

Zellfreie Transkription/Translation von PCR-amplifizierter DNA für NMR-Studien mit hohem Durchsatz**

Peter S. C. Wu, Kiyoshi Ozawa, Siew P. Lim, Subhash G. Vasudevan, Nicholas E. Dixon und Gottfried Otting*

Zellfreie *Escherichia coli*-Extrakte zur gekoppelten Transkription/Translation stellen eine zunehmend attraktive Alternative zu geläufigen In-vivo-Expressionssystemen dar.^[1–3] Zellfreie Systeme eignen sich insbesondere zur schnellen Synthese von isotopenmarkierten Proteinen und zur unmittelbaren Analyse durch kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR), da auf eine chromatographische Aufreinigung verzichtet werden kann,^[4] metabolische Umwandlungen der verschiedenen Aminosäuren inhibiert sind^[5] und nur geringe Mengen an teuren isotopenmarkierten Aminosäuren benötigt werden.^[2] Die besten Proteinausbeuten werden mit einem Dialysesystem (zellfrei mit kontinuierlichem Austausch, ZFKA) erhalten, wobei die äußere Pufferlösung kontinuierlich die Konzentrationen an Aminosäuren und ATP in der inneren Reaktionslösung aufrecht erhält.^[6] Der zeitaufwändigste Schritt ist gewöhnlich die Präparation relativ großer Mengen an Plasmid-DNA, da Plasmid-DNA in ZFKA-Systemen deutlich bessere Ausbeuten als lineare DNA liefert, vermutlich wegen der Verdauung von DNA durch Exonukleasen im *E. coli*-Zellextrakt.^[7] So wurde zum Beispiel unter Verwendung PCR-amplifizierter linearer DNA^[8] eine Ausbeute von 1 mg Chloramphenicol-Acetyltransferase pro Milliliter Reaktionsmedium erhalten, mit Plasmid-DNA hingegen 6 mg mL⁻¹.^[6] Hier stellen wir eine Methode vor, die mit PCR-Produkten dieselben Proteinausbeuten liefert wie mit Plasmid-DNA. Damit können innerhalb von 24 Stunden alle Schritte bis zur Aufnahme von Protein-NMR-Spektren durchgeführt werden, inklusive PCR-Amplifikation, sieben-

ständiger zellfreier Proteinsynthese und Dialyse gegen NMR-Puffer über Nacht.

Unsere Methode beruht auf der Erzeugung von acht Basen langen einzelsträngigen DNA-Überhängen an beiden Enden des PCR-Produktes (Abbildung 1), die sich zur Liga-

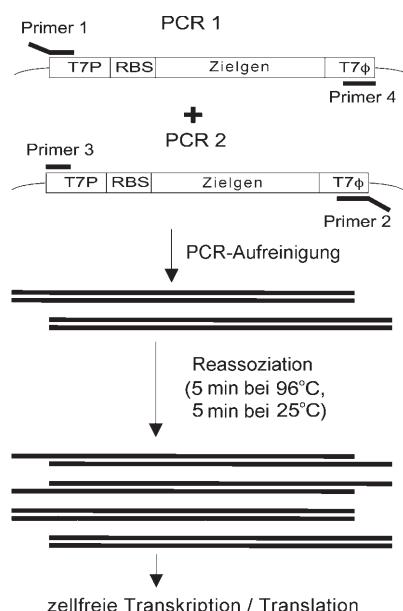


Abbildung 1. Erzeugung stabiler PCR-Produkte aus einem Konstrukt mit T7- ϕ 10-Promotor, Ribosomenbindungsstelle und T7-Terminator. Die Primersequenzen waren (einzelsträngige Überhangsegmente unterstrichen): Primer 1: 5'-PO₄-TTAGCTGGTCGATCCCGCGAAATTAA-TACG; Primer 2: 5'-PO₄-CCAGCTAACAAAAACCCCTCAAGACCCG; Primer 3: 5'-PO₄-TCGATCCCGCGAAATTAA-TACG; Primer 4: 5'-PO₄-CA-AAAACCCCTCAAGACCCG. Im Fall von Konstrukten ohne T7-Elemente können die T7-Sequenzen in einem zusätzlichen PCR-Schritt eingeführt werden (siehe die Hintergrundinformationen).

[*] P. S. C. Wu, Dr. K. Ozawa, Prof. G. Otting
Research School of Chemistry
The Australian National University
Canberra ACT 0200 (Australien)
Fax: (+61) 2-6125-0750
E-Mail: gottfried.ötting@anu.edu.au
Homepage: <http://rsc.anu.edu.au/~go/>

Prof. N. E. Dixon
Department of Chemistry
University of Wollongong, NSW 2522 (Australien)

Dr. S. P. Lim, Dr. S. G. Vasudevan
Novartis Institute for Tropical Diseases Pte Ltd
10 Biopolis Road, Singapore 138670 (Singapur)

[**] Dieses Projekt wurde vom Australian Research Council gefördert durch ein Federation Fellowship für G.O. sowie durch finanzielle Unterstützung (für ein 800-MHz-NMR-Spektrometer). Wir danken Dr. Daying Wen und Dr. Xun-Cheng Su für die Aufnahme eines ¹⁵N-HSQC-Spektrums der einheitlich markierten Protease.

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

tion zu exonukleaseresistenter cyclischer DNA mithilfe der endogenen Ligaseaktivität der *E. coli*-S30-Extrakte eignen. Mit PCR-Produkten mit 5'-phosphorylierten Überhängen erhielten wir im ZFKA-Verfahren für alle getesteten Proteine dieselben Ausbeuten wie mit Plasmid-DNA (Abbildung 2).

Der Nachweis der Cyclisierung wurde indirekt erbracht. Abbildung 3 zeigt, dass die besten Ausbeuten mit 1) längeren Überhängen und 2) 5'-phosphorylierten Überhängen erzielt wurden; 3) einzelsträngige Überhänge waren essenziell, und 4) die genauen Nukleotidsequenzen waren von untergeordneter Bedeutung, solange sie komplementär waren.

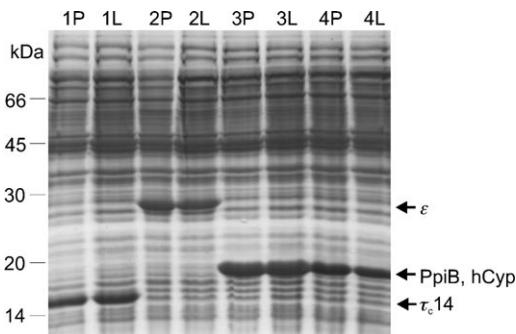


Abbildung 2. Vergleich der Proteinausbeuten, die mit Plasmid-DNA (P) oder PCR-amplifizierter linearer DNA gemäß Abbildung 1 (L) erhalten wurden, in einem Coomassie-Blau-SDS-PAGE-Gel. 1) C-terminales Fragment τ_c14 der τ -Untereinheit von *E. coli*-DNA-Polymerase III (Pol III). 2) ε -Untereinheit von Pol III. 3) *E. coli*-Peptidylprolyl-Isomerase B (PpiB). 4) Humancyclophilin A (hCyp).

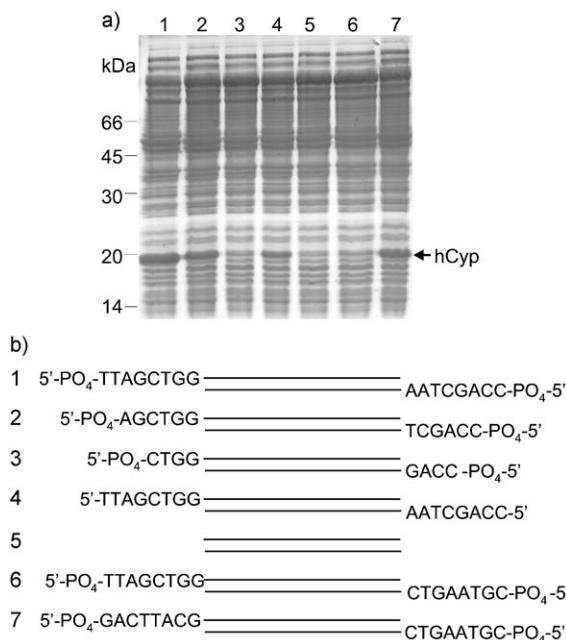


Abbildung 3. Expressionsausbeuten für verschiedene PCR-Produkte: a) Coomassie-Blau-SDS-PAGE-Gel von hCyp, das in ZFKA-Reaktionen von PCR-Produkten ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) mit den Überhängen in (b) synthetisiert wurde.

Die hohen Proteinausbeuten, die mit dem PCR-Protokoll in Abbildung 1 erhalten werden, eröffnen zahlreiche Möglichkeiten zur Hochdurchsatz-Proteinsynthese. So können Proteinmutanten leicht erzeugt und ohne Klonierungs- oder chromatographische Reinigungsschritte NMR-spektroskopisch analysiert werden. Wir erzeugten mithilfe des PCR-Protokolls spezifische Mutanten zum Zweck der Resonanzzuordnung eines Denguevirus-Proteasekonstrukttes.

Der Denguevirus-Proteasekomplex NS2B/NS3 ist unabdingbar für die Denguevirus-Replikation.^[9] ^{15}N -HSQC-Spektren von $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -markierter Protease wiesen aufgrund unspezifischer Aggregation oder chemischer Austauschprozesse (siehe Hintergrundinformationen) sehr breite Signale auf (Halbwertsbreite $> 50 \text{ Hz}$).^[10] Zusätzlich waren viele

Reste hochbeweglich, was die spektrale Auflösung beeinträchtigte, und das Protein war nicht stabil. Diese Eigenschaften verhindern gebräuchliche Strategien der Resonanzzuordnung. Nichtsdestotrotz wurden in Proben, die selektiv mit $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Isoleucin markiert waren, gut aufgelöste Kreuzpeaks beobachtet. Wir ordneten diese Kreuzpeaks zu, indem wir systematisch jeden einzelnen der 16 Isoleucinreste in der Aminosäuresequenz zu Valin mutierten. Da nur Isoleucin isotopenmarkiert war, führte jeder fehlende Peak im HSQC-Spektrum einer Proteinmutante zur Zuordnung des entsprechenden Isoleucinrestes im Wildtyp-Protein.

Die DNA-Mutanten mit den erforderlichen einzelsträngigen Überhängen wurden gemäß eines modifizierten Extensionsprotokolls angefertigt (siehe Hintergrundinformationen), und die PCR-Produkte wurden direkt zur Expression eingesetzt. Die Mutagenese verlängerte darum kaum den Zeitaufwand der Probenbereitung, zumal mehrere Mutanten parallel erzeugt werden konnten. Die ^{15}N -HSQC- und ^{13}C -HSQC-Spektren wurden in einem Experiment mit gleichzeitiger Entwicklung der ^{15}N - und ^{13}C -Frequenzen in der indirekten Dimension aufgenommen.^[11] Auf diese Weise wurden 15 der 16 Isoleucin-Amid-Kreuzpeaks und 11 der 22 Isoleucin-Methylkreuzpeaks zugeordnet (die meisten der

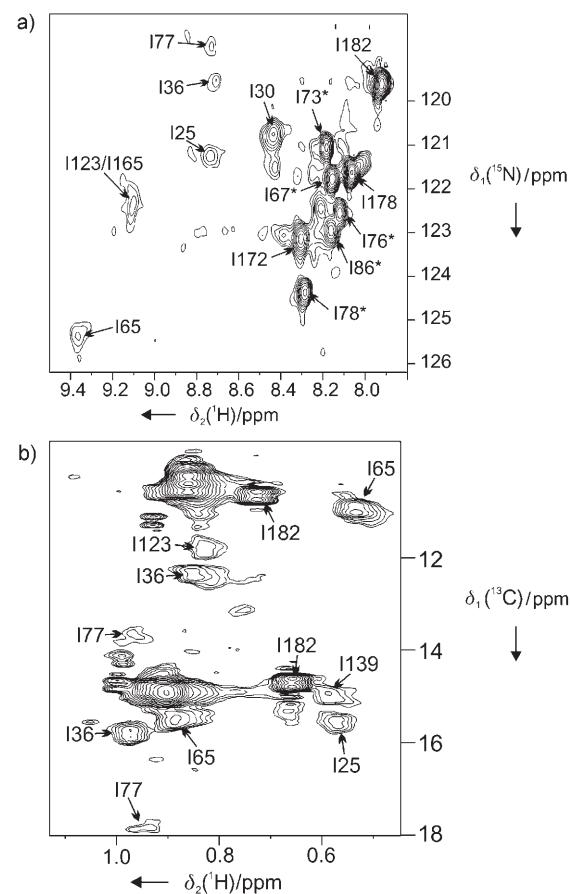


Abbildung 4. ^{15}N - und ^{13}C -HSQC-Spektren einer $200 \mu\text{M}$ Lösung von $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -Ile-markierter Denguevirus-NS2B/NS3-Protease bei 25°C , pH 6.9. NS2B-Resonanzen sind mit einem Stern markiert. a) Amidregion der I139V-Mutante. b) Methylregion der I178V-Mutante. (Die HSQC-Spektren dieser beiden Mutanten waren nicht unterscheidbar von Spektren des Wildtyp-Proteins in der Amid- bzw. Methylregion.)

Isoleucin-Methylpeaks sind nicht aufgelöst, siehe Abbildung 4b). Derselbe Amidkreuzpeak wurde Ile 123 und Ile 165 in NS3 zugeschrieben, weil er bei beiden entsprechenden Mutationen verschwand (siehe Abbildung 4a und die Hintergrundinformationen). Da diese Reste in der dreidimensionalen Struktur benachbart liegen,^[9] können Mutationen an beiden Stellen den Kreuzpeak beeinflussen, was zu einer zweideutigen Zuordnung führt.

Die Resonanzzuordnungen für die NS2B/NS3-Protease ordnen die intensiven und schmalen Kreuzpeaks den Teilen des Proteins zu, für die in der Kristallstruktur keine Elektronendichte erhalten wurde.^[9] Dies bedeutet, dass diese Segmente in Lösung wahrscheinlich hochbeweglich sind. Die Daten zeigen außerdem Linienverbreiterungen für sämtliche strukturierten Teile des Proteins. Nichtsdestotrotz können die zugeordneten Kreuzpeaks nun zum Liganden-Screening mithilfe von NMR-Spektroskopie genutzt werden.

Die PCR-Amplifizierung von DNA-Templaten zur Proteinsynthese mit hohen Ausbeuten in zellfreien Systemen, gekoppelt mit NMR-spektroskopischer Analyse, eröffnet zahlreiche interessante Anwendungen in der Strukturbioologie, unter anderem zur Proteinherstellung ausgehend von cDNA, zur Optimierung von Domänenengrenzen und Löslichkeit, zur Herstellung von Mutanten und zur Einführung von Stopcodons zum spezifischen Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren.^[12] Ohne Bedarf an großen Mengen von Plasmiden, Klonierungs- und Proteinreinigungsschritten sind diese Anwendungen nun besonders attraktiv.

Experimentelles

PCR und zellfreie Proteinexpression: PCR wurde mit Vent-Polymerase (New England Biolabs) durchgeführt, die über 3'→5'-Proofreading-Aktivität verfügt und, wie erforderlich zur Erzeugung von geeigneten Einzelstrangüberhängen, im wesentlichen PCR-Produkte ohne Überhang liefert (siehe auch die Hintergrundinformationen). Die PCR-Produkte wurden mithilfe des QiaQuick-PCR-Reinigungspakets (Qiagen) gereinigt. Zellfreie gekoppelte Transkriptions-/Translationsreaktionen mit *E. coli*-Extrakten wurden wie beschrieben durchgeführt,^[5] außer dass anstelle der Plasmidtemplate durch PCR generierte Template verwendet wurden; pro Milliliter zellfreier Reaktionslösung wurde 10 µg DNA eingesetzt. ¹⁵N/¹³C-markiertes Isoleucin wurde von Cambridge Isotope Laboratories bezogen.

NMR-Spektroskopie: Denguevirus-NS2B/NS3-Protease wurde vom CF40.gly.NS3pro-Konstrukt hergestellt, das zur Kristallstrukturbestimmung verwendet worden war,^[9] mit dem Unterschied dass die Sequenz MASMTG vorangesetzt wurde. Nach der zellfreien Synthese in 1 mL Reaktionsmischung (typische Proteinausbeute 1.4 mg) wurden die Proben gegen NMR-Puffer (20 mM Tris, pH 6.9, 50 mM NaCl) dialysiert und mit einem Centricon-10-Ultrafilter (Amicon) auf 200 µL konzentriert. Nach Zugabe von 10% D₂O wurden NMR-Spektren in 3-mm-NMR-Röhrchen auf einem Bruker Avance 800 MHz NMR-Spektrometer mit Tieftemperatur-Messkopf aufgenommen. Simultane ¹⁵N/¹³C-HSQC-Spektren^[11] wurden in 2.5 Stunden pro Spektrum mit $t_{1\max} = 32$ ms und $t_{2\max} = 93$ ms erhalten.

Eingegangen am 27. Dezember 2006
Online veröffentlicht am 22. März 2007

Stichwörter: Hochdurchsatzverfahren · NMR-Spektroskopie · Polymerasenkettenreaktion · Zellfreie Proteinsynthese

- [1] S. Yokoyama, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 39–43.
- [2] M. Kainosh, T. Torizawa, Y. Iwashita, T. Terauchi, A. M. Ono, P. Güntert, *Nature* **2006**, 440, 52–57.
- [3] K. Ozawa, P. S. C. Wu, N. E. Dixon, G. Otting, *FEBS J.* **2006**, 273, 4154–4159.
- [4] L. Guignard, K. Ozawa, S. E. Pursglove, G. Otting, N. E. Dixon, *FEBS Lett.* **2002**, 524, 159–162.
- [5] K. Ozawa, M. J. Headlam, P. M. Schaeffer, B. R. Henderson, N. E. Dixon, G. Otting, *Eur. J. Biochem.* **2004**, 271, 4084–4093.
- [6] T. Kigawa, T. Yabuki, Y. Yoshida, M. Tsutsui, Y. Ito, T. Shibata, S. Yokoyama, *FEBS Lett.* **1999**, 442, 15–19.
- [7] a) H. L. Yang, L. Ivashkiv, H. Z. Chen, G. Zubay, M. Cashel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 7029–7033; b) S. A. Lesley, M. A. D. Brow, R. R. Burgess, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 2632–2638.
- [8] G. H. Hahn, D. M. Kim, *Anal. Biochem.* **2006**, 355, 151–153.
- [9] P. Erbel, N. Schiering, A. D'Arcy, M. Renatus, M. Kroemer, S. P. Lim, Z. Yin, T. H. Keller, S. G. Vasudevan, U. Hommel, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2006**, 13, 372–373.
- [10] S. Melino, S. Fucito, A. Campagna, F. Wrubl, A. Gamarnik, D. O. Cicero, M. Paci, *FEBS J.* **2006**, 273, 3650–3662.
- [11] R. Boelens, M. Burgering, R. H. Fogh, R. Kaptein, *J. Biomol. NMR* **1994**, 4, 201–213.
- [12] J. Xie, P. G. Schultz, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, 9, 548–554.