

DOI: 10.1002/ange.200602772

Generierung einer thermostabilen Reverse-Transkriptase-Aktivität aus einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase**

Katharina B. M. Sauter und Andreas Marx*

DNA-Polymerasen sind in der Natur an allen DNA-Synthesen beteiligt^[1] und bilden außerdem die Grundlage zahlreicher biologischer Techniken wie der Polymerasekettenreaktion (PCR), der Klonierung von cDNA, der DNA-Sequenzierung und der auf Nucleinsäuren basierenden diagnostischen Verfahren.^[2] Bei all diesen Methoden benötigt die DNA-Polymerase einen DNA-Strang als Templat für die DNA-Synthese. Mit RNA-Templaten dagegen zeigen DNA-Polymerasen fast keine Aktivität.^[1] Von einigen DNA-Polymerasen wie *Thermus thermophilus* (*Tth*) ist allerdings bekannt, dass sie eine erhöhte Reverse-Transkriptase(RT)-Aktivität in Gegenwart von Mn^{2+} -Ionen entwickeln.^[3] Bei vielen diagnostischen Verfahren für mRNA, z.B. beim Nachweis von Krankheitserregern oder bei der Genexpressionsanalyse, wäre aber ein Zusatz von Mn^{2+} -Ionen ungeeignet.^[4] Unser Ziel war es daher, eine DNA-Polymerase zu entwickeln, die auch ohne Mn^{2+} in der Lage ist, zunächst RNA in DNA zu transkribieren und anschließend die DNA in einer PCR zu amplifizieren. Durch diesen Ansatz sollen neue Einblicke in die Substraterkennung von DNA-Polymerasen gewonnen sowie neue Anwendungen erschlossen werden.

Es wurde bereits gezeigt, dass die gerichtete Evolution ein vielversprechendes Verfahren zur Entwicklung von Nucleinsäure-Polymerasen mit veränderten Eigenschaften ist.^[5] Die hauptsächlich eingesetzten Methoden sind Gen-Komplementation und/oder Screening,^[6] Phagen-Display^[7] und In-vitro-Kompartimentierung.^[8] Hier zeigen wir, dass es durch iteratives Screening kleiner Bibliotheken möglich ist, eine DNA-Polymerase mit einer neuen Funktion zu erhalten, nämlich der Fähigkeit zur RT-PCR. Dies ist eines der seltenen Beispiele, in denen es gelungen ist, aus einer randomisierten Bibliothek eine DNA-Polymerase mit neuer Eigenschaft zu selektieren.

Um eine am N-Terminus verkürzte DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Klentaq*) mit der Funktion einer reversen Transkriptase zu erzeugen,^[9] randomisierten wir den offenen

[*] Dipl.-Chem. K. B. M. Sauter, Prof. Dr. A. Marx
Fachbereich Chemie
Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, M 726, 78457 Konstanz (Deutschland)
Fax: (+49) 7531-88-5140
E-Mail: andreas.marx@uni-konstanz.de

[**] Wir danken der DFG und der Volkswagen-Stiftung für die finanzielle Unterstützung dieses Projekts sowie Samuel Weisbrod für seine Unterstützung bei der Anfertigung des Manuskripts.



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

Leserahmen durch eine fehlerbehaftete PCR (epPCR).^[10] Die Enzyme wurden in 96-Loch-Platten exprimiert und unmittelbar nach Lyse und Hitzedenaturierung der übrigen Proteine ohne weitere Aufreinigung auf ihre PCR-Aktivität mit einem DNA-Templat überprüft. Alle Schritte wurden von einem Pipettierroboter ausgeführt, der einen hohen Durchsatz ermöglicht. Die Aktivität der DNA-Polymerasen wurde über das gebildete PCR-Produkt mithilfe von SYBRgreen I durch parallele Fluoreszenzmessung in 384-Loch-Platten quantifiziert. Die aktiven Mutanten wurden anschließend auf ihre RT-PCR-Aktivität getestet. Hierzu wurde ein natürliches RNA-Templat aus Bakteriophage MS2 verwendet. Die RT-PCR-Aktivität wurde durch Schmelzkurvenanalyse des PCR-Produkts mit SYBRgreen I quantifiziert, wobei 96-Loch-Platten in einem herkömmlichen Echtzeit-PCR-Gerät verwendet wurden.

Nach der Überprüfung von nur 768 PCR-aktiven Mutanten aus ursprünglich 2000 untersuchten Klonen fanden wir eine Mutante (genannt M1), die vielversprechende Eigenschaften in der RT-PCR zeigte. Diese wurde zur weiteren Charakterisierung aufgereinigt (siehe Abbildung S1, Hintergrundinformationen), und wir fanden heraus, dass M1 eine höhere RT-PCR-Aktivität als der Wildtyp aufweist (Abbildung 1a). Während das ursprüngliche Enzym nicht in der

schaft scheint jedoch sequenzspezifisch zu sein, denn mit einem anderen RNA-Templat, z.B. S16-mRNA aus *E. coli*, erhält man ausschließlich das gewünschte Produkt (siehe Abbildung S2, Hintergrundinformationen).

Als nächstes führten wir eine zweite Randomisierungsrunde mit epPCR, paralleler Expression und anschließendem Screening wie oben beschrieben durch. Nach Überprüfung von etwa 2000 PCR-aktiven Mutanten fanden wir ein Enzym (genannt M2), das weiter aufgereinigt und analysiert wurde. M2 ist RT-PCR-aktiv und stellt das gewünschte Produkt her (Abbildung 1a).

Die Sequenzanalyse der Mutante M1 ergab sechs Substitutionen, die über das gesamte Enzym verteilt sind: L322M, L459M, S515R, I638F, S739G und E773G (Abbildung 2a). M2 weist lediglich eine zusätzliche Mutation auf (L789F).

Zum weiteren Vergleich der Eigenschaften von M1 und M2 mit dem Wildtyp-Enzym führten wir Primerverlängerungsexperimente durch (Abbildung 1b). Ein DNA-Primer bindet an ein komplementäres, 50 Nucleotide langes RNA-Templat. Wird dieser Primer-Templat-Komplex zusammen mit Wildtyp der *Klentaq* inkubiert, wird der DNA-Primer um nur ein Nucleotid verlängert. Interessanterweise wird bei der *Tth*-DNA-Polymerase in Abwesenheit von Mn^{2+} eine ähnlich niedrige Aktivität beobachtet (Abbildung S4, Hintergrund-

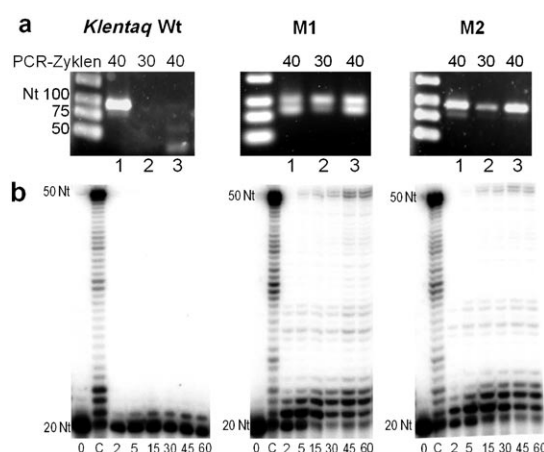


Abbildung 1. Analyse der ausgewählten Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. a) PCR-Aktivität des jeweiligen Enzyms mit einem DNA- (Spuren 1) oder RNA-Templat (Spuren 2, 3). Alle Reaktionen wurden unter identischen Bedingungen ausgeführt (Nt = Nucleotide). b) Reverse-Transkriptase-Aktivität des jeweiligen Enzyms in der angegebenen Reaktionszeit [min] unter identischen Bedingungen. C = Kontrollreaktion mit dem entsprechenden DNA-Templat.

Lage ist, ausgehend von RNA nach 40 PCR-Zyklen ein Produkt zu bilden, gelingt dies M1 unter denselben Bedingungen. Diese wurden einschließlich des verwendeten Puffers so gewählt, wie sie für *Klentaq* und eine PCR, in der von einem DNA-Templat amplifiziert wird, beschrieben wurden.^[6c,9] Die Primer wurden so konzipiert, dass sie an das 3'-Ende des RNA-Templats binden, und ihr Design wurde nicht weiter optimiert. Allerdings stellt das Enzym zwei Produkte her, die durch Analyse mit Gelelektrophorese (PAGE) voneinander unterschieden werden können. Das Hauptprodukt weist die erwünschte Länge und Sequenz auf. Diese Eigen-

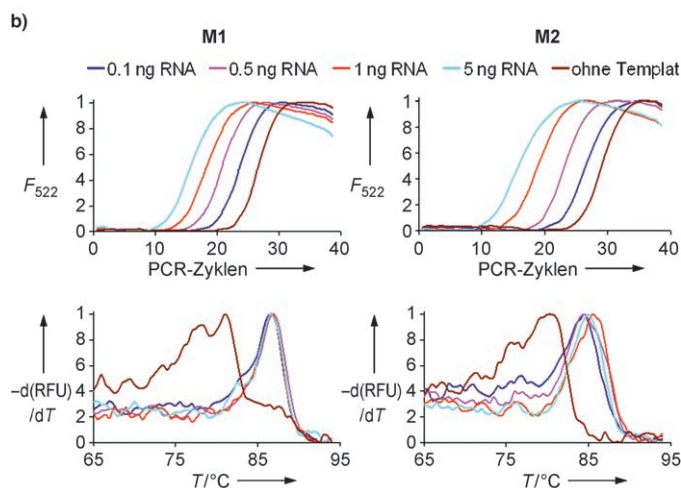
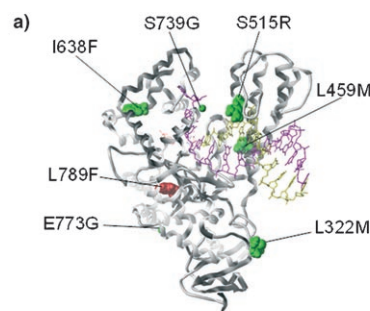


Abbildung 2. a) Mutationen der identifizierten RT-PCR-aktiven DNA-Polymerasen M1 (grün) und M2 (grün und rot), dargestellt in einem Bändermodell der *Klentaq* (PDB-Code 1QSS).^[11] Das DNA-Templat ist in Magenta, der Primerstrang in Gelb dargestellt. b) Oben: Ergebnisse eines RT-PCR-Experiments in Echtzeit mit M1 und M2 und den angegebenen RNA-Konzentrationen. Unten: Schmelzpunktanalyse der Reaktionsprodukte. Diese Experimente wurden in einem konventionellen Echtzeit-PCR-Gerät ausgeführt.

informationen). Im Unterschied dazu transkribieren die beiden Mutanten M1 und M2 RNA mit deutlich höherer Effizienz. Die Quantifizierung der Aktivität auf einem RNA-Templat unter stationären Bedingungen ergab eine 40- bzw. 22fache Steigerung von M1 und M2 gegenüber dem Wildtyp (Tabelle S1, Hintergrundinformationen). M1 und M2 erzeugen ein deutlich längeres Produkt, das für eine RT-PCR ausreicht. Die Quantifizierung einer Primerverlängerung auf einem DNA-Templat zeigte, dass beide Mutanten eine etwa doppelt so hohe Aktivität wie der Wildtyp haben (Tabelle S2, Hintergrundinformationen). Somit wurde durch zwei aufeinander folgende Randomisierungsrunden und anschließendes Screening eine eindeutige Aktivitätszunahme bei einer RNA-abhängigen DNA-Synthese erreicht. Weitere Vergleiche der Mutanten mit dem Wildtyp-Enzym zeigten, dass diese Zunahme zwar nicht mit einer Abnahme der Thermostabilität, jedoch aber mit einem Rückgang an Selektivität einhergingen (siehe Hintergrundinformationen).

Eine spezifische Detektion von RNA durch reverse Transkription und die anschließende Amplifizierung der DNA ist für viele diagnostische Anwendungen wesentlich, z. B. für die Entdeckung von Pathogenen oder für die Genexpressionsanalyse.^[4] Um RNA durch eine RT-PCR zu amplifizieren, werden üblicherweise zwei Enzyme verwendet: eine reverse Transkriptase, die den komplementären DNA-Strang synthetisiert, und eine thermostabile DNA-Polymerase für die Amplifizierung. Der erste Schritt ist jedoch fehleranfällig, da die RNA stabile Sekundärstrukturen bilden kann und die verwendeten reversen Transkriptasen eine geringe Thermostabilität haben.^[3] M1 und M2 sind insbesondere für einen RT-PCR-Ansatz in einem Schritt von Interesse. Wir untersuchten deshalb durch Echtzeit-RT-PCR, ob diese Mutanten zum quantitativen RNA-Nachweis geeignet sind.^[12] Diese Methode wird umfassend bei der Diagnose von Pathogenen und der Genexpression verwendet.^[4] Wir verfolgten die Reaktionen, die unterschiedliche Konzentrationen an RNA enthielten, mit einem konventionellen Echtzeit-PCR-Gerät. Zur Detektion der doppelsträngigen DNA wurde SYBRgreenI verwendet. In der Tat sind M1 und M2 unter Standardbedingungen in der Lage, ausgehend von verschiedenen RNA-Konzentrationen DNA zu amplifizieren (Abbildung 2b). Die untere Grenze der RNA-Konzentration liegt dabei im Bereich derer kommerziell erhältlicher Kits. Mit dem Wildtyp-Enzym wurden keine vergleichbaren Amplifikationskurven erhalten.

Zusammenfassend ist es uns gelungen, durch Screening von Bibliotheken aus DNA-Polymerasen, die durch epPCR erhalten wurden und die zufällig randomisierte Mutanten enthielten, DNA-Polymerasen mit RT-PCR-Aktivität zu identifizieren – eine Eigenschaft, die dem Wildtyp-Enzym fehlt. Wie gezeigt, finden diese Mutanten sofortige Anwendung und könnten die Grundlage für die Entwicklung neuer Enzyme für RT-PCR-Techniken wie pathogene RNA-Detektion oder Genexpressionsanalyse in Echtzeit bilden. Funktionelle und strukturelle Untersuchungen über den Ursprung dieser neuen Eigenschaft sind in Vorbereitung.

Eingegangen am 12. Juli 2006

Online veröffentlicht am 20. Oktober 2006

Stichwörter: DNA-Erkennung · DNA-Polymerase · Gerichtete Evolution · Polymerasekettenreaktion · Reverse Transkriptase

- [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) T. W. Myers, D. H. Gelfand, *Biochemistry* **1991**, *30*, 182–192; b) M. D. Jones, *Methods Enzymol.* **1993**, *218*, 413–419; c) V. I. Grabko, L. G. Chistyakova, V. N. Lyapustin, V. G. Korobko, A. I. Miroshnikov, *FEBS Lett.* **1996**, *387*, 189–192.
- [4] a) S. A. Bustin, R. Mueller, *Clin. Sci.* **2005**, *109*, 365–379; b) A. K. Sandvik, B. K. Alsberg, K. G. Nørsett, F. Yadetie, H. L. Waldum, A. Lægreid, *Clin. Chim. Acta* **2006**, *363*, 157–164; c) S. Mocellin, C. R. Rossi, P. Pilati, D. Nitti, F. M. Marincola, *Trends Mol. Med.* **2003**, *9*, 189–195.
- [5] 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) E. Loh, L. A. Loeb, *DNA Repair* **2005**, *4*, 1390–1398.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] W. M. Barnes, *Gene*, **1992**, *112*, 29–35.
- [10] R. C. Cadwell, G. F. Joyce, *PCR Methods Appl.* **1992**, *2*, 28–33.
- [11] Y. Li, V. Mitaxov, G. Waksman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9491–9496.
- [12] J. Wilhelm, A. Pingoud, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 1120–1128.