

Hochaktive DNA-Polymerase mit einem fluorigen Kern**

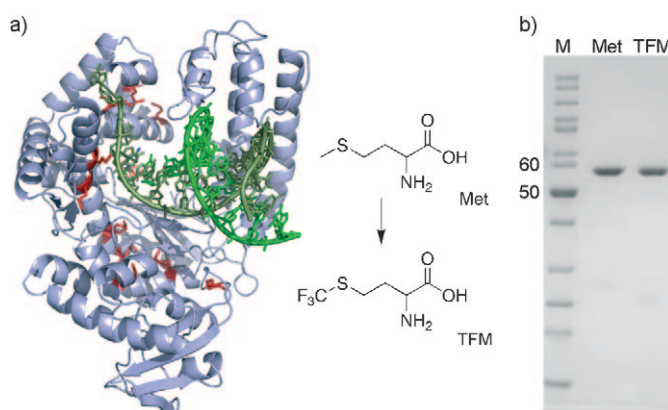
Bastian Holzberger, Marina Rubini, Heiko M. Möller und Andreas Marx*

DNA-Polymerasen katalysieren die gesamte DNA-Synthese in der Zelle^[1] und sind Schlüsselwerkzeuge für molekularbiologische Kerntechniken.^[2] Als Ergänzung zu den natürlich vorkommenden DNA-Polymerasen wurden etliche modifizierte DNA-Polymerasen mit neuen Charakteristika entwickelt. Dazu wurde bislang auch die gerichtete Evolution mit den zwanzig natürlichen Aminosäuren als vielversprechende Methode zur Erzeugung von Nucleinsäure-Polymerasen mit veränderten Eigenschaften^[3] genutzt. Der Einbau nichtnatürlicher Aminosäuren mit funktionellen Gruppen, die in natürlichen Aminosäuren nicht vorhanden sind, kann zu einer erweiterten chemischen und biologischen Vielfalt von Proteinstrukturen und Proteineigenschaften führen.^[4]

Die Verwendung auxotropher Bakterienstämme, die eine bestimmte natürliche Aminosäure biologisch nicht herstellen können, ermöglicht den Ersatz einer Aminosäure durch ein nichtnatürliches Analogon. Nachdem die natürliche Aminosäure in einem Medium aufgebraucht ist, führt die Induktion der Expression eines Zielproteins bei gleichzeitiger Zugabe des nichtnatürlichen Analogons durch „Einbau durch selektiven Druck (SPI)“^[5] zum Einbau der nichtnatürlichen Aminosäure.

Die Synthese von fluorierten Proteinen wurde in der Vergangenheit ausführlich untersucht.^[6] Diese Studien ergaben auch, dass der Einbau trifluorierter, sehr viel stärker hydrophober Aminosäureanaloge wie Trifluormethionin (TFM)^[7] zu Proteinen mit neuen Charakteristika führen kann.^[4] Allerdings besteht bei der Verwendung von TFM anstelle von Methionin, um Enzyme mit neuen Funktionen und Eigenschaften zu generieren, die Gefahr, dass der Austausch zu ungünstigen Wechselwirkungen führt. So setzt die globale Substitution natürlicher Aminosäuren durch trifluorierte Analoga das natürlich entwickelte Proteingerüst der Gefahr aus, korrekte Faltung, ausreichende Stabilität oder enzymatische Aktivität zu verlieren.^[4a] Demzufolge sind nur wenige Proteine bekannt, in denen Methionin global durch TFM ersetzt wurde.^[8] Darunter ist ein einziges Enzym (Phagen-Lysozym), das 18 kDa schwer ist und in dem ca. 70 % der drei Methioninreste durch TFM ersetzt wurden.^[8b]

Wir berichten hier über die Synthese einer vielfach fluorierten DNA-Polymerase. Diese N-terminal verkürzte Variante der DNA-Polymerase I aus *Thermus aquaticus* (*KlenTaq*) ist eine thermophile DNA-Polymerase, die aus 540 Aminosäuren besteht und dabei 13 Methioninreste (Met) enthält,^[9] die global mit einem Substitutionsgrad von ca. 82 % durch TFM ersetzt wurden (Schema 1). Diese vielfach fluo-



Schema 1. Mehrfach TFM-markierte *KlenTaq*-DNA-Polymerase. a) Die Met-Reste der *KlenTaq*-DNA-Polymerase (PDB-Eintrag: 3 KTQ) sind rot hervorgehoben. b) Ergebnis der SDS-PAGE-Trennung von aufgereinigtem *KlenTaq*-WT (Met) und *KlenTaq*-TFM (TFM). M: Marker [kDa].

rierte *KlenTaq* war hochaktiv und wies eine ähnliche Selektivität wie das Wildtyp(WT)-Enzym auf. Darüber hinaus ermöglicht das Einfügen des NMR-aktiven ¹⁹F-Kerns Untersuchungen der Dynamik der DNA-Polymerase durch ¹⁹F-NMR-Spektroskopie. Trotz des hohen Molekulargewichts von 63 kDa sind mindestens neun ¹⁹F-Signale getrennt zu beobachten, die es ermöglichen, unterschiedliche Zustände der DNA-Polymerase auf dem Weg zum Einbau eines kanonischen oder nichtkanonischen Nucleotids zu unterscheiden. Nach unserem Wissen ist dies das bei weitem größte enzymatisch aktive Protein, bei dem Met global durch TFM ersetzt wurde.

Zunächst inkorporierten wir mithilfe des Met-auxotrophen *E.-coli*-Stammes B834(DE3) in einem definierten Minimalmedium TFM in die *KlenTaq*-DNA-Polymerase. Dazu inkubierten wir die Zellen, nachdem Met aufgebraucht war, einige Stunden in der stationären Phase, wuschen und resuspendierten sie, gaben D,L-TFM zu und induzierten die Proteinexpression. Hierfür konnte die racemische Mischung von TFM verwendet werden, weil anzunehmen war, dass *E. coli* nur die L-Form in Proteine einbaut. *KlenTaq*-WT wurde mithilfe desselben *E.-coli*-Stammes im üblichen LB-Medium exprimiert. Beide Enzyme wurden gereinigt (Schema 1b). Der Substitutionsgrad der *KlenTaq*-TFM wurde durch Elek-

[*] B. Holzberger, Dr. M. Rubini, Prof. Dr. H. M. Möller, Prof. Dr. A. Marx
Fachbereich Chemie und Konstanz Research School Chemical
Biology, Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)
Fax: (+49) 7531-88-5140
E-Mail: andreas.marx@uni-konstanz.de
Homepage: www.chemie.uni-konstanz.de/~agmarx/

[**] Wir danken Dr. A. Marquardt (Proteomics Facility, Universität
Konstanz) für die Hilfe bei den MS-Analysen und der Konstanz
Research School Chemical Biology sowie der DFG für finanzielle
Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.200905978> zu finden.

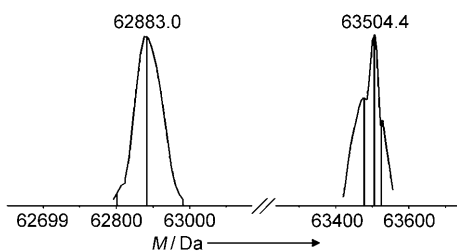


Abbildung 1. Dekonvolvierte ESI-Massenspektren von *KlenTaq*-WT (62883.0 Da, ber. 62830 Da) und -TFM (63504.4 Da). *M*: Molekülmasse. Siehe auch die Hintergrundinformationen.

trospayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) bestimmt (Abbildung 1 und Hintergrundinformationen). Ein Vergleich der Molekulargewichte von *KlenTaq*-TFM und -WT zeigt, dass rund 82 % der 14 Met-Aminosäuren (13 vom *KlenTaq*-Gen, 1 Startmethionin) durch TFM ersetzt wurden. Mit einem Trypsin-Verdau und der Analyse der Fragmente mit einer Kombination aus Flüssigkeitschromatographie (LC) und ESI-MS war es uns möglich, 7 der 14 Met-Positionen zu identifizieren (siehe Hintergrundinformationen). An Position M673 wurde nur TFM nachgewiesen, dagegen haben wir für die anderen sechs Positionen neben dem TFM-modifizierten Peptidfragment immer auch das mit Met gefundene. Dies weist darauf hin, dass jede Met-Position zu einem gewissen Teil fluoriert ist.

Als Nächstes untersuchten wir, ob die hochmodifizierte *KlenTaq*-TFM noch enzymatisch aktiv war. Hierfür führten wir zwischen 37 und 70 °C Primerverlängerungsreaktionen durch (Abbildung 2 a). Beide Enzyme, *KlenTaq*-TFM und -WT, konnten unter allen Bedingungen den Primerstrang zur Volllänge verlängern (30 Nucleotide (nt)). Der templat-unabhängige Einbau eines zusätzlichen Nucleotids führte zu 31 nt langen Produkten. Dies wurde für DNA-Polymerasen mit defizienter 3'→5'-Exonuclease-Funktion bereits beschrieben.^[10] Mit Primerverlängerungsreaktionen bei 72 °C untersuchten wir die spezifische Aktivität der DNA-Poly-

merasen und stellten fest, dass die *KlenTaq*-TFM mehr als ein Drittel der Aktivität des Wildtyps beibehalten hat (siehe Hintergrundinformationen). Demzufolge ist die vielfach fluoridierte *KlenTaq*-TFM immer noch eine hochaktive DNA-Polymerase, selbst bei Temperaturen über 70 °C.

Um zu ermitteln, ob der hohe Met→TFM-Substitutionsgrad die Stabilität des Proteins beeinflusst, verglichen wir die Thermostabilitäten von *KlenTaq*-TFM und -WT. Die Enzyme wurden unterschiedlich lang auf 95 °C erhitzt, und im Anschluss wurde ihre Aktivität in Primerverlängerungsreaktionen bestimmt. Wir beobachteten, dass die *KlenTaq*-TFM an Stabilität verlor und nach mehr als 30 min bei 95 °C weniger als 50 % an Primerverlängerungsaktivität aufwies, wohingegen der Wildtyp selbst nach über fünf Stunden bei 95 °C eine Aktivität von 90 % zeigte (siehe Hintergrundinformationen). Trotzdem stellte sich heraus, dass die *KlenTaq*-TFM immer noch PCR-aktiv war und sogar lange PCR-Produkte amplifizieren konnte (Abbildung 2 b). Außerdem war ihre Aktivität in Echtzeit-PCR-Experimenten vergleichbar mit der des Wildtyps (siehe Hintergrundinformationen).

Um die Selektivität der *KlenTaq*-TFM zu bestimmen, ermittelten wir mithilfe eines bekannten PCR-basierten Assays^[11] ihr Fehlerspektrum (siehe Hintergrundinformationen). Die Fehlerrate von 3.2×10^{-5} ist fast identisch mit der Fehlerrate, die für den *KlenTaq*-WT (8.8×10^{-5}) ermittelt wurde.^[12] Zusammenfassend zeigen unsere Untersuchungen, dass der globale Austausch von Met gegen TFM den größten Einfluss auf die Stabilität des Enzyms hat. Obwohl die Met→TFM-Substitution zweifelsfrei den sterischen Anspruch von Met erhöht,^[4,7] und trotz der Tatsache, dass die Met-Einheiten vor allem im Kern der *KlenTaq*-DNA-Polymerase liegen, sind Aktivität und Genauigkeit nahezu unverändert. Das heißt, dass die Verwendung überaus stabiler Proteine die Möglichkeit schafft, mehrfach fluoridierte Aminosäuren mit hohem Substitutionsgrad selbst in den Kern eines Enzyms einzubauen, ohne dessen Aktivität erheblich zu beeinflussen.

Struktur- und Funktionsuntersuchungen an der *KlenTaq* weisen darauf hin, dass das Enzym wichtige Konformationsänderungen bei der DNA- und Nucleotidbindung durchläuft.^[13] Das Einbringen von ¹⁹F durch den Austausch von Methionin gegen TFM erlaubt Untersuchungen der Enzymdynamik bei der Substraterkennung und der DNA-Synthese. Deshalb analysierten wir das Enzym mit ¹⁹F-NMR-Spektroskopie. Die freie *KlenTaq*-TFM liefert Signale nahe der chemischen Verschiebung der TFM-Aminosäure von $\delta(^{19}\text{F}) = -41$ ppm. Von den wegen der 14 Sequenzpositionen von TFM erwarteten 14 Signalen konnten mindestens 9 identifiziert werden (bei $\delta = -38.31, -39.20, -39.42, -39.68, -40.12, -40.52, -40.95, -41.03$ und -41.39 ppm; Abbildung 3 A). Ihre Linienbreiten sind deutlich unterschiedlich (von 12 Hz beim schärfsten Signal ($\delta = -40.95$ ppm) bis ca. 80 Hz bei den breiten Signalen (-38.31 und -41.39 ppm)).

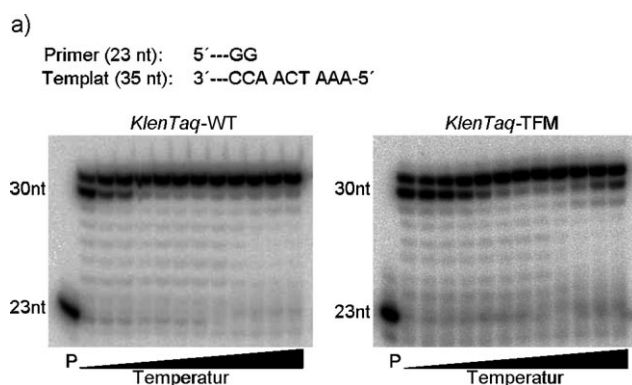
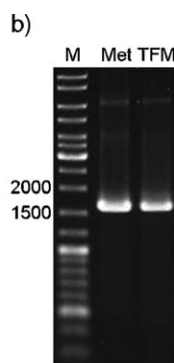


Abbildung 2. Aktivität der *KlenTaq*-TFM. a) *KlenTaq*-WT- und -TFM-katalysierte Primerverlängerungsreaktionen. Teilsequenzen von verwendetem Primer und Templat sind oben dargestellt. P: nur Primer; Temperatur: Primerverlängerung bei 37.0, 37.8, 40.1, 43.7, 47.6, 51.5, 55.4, 59.4, 63.3, 66.9, 69.2 oder 70.0 °C. b) PCR-Amplifikation eines 1655 bp langen Fragments durch *KlenTaq*-WT (Met) und -TFM (TFM). PCR-Programm: Zu Beginn 30 s bei 95 °C und anschließend 35 Zyklen mit 20 s bei 95 °C, 60 s bei 65 °C und 120 s bei 72 °C. M: Marker [bp].



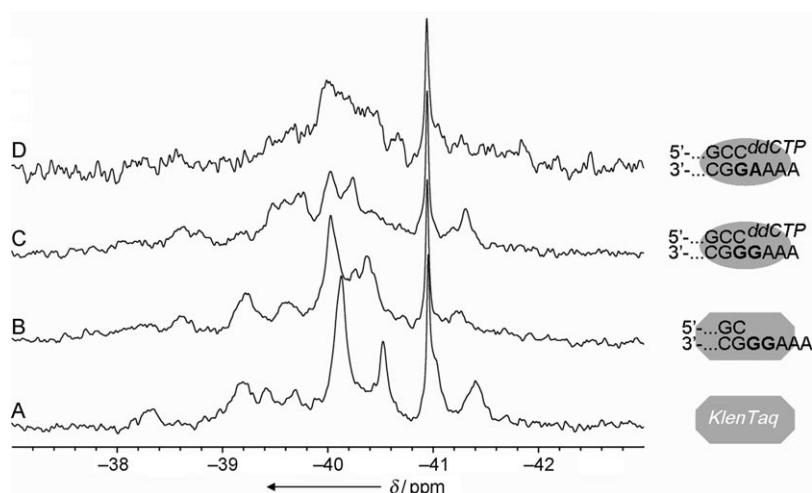


Abbildung 3. ^{19}F -NMR-Spektren von *KlenTaq*-TFM A) ohne Nucleinsäure, B) mit 2 Äquiv. DNA-Substrat (GG), C) mit 2 Äquiv. DNA-Substrat (GG) und nach Zugabe von 10 Äquiv. ddCTP und D) mit 2 Äquiv. eines anderen DNA-Substrats (GA) und nach Zugabe von >100 Äquiv. ddCTP. Die Enzymkonzentrationen waren für A, B und C 42 μM und für D 18 μM (die Intensität bei D wurde an die bei A–C angepasst).

Diese Unterschiede sind höchstwahrscheinlich bedingt durch unterschiedliche Relaxationszeiten der TFM-Einheiten an den verschiedenen Positionen in der 3D-Struktur der *KlenTaq*-TFM. So ist zu erwarten, dass oberflächenexponierte CF_3 -Gruppen, die eine hohe Flexibilität besitzen, deutlich schärfere NMR-Linien aufweisen als CF_3 -Gruppen, die sich im hydrophoben Kern befinden. Als Gründe sind hier kürzere lokale Rotationskorrelationszeiten und eine geringere Zahl von Protonen als dipolare Kopplungspartner zu nennen. Die strukturelle Heterogenität, die durch unvollständige Substitution von Met durch TFM auftritt, könnte ebenfalls zu Linienverbreiterungen führen. Deshalb kommen wir zu der Schlussfolgerung, dass das scharfe Signal bei $\delta = -40.95$ ppm, das unabhängig von der Anwesenheit von Substraten in allen Spektren auftritt, vom Start-TFM stammt, das sich am vermutlich hochflexiblen N-Terminus befindet. Alle anderen Signale werden durch die Zugabe von Substraten mehr oder weniger stark beeinflusst. So treten bei der Bildung eines binären Protein-DNA-Komplexes nach Zugabe eines DNA-Primer-Templat-Komplexes einige scharfe Signale (Halbwertsbreite < 40 Hz) bei neuen chemischen Verschiebungen auf ($\delta = -40.03$, -40.37 , -41.24 ppm), und das Aussehen der breiten Signale beispielsweise um $\delta = -38.31$ oder -39.40 ändert sich ebenfalls (Abbildung 3B). Zugabe von 2',3'-Dideoxycytidin-5'-triphosphat (ddCTP) sollte dann zur Bildung des Phosphodiester mit ddCTP und des ternären Komplexes mit einem zweiten, im aktiven Zentrum gebundenen ddCTP führen.^[13] Tatsächlich unterscheidet sich das Spektrum des ternären Komplexes (Abbildung 3C) sowohl vom Spektrum der freien DNA-Polymerase als auch von dem des binären Komplexes: Die relativ scharfen Signale treten jetzt bei $\delta = -40.02$, -40.23 und -41.30 ppm auf, und die breiten Signale beispielsweise bei $\delta = -38.69$ und -39.59 ppm ändern erneut ihr Aussehen. Zusammenfassend spricht das für eine weitere Konformationsänderung der *KlenTaq*-TFM durch die Wechselwirkung mit ddCTP.

In einem analogen Experiment mit einem DNA-Templat, das an der entsprechenden Position Adenin (A) anstelle von Guanin (G) aufweist, führt die Zugabe von ddCTP zur Bildung eines fehlgepaarten C-A-Basenpaares. Wir konnten beobachten, dass sich das ^{19}F -NMR-Spektrum dieses Komplexes von dem des Komplexes mit der richtigen Basenpaarung unterscheidet. Nahezu alle CF_3 -Signale des fehlgepaarten Komplexes (Abbildung 3D) zeigen eine deutliche Linienverbreiterung. Abgesehen vom Signal bei $\delta = -40.95$ ppm, das wir dem N-terminalen TFM zuweisen (siehe oben), gibt es keine weiteren Signale mit scharfen Linien. Stattdessen liegt ein relativ breiter Signalberg um $\delta = -40.2$ ppm vor. Dies deutet im Fehlpaarungsfall, bei dem ddCTP in ziemlich hoher Konzentration eingesetzt wurde, um eine Sättigung der Nucleosidtriphosphat-Bindungstasche sicherzustellen, auf wesentliche Veränderungen der Proteindynamik oder auf eine vorhandene strukturelle Heterogenität hin.

Diese Strukturänderungen tragen möglicherweise durch eine geringere Effizienz beim Einbau eines nichtkanonischen Nucleotids zur Selektivität der *KlenTaq*-TFM bei. Somit war es möglich, ^{19}F -NMR-spektroskopisch vier Zustände der DNA-Polymerase auf dem Weg zum Nucleotideinbau zu unterscheiden.

Wir haben hier die Synthese einer vielfach fluorierten DNA-Polymerase vorgestellt, die nahezu die gleiche Aktivität und Genauigkeit wie das Ursprungsenzym aufweist. Aufgrund des hohen Met \rightarrow TFM-Substitutionsgrads und des intensiven CF_3 -Signals – selbst nach dem Einbau in dieses vergleichsweise große Protein – ist die *KlenTaq*-TFM eine optimale ^{19}F -NMR-Sonde, um Änderungen von Konformation und Dynamik während der enzymatischen Katalyse aufzuklären. Diese Ergebnisse eröffnen neue Anwendungsmöglichkeiten wie die gerichtete Evolution von DNA-Polymerasen mit neuen Eigenschaften in Kombination mit einem erweiterten Aminosäurerepertoire^[3,14] oder fortführende Untersuchungen der Dynamik von DNA-Polymerasen durch ^{19}F -NMR-Spektroskopie, um weiterführende Einblicke in die Genauigkeit und das Substratspektrum der DNA-Synthese zu erlangen.

Eingegangen am 23. Oktober 2009

Online veröffentlicht am 13. Januar 2010

Stichwörter: DNA-Polymerasen · NMR-Spektroskopie · Nichtnatürliche Aminosäuren · Protein-Engineering · Trifluormethionin

[1] A. Kornberg, T. A. Baker, *DNA Replication*, 2. Aufl., Freeman, New York, 1991.

[2] J. Sambrook, D. W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001.

- [3] a) D. Loakes, P. Holliger, *Chem. Commun.* **2009**, 4619–4631; b) A. A. Henry, F. E. Romesberg, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 370–377; c) S. Brakmann, *Cell. Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 2634–2646.
- [4] a) N. Budisa, *Engineering the Genetic Code*, Wiley-VCH, Weinheim, **2006**; b) Y. Ryu, P. G. Schultz, *Nat. Methods* **2006**, *3*, 263–265; c) L. Wang, P. G. Schultz, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 34–68; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 34–66; d) A. J. Link, M. L. Mock, D. A. Tirrell, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 603–609.
- [5] C. Minks, S. Alefelder, L. Moroder, R. Huber, N. Budisa, *Tetrahedron* **2000**, *56*, 9431–9442.
- [6] Siehe beispielsweise: a) J. C. Jackson, J. T. Hammill, R. A. Mehl, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 1160–1166; b) J. T. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 6303–6306; c) E. A. Pratt, C. Ho, *Biochemistry* **1975**, *14*, 3035–3040; d) O. M. Rennert, H. S. Anker, *Biochemistry* **1963**, *2*, 471–476.
- [7] E. N. G. Marsh, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, R153–R157.
- [8] a) N. Budisa, O. Pipitone, I. Siwanowicz, M. Rubini, P. P. Pal, T. A. Holak, M. L. Gelmi, *Chem. Biodiversity* **2004**, *1*, 1465–1475; b) H. Duewel, E. Daub, V. Robinson, J. F. Honek, *Biochemistry* **1997**, *36*, 3404–3416.
- [9] W. M. Barnes, *Gene* **1992**, *112*, 29–35.
- [10] J. M. Clark, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 9677–9686.
- [11] P. H. Patel, H. Kawate, E. Adman, M. Ashbach, L. A. Loeb, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 5044–5051.
- [12] C. Gloeckner, K. B. M. Sauter, A. Marx, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3175–3178; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3115–3117.
- [13] a) W. J. Allen, P. J. Rothwell, G. Waksman, *Protein Sci.* **2008**, *17*, 401–408; b) P. J. Rothwell, G. Waksman, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 28884–28892; c) P. J. Rothwell, V. Mitaksov, G. Waksman, *Mol. Cell* **2005**, *19*, 345–355.
- [14] a) C. C. Liu, A. V. Mack, M.-L. Tsao, J. H. Mills, H. S. Lee, H. Choe, M. Farzan, P. G. Schultz, V. V. Smider, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 17688–17693; b) T. H. Yoo, A. J. Link, D. A. Tirrell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 13887–13890; c) J. K. Montclare, D. A. Tirrell, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 4630–4633; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4518–4521.