleinen Mutantenbibliothek ermittelt wurde. Die Bibliothek wurde durch Zufallsmutagenese erzeugt. Im Unterschied zum Wildtyp-Enzym ist die Mutante in der Lage, DNA durch Polymerasekettenreaktion ausgehend von geschädigter DNA zu amplifizieren. Diese neue DNA-Polymerase könnte ein wertvolles Hilfsmittel für die Forensik oder die Analyse von

„historischer“ DNA sein, deren Amplifikation als problematisch beschrieben wurde.^[7]


Um eine DNA-Polymerase zu erhalten, die in der Lage ist, DNA-Läsionen zu erkennen, haben wir eine bereits beschriebene Bibliothek einer N-terminal verkürzten Variante der DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Klentaq) durchmustert, die durch Zufallsmutagenese (error-prone PCR) erzeugt wurde.^[4f] Die Bibliothek bestand aus ca. 1000 PCR-aktiven Klentaq-Varianten. Der Screeningprozess war robotergestützt und basierte auf einer Primerverlängerungsreaktion und der Detektion der entstandenen doppelsträngigen DNA mit SYBR Green I.^[4e] Alle Reaktionen wurden parallel im 384-Loch-Format durchgeführt und in einem Standardmikrotiterplattenlesegerät ausgelesen. Es wurde berichtet, dass prozessive DNA-Polymerasen wie Klentaq ein Nucleotid, das sich gegenüber einer DNA-Läsion befindet, mit einer wesentlich geringeren Effizienz einbauen und verlängern, als dies bei ungeschädigter DNA geschieht.^[2] Zum Screening der Bibliothek haben wir daher den Ansatz gewählt, eine DNA-Läsion durch das Auslassen eines der vier dNTPs (dATP) nachzuahmen, obwohl das verwendete Templat alle vier Nucleotide enthält (siehe Hintergrundinformationen). Es ist bekannt, dass, ähnlich dem Überlesen einer DNA-Läsion, der Fehleinbau eines Nucleotids und dessen Verlängerung die enzymatische DNA-Synthese signifikant blockieren.^[4b,9]

Nach Screening der Bibliothek wurde eine DNA-Polymerase-Variante identifiziert, die vielversprechende Eigenschaften zeigte. Diese wurde daraufhin gereinigt und weiter charakterisiert, und die Sequenzierung belegte, dass die identifizierte Variante eine einzige Aminosäuremutation enthält (Met747Lys).^[10] Die Variante wird im Weiteren als M747K bezeichnet. Um M747K im Vergleich mit dem Wildtyp weiter zu charakterisieren, führten wir die bei der Durchmusterung eingesetzten Primerverlängerungsreaktionen unter Auslassung jeweils eines dNTP durch (Abbildung 1). Zwar waren beide DNA-Polymerasen in der Lage, die Primerstränge bis zu einer gewissen Position zu verlängern, M747K erzeugte jedoch unter identischen Reaktionsbedingungen deutlich längere Reaktionsprodukte als das Wildtyp-Enzym. Ein solches Ergebnis sollte bei einem erfolgreichen Screening zu erwarten sein. Es deutet des Weiteren darauf hin, dass M747K stärker zu Nucleotid-Fehleinbau und -Verlängerung neigt als das Wildtyp-Enzym und somit eine geringere Selektivität haben sollte.

Um die Selektivität der Mutante im Vergleich zum Wildtyp zu quantifizieren, bestimmten wir das Fehlerspektrum beider Enzyme mithilfe eines PCR-Experiments (siehe Hintergrundinformationen).^[4b] Der Wildtyp zeigte eine Fehlerrate von 8.8×10^{-5} , was in der bereits beschriebenen

[*] Dipl.-Biol. C. Gloeckner, Dipl.-Chem. K. B. M. Sauter, Prof. Dr. A. Marx
Fachbereich Chemie, Universität Konstanz
78457 Konstanz (Deutschland)
Fax: (+49) 7531-88-5140
E-Mail: andreas.marx@uni-konstanz.de

[**] Wir danken der DFG für finanzielle Unterstützung.

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

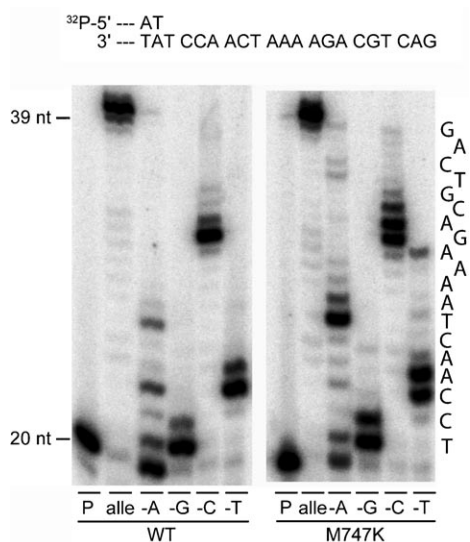


Abbildung 1. DNA-Synthese unter Ausschluss eines kanonischen dNTP. 5'-³²P-markierte Primer-Templat-Komplexe (siehe Ausschnitt der Templatsequenz) wurden mit jeweils gleichen Mengen Wildtyp (WT)- oder mutierter DNA-Polymerase (M747K) und unterschiedlichen dNTP-Kombinationen inkubiert. P: nur Primer; alle: alle vier dNTPs; -N: Reaktion ohne das angegebene dNTP, in Gegenwart gleicher Mengen der verbleibenden drei dNTPs. Einzelheiten sind den Hintergrundinformationen zu entnehmen.

Größenordnung liegt.^[4b] Interessanterweise ist die Fehlerrate der Mutante mit 11.5×10^{-5} sehr ähnlich. Um diesen Befund zu prüfen, führten wir quantitative Studien des Fehleinbaus und der Fehlpaarungsverlängerung in Form von Steady-State-Kinetikexperimenten durch (siehe Hintergrundinformationen). Auch hier zeigten Wildtyp und Mutante ähnliche Genauigkeiten, sodass die Ergebnisse der PCR-Experimente bestätigt wurden.

Als Nächstes untersuchten wir die Fähigkeit von M747K im Vergleich zum Wildtyp, DNA-Läsionen zu überlesen. Die verwendeten DNA-Templates enthielten DNA-Läsionen an definierten Stellen (Abbildung 2). Wir untersuchten die Wirkung von M747K an einer stabilisierten abasischen Stelle (AP), die durch Spaltung der glycosidischen Bindung zur Base eine Läsion bildet, und an Purin-Läsionen, die durch Oxidation gebildet werden (8-Oxoadenin oder 8-Oxoguanin). Es ist bekannt, dass diese Läsionen das Fortschreiten der enzymatischen DNA-Synthese signifikant blockieren.^[2,11] Beide Enzyme sind in der Lage, die Primer zur vollen Länge zu verlängern, wenn ungeschädigte Templates verwendet wurden (Abbildung 2, Bahnen A und G).

Weitere Charakterisierungen der spezifischen Aktivität an ungeschädigten DNA-Templates zeigten für beide Enzyme ein ähnliches Ergebnis (siehe Hintergrundinformationen). Wurden jedoch Templates mit definierten DNA-Läsionen verwendet, so konnten Unterschiede entdeckt werden. Während das Wildtyp-Enzym vor und nach Einbau eines Nucleotids gegenüber einer DNA-Läsion pausiert, war M747K deutlich aktiver und konnte über die Läsionen hinweg synthetisieren (Abbildung 2). Quantitative Steady-State-Experimente belegten, dass sowohl das Wildtyp-Enzym als auch M747K bevorzugt dA in der Position gegenüber der

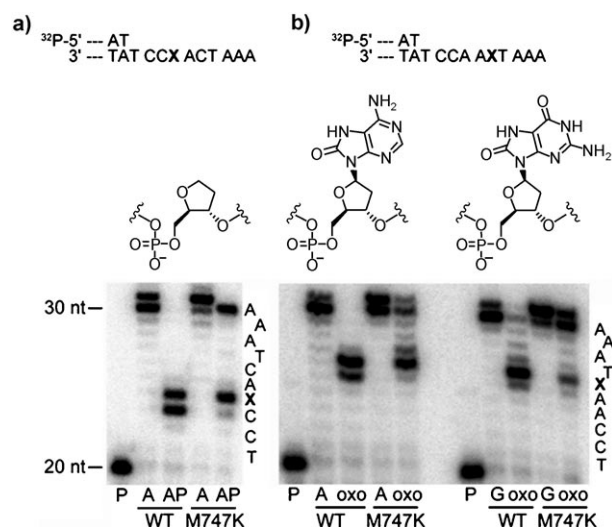


Abbildung 2. Erkennung von DNA-Läsionen. a) Experiment mit stabilisierter abasischer Stelle (AP); 5'-³²P-markierte Primer-Templat-Komplexe (siehe Ausschnitt der Templatsequenz) wurden mit jeweils gleichen Mengen WT- oder mutierter DNA-Polymerase (M747K) und allen vier dNTPs inkubiert. P: nur Primer; A: Templat mit dA an der mit X markierten Position; AP: Templat mit DNA-Läsion an der mit X markierten Position. b) Experimente mit oxidierten Purinen. Die Reaktionen wurden wie unter (a) durchgeführt, mit dem Unterschied, dass oxidative Läsionen an den bezeichneten Positionen eingeführt wurden. Einzelheiten sind den Hintergrundinformationen zu entnehmen.

abasischen Läsion einbauen und dabei ähnlich effizient sind. Bei der Verlängerung eines Primer-Templat-Komplexes mit einer stabilisierten abasischen Stelle ist M747K jedoch ca. siebenfach effizienter als das Wildtyp-Enzym.

Als Nächstes untersuchten wir die Fähigkeit von M747K zur Synthese von DNA, die zuvor durch Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) geschädigt wurde. Zuerst bestrahlten wir ein doppelsträngiges DNA-Plasmid mit UV-Licht unterschiedlicher Dosen (siehe Hintergrundinformationen). Die Analyse der bestrahlten DNA auf Agarose-Gelen zeigte eine deutliche lichtabhängige Schädigung des Plasmids (Abbildung 3a). Anschließend wurde die geschädigte DNA als Templat für die PCR-Amplifikation eines ca. 1.8 kb langen Fragments verwendet. Alle Reaktionen wurden ohne Optimierung in einem für die KlenTaq-DNA-Polymerase beschriebenen Puffer durchgeführt.^[8] Bei Verwendung des Wildtyp-Enzyms konnte keine signifikante PCR-Amplifikation bei Bestrahlungsdosen der DNA von 0.5 kJ m^{-2} oder höheren Dosen festgestellt werden (Abbildung 3b). M747K war hingegen deutlich in der Lage, DNA ausgehend von stark bestrahlten Templates zu amplifizieren (Abbildung 3b).

Teilsequenzierungen, die durch einen kommerziellen Anbieter durchgeführt wurden, zeigten interessanterweise, dass M747K in der Lage ist, geschädigte DNA mit ausreichend hoher Sequenzselektivität zu amplifizieren, um die Originalsequenz des Templates identifizieren zu können (siehe Hintergrundinformationen).

Zusammenfassend wurde durch Durchmusterung einer Bibliothek von zufallsmutierten Enzymvarianten eine DNA-Polymerase identifiziert, die fähig ist, DNA-Läsionen im Templat effizient zu prozessieren. Im Unterschied zum

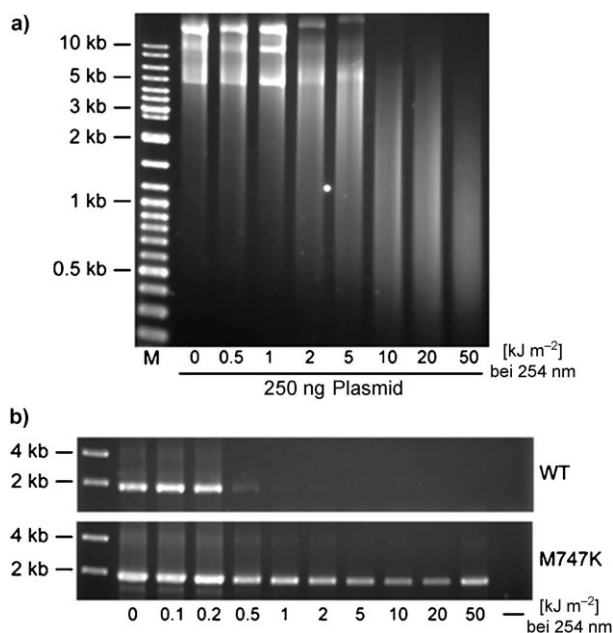


Abbildung 3. Herstellung UV-geschädigter DNA und PCR-Amplifikation. a) Bestrahlung doppelsträngiger Plasmid-DNA mit UV-Licht unterschiedlicher Dosen. b) PCR-Amplifikation eines Fragments von ca. 1.8 kb, ausgehend von der UV-bestrahlten DNA, die als Templat diente. Alle Reaktionen wurden unter identischen Bedingungen durchgeführt. Linke Spur: DNA-Marker, rechte Spur: PCR ohne DNA-Templat. Die Analyse wurde durch Agarosegelelektrophorese und anschließende Färbung mit Ethidiumbromid durchgeführt. Einzelheiten sind den Hintergrundinformationen zu entnehmen.

Wildtyp-Enzym ist die Mutante in der Lage, DNA sequenzselektiv von UV-geschädigtem Templat aus zu amplifizieren. Holliger et al. verwendeten interessanterweise einen ähnlichen Ansatz zur Evolution einer DNA-Polymerase durch kompartimentierte Selbstreplikation.^[6b] Die Autoren berichteten, dass die Suche nach einem Enzym mit verbesserter Fähigkeit zur Verlängerung von Primern mit Fehlpaarungen am 3'-Terminus zu einer DNA-Polymerase führte, die eine verbesserte Fähigkeit zeigte, modifizierte Substrate zu nutzen.

Die hier identifizierte Mutante enthält eine einzelne hydrophile Substitution (Lysin) an der Position M747. Vergleiche mit der Kristallstruktur von KlenTaq im Komplex mit einem DNA-Substrat^[12] weisen darauf hin, dass M747 eine Wechselwirkung mit dem 2'-Desoxyribose-Residuum des ersten Basenpaares im Templatstrang eingeht. Interessanterweise fanden Jestin et al. kürzlich durch gerichtete Evolution die gleiche Mutation in Kombination mit einer weiteren Mutation (M747K, E742K).^[5d] Das betreffende Enzym erkennt RNA als Templat für die DNA-Synthese. Diese Befunde legen weitere Untersuchungen dieser Position im Hinblick auf die Funktion des Enzyms nahe.

Eine Gruppe natürlicher DNA-Polymerasen wurde vor kurzem entdeckt, die in der Lage sind, Läsionen im Templat zu erkennen, die aber nur eine relativ geringe spezifische Aktivität und Selektivität aufweisen, sobald ungeschädigte Template verwendet werden.^[2] Im Unterschied dazu vereint die hier beschriebene DNA-Polymerase hohe Aktivität und

Selektivität mit der Erkennung von DNA-Läsionen. Besonders die Eigenschaft, geschädigte DNA in der PCR als Templat zu verwenden, macht dieses Enzym für Anwendungen in der Forensik und zur Amplifikation „historischer“ DNA interessant.^[7,13] Funktions- und Strukturstudien, die mehr Einblicke in den Mechanismus der beobachteten Effekte bringen sollen, werden zurzeit unternommen.

Eingegangen am 28. September 2006,
veränderte Fassung am 12. Dezember 2006
Online veröffentlicht am 15. März 2007

Stichwörter: DNA · DNA-Läsionen · DNA-Polymerasen · Gerichtete Evolution · Polymerasekettenreaktion

- [1] Aktuelle Übersichtsartikel: a) H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5709–5711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5583–5585; b) T. Carell, L. T. Burgdorf, L. M. Kundu, M. Cichon, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 491–498; c) E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede, *DNA Repair and Mutagenesis*, American Society for Microbiology Press, Washington, **1995**; d) O. D. Schärer, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3052–3082; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2946–2974.
- [2] Aktuelle Übersichtsartikel: a) S. Prakash, R. E. Johnson, L. Prakash, *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 317–353; b) M. F. Goodman, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 17–50; c) U. Hübscher, G. Maga, S. Spadari, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 133–163; d) A. Marx, D. Summerer, *ChemBioChem* **2002**, *3*, 405–407.
- [3] Übersichten: a) A. A. Henry, F. E. Romesberg, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 370–377; b) S. Brakmann, *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 2634–2646; c) J. F. Davidson, J. Anderson, H. Guo, D. Landis, L. A. Loeb in *Directed Molecular Evolution of Proteins* (Hrsg.: S. Brakmann, K. Johnsson), Wiley-VCH, Weinheim, **2002**, S. 281–307.
- [4] a) P. H. Patel, L. A. Loeb, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 40266–40272; b) P. H. Patel, H. Kawate, E. Adman, M. Ashbach, L. A. Loeb, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 5044–5051; c) S. Brakmann, S. Grzeszik, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 212–219; d) M. B. Kermekchiev, A. Tzekov, W. M. Barnes, *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 6139–6147; e) D. Summerer, N. Z. Rudinger, I. Detmer, A. Marx, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4791–4794; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4712–4715; f) K. B. M. Sauter, A. Marx, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7795–7797; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7633–7635; g) M. Strerath, C. Gloeckner, D. Liu, A. Schnur, A. Marx, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 395–401.
- [5] a) M. Fa, A. Radeghieri, A. A. Henry, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1748–1754; b) A. M. Leconte, L. Chen, F. E. Romesberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12470–12471; c) G. Xia, L. Chen, T. Sera, M. Fa, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 6597–6602; d) S. Vichier-Guerre, S. Ferris, N. Auberger, K. Mahiddine, J.-L. Jestin, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 6279–6283; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6133–6137.
- [6] a) F. J. Ghadessy, J. L. Ong, P. Holliger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 4552–4557; b) F. J. Ghadessy, N. Ramsay, F. Boudsocq, D. Loakes, A. Brown, S. Iwai, A. Vaisman, R. Woodgate, P. Holliger, *Nat. Biotechnol.* **2004**, *22*, 755–759; c) J. L. Ong, D. Loakes, S. Jaroslawski, K. Too, P. Holliger, *J. Mol. Biol.* **2006**, *361*, 537–550.
- [7] Siehe z.B.: M. Stiller, R. E. Green, M. Ronan, J. F. Simons, L. Du, W. He, M. Egholm, J. Rothberg, S. G. Keats, N. D. Ovodov, E. E. Antipina, G. F. Baryshnikov, Y. V. Kuzmin, A. A. Vasilevski, G. E. Wuenschell, J. Termini, M. Hofreiter, V. Jaenicke-

- Després, S. Pääbo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13578–13584, zit. Lit.
- [8] W. M. Barnes, *Gene* **1992**, *112*, 29–35.
- [9] a) T. A. Kunkel, K. Bebenek, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 16895–16898; b) T. A. Kunkel, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 497–529.
- [10] Die Nummerierung bezieht sich auf die Volllänge­sequenz der DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*.
- [11] R. E. Wellinger, F. Thoma, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 1578–1579.
- [12] a) Y. Li, V. Mitaxov, G. Waksman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9491–9496; b) Y. Li, S. Korolev, G. Waksman, *EMBO J.* **1998**, *17*, 7514–7525.
- [13] Eine von geschädigter DNA ausgehende Amplifikation wurde unter Verwendung einer Mischung von DNA-Polymerasen beschrieben: J. P. McDonald, A. Hall, D. Gasparutto, J. Cadet, J. Ballantyne, R. Woodgate, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 1102–1111.
-