

## Struktur und Funktion einer RNA-lesenden thermostabilen DNA-Polymerase\*\*

Nina Blatter, Konrad Bergen, Oliver Nolte, Wolfram Welte, Kay Diederichs, Jutta Mayer, Markus Wieland und Andreas Marx\*

Die hohe Substratspezifität von DNA-abhängigen DNA-Polymerasen ist einerseits für die Stabilität des Genoms, andererseits auch für viele biotechnologische Anwendungen essentiell.<sup>[1]</sup> Speziell in vivo ist die Diskriminierung zwischen Ribo- und Desoxyribonukleotiden sowie zwischen RNA und DNA wichtig, da die Anzahl der Ribosebausteine die der Desoxyribosebausteine bei weitem übersteigt. Während der Selektionsmechanismus beim Einbau von Nukleotiden durch DNA- und RNA-Polymerasen<sup>[2]</sup> schon intensiv studiert wurde, ist darüber hinaus wenig bekannt, wie DNA-abhängige DNA-Polymerasen zwischen den verschiedenen Nukleinsäuretemplaten (DNA zu RNA) unterscheiden. Einige virale DNA-Polymerasen (z. B. Reverse Transkriptasen) sind in der Lage, DNA und RNA als Templat für die Nukleinsäuresynthese zu verwenden. Die Analyse der Kristallstrukturen dieser Enzyme, im Komplex mit RNA oder DNA als Templat, hat maßgeblich zum Verständnis dieses Prozesses<sup>[3]</sup> beigetragen. Für DNA-abhängige DNA-Polymerasen, die RNA-Template nur schlecht prozessieren können, fehlt es allerdings an vergleichbaren strukturellen Daten, was vermutlich durch die Entstehung instabiler Komplexe und einer daraus resultierenden strukturellen Heterogenität, die die Kristallisation erschweren, begründet werden kann.

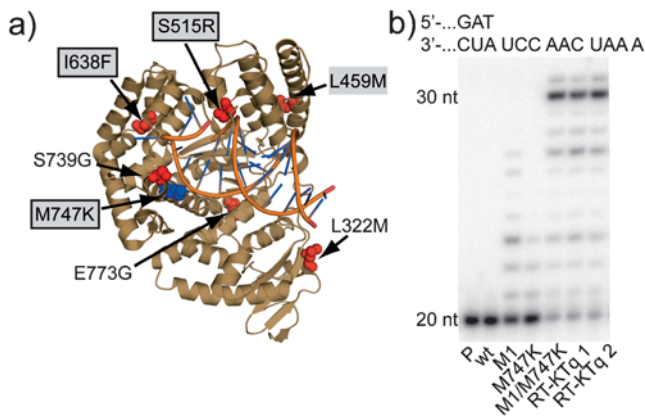
Die Kristallstrukturanalyse der *KlenTaq*-DNA-Polymerase, einer verkürzten Form der DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, hat erheblich zum Verständnis beigetragen, wie DNA-Polymerasen das natürliche Substrat erkennen<sup>[4]</sup> sowie abasische Stellen<sup>[5]</sup> und nicht-natürliche Nukleotide prozessieren.<sup>[4d-g]</sup> Da unsere Bestrebungen, entsprechende Kristalle der *KlenTaq* im Komplex mit RNA zu erhalten, misslangen, versuchten wir das Enzym dahingehend weiter-

zuentwickeln, dass es in der Lage ist, ein RNA-Templat mit erhöhter Effizienz zu prozessieren. Wir erhofften uns daraus verbesserte Kristallisationseigenschaften des Enzyms. Tatsächlich erhielten wir eine erheblich verbesserte *KlenTaq*-Variante, die uns zum ersten Mal strukturelle Einblicke lieferte, wie eine DNA-abhängige DNA-Polymerase ein RNA-Templat prozessiert. Zudem stellte sich die generierte *KlenTaq*-Variante als eine thermostabile DNA-Polymerase mit signifikanter Reverse-Transkriptase-Aktivität heraus, die in der Molekularbiologie und der klinischen Diagnostik Anwendung finden kann, wie z. B. in der Transkriptomanalyse oder der Erkennung von Pathogenen und krankheitsspezifischen Markern.

Für die Generierung einer verbesserten Enzymvariante wurden die Mutationen zweier *KlenTaq*(KTq)-Varianten M1 (L322M, L459M, S515R, I638F, S739G, E773G)<sup>[6]</sup> und M747K<sup>[7]</sup> über DNA-Shuffling kombiniert, um alle möglichen Mutationskombinationen zu erhalten. Der Literatur zufolge besitzen beide Enzyme entweder eine gewisse Reverse-Transkriptase-Aktivität oder ein erweitertes Substratspektrum. DNA-Shuffling wurde als Methode der Rekombination verwendet, da die M1-Variante, mittels fehlerbehafteter Polymerasekettenreaktion (PCR) erzeugt, sechs Mutationen aufweist, die über das gesamte Enzym verteilt sind. Die einzelnen Einflüsse der Mutationen sind jedoch unbekannt. Eine Bibliothek mit 1570 Klonen wurde generiert, um eine hohe Abdeckung aller Mutationskombinationen zu erzielen (siehe Hintergrundinformationen). Die Enzyme wurden in 96er Lochplatten exprimiert und unmittelbar nach der Lyse und Hitzedenaturierung der *E. coli*-eigenen Proteine in einem Echtzeit-PCR-Aktivitätstest mit DNA als Templat eingesetzt. Da ca. 80 % der exprimierten Enzyme PCR-Aktivität zeigten, testeten wir direkt im Anschluss auf Reverse-Transkriptase-Aktivität unter Verwendung eines MS2-RNA-Templats, wie bereits beschrieben.<sup>[6]</sup> In diesem Screening wurden zwei Varianten, RT-KTq1 und RT-KTq2, identifiziert und aufgrund ihrer signifikant erhöhten Reverse-Transkriptase-Aktivität gegenüber den parental Enzymen und einer minimalen Anzahl an Mutationen weiter charakterisiert. RT-KTq1 besitzt drei Mutationen (S515R, I638F und M747K), wohingegen RT-KTq2 zusätzlich zu den Mutationen von RT-KTq1 eine weitere Mutation aufweist (L459M, Abbildung 1 a). Für Vergleichsstudien wurde über zielgerichtete Mutagenese eine Variante generiert, die alle sieben Mutationen aufweist (KTq M1/M747K). Der KTq-Wildtyp, die parental Enzyme M1 und M747K, KTq M1/M747K und RT-KTq1 und 2 wurden exprimiert, gereinigt, auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt (Abbildung S1) und weiter charakterisiert.

[\*] M. Sc. N. Blatter, Dipl.-Biol. K. Bergen, Prof. Dr. W. Welte, Prof. Dr. K. Diederichs, Dr. J. Mayer, Dr. M. Wieland, Prof. Dr. A. Marx  
Fachbereiche Chemie und Biologie, Graduiertenschule Chemische Biologie, Universität Konstanz  
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)  
E-Mail: andreas.marx@uni-konstanz.de  
Priv.-Doz. Dr. O. Nolte  
Labor Dr. Brunner Konstanz  
Mainaustraße 48 a/b, 78464 Konstanz (Deutschland)

[\*\*] Wir danken der Graduiertenschule Chemische Biologie, der Universität Konstanz, dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie und der DFG für Unterstützung. Wir danken auch den Mitarbeitern des SLS (Swiss Light Source) für ihre Unterstützung sowie S. Geigges und I. Grießer für ihre Hilfe bei den Kristallisationsstudien.



**Abbildung 1.** Charakterisierung von KTq-Wildtyp und Mutanten. a) Struktur der KTq-DNA-Polymerase (PDB 3RTV) mit den Mutationen von KTq M1 und M747K jeweils rot und blau markiert. Die RT-KTq2-Mutationen sind grau hinterlegt, die RT-KTq1-Mutationen sind schwarz umrandet. b) Primerverlängerungsreaktionen mit einem 5'-<sup>[32P]</sup>-markierten Primer (20 nt) gebunden an ein RNA-Templat. Reaktionen wurden für 1 min bei 72 °C inkubiert. Teilsequenzen des Primers und des Templats sind dargestellt. P=Primer; wt=Wildtyp.

Zuerst wurde die Reverse-Transkriptase-Aktivität des Wildtyps und aller Varianten in Primerverlängerungsreaktionen, unter Verwendung eines 5'-<sup>[32P]</sup>-radioaktiv markierten DNA-Primers, der an ein RNA-Templat bindet, untersucht. Die Reaktionen wurden für 1 min bei 72 °C inkubiert und anschließend mittels denaturierender PAGE analysiert (Abbildung 1b). Im Falle eines RNA-Templats konnte keine Verlängerung des Primers durch den Wildtyp beobachtet werden. KTq M747K hingegen war in der Lage, drei Nucleotide einzubauen, während KTq M1 sogar längere Produkte bis hin zu sieben Einbauten synthetisieren konnte. KTq M1/M747K und RT-KTq1 und 2 hingegen übertrafen die parental Enzyme bei weitem und zeigten eine fast quantitative Umsetzung des Primers zum Volllängenprodukt nach 1 min (Abbildung 1b). Der bereits für DNA-Polymerasen beschriebene<sup>[5a,b,8]</sup> templat-unabhängige Einbau eines Nucleotids wurde außerdem im Falle der Entstehung des Volllängenprodukts beobachtet.

**Tabelle 1:** Spezifische Aktivitäten der KTq-Varianten auf einem DNA- oder RNA-Templat.

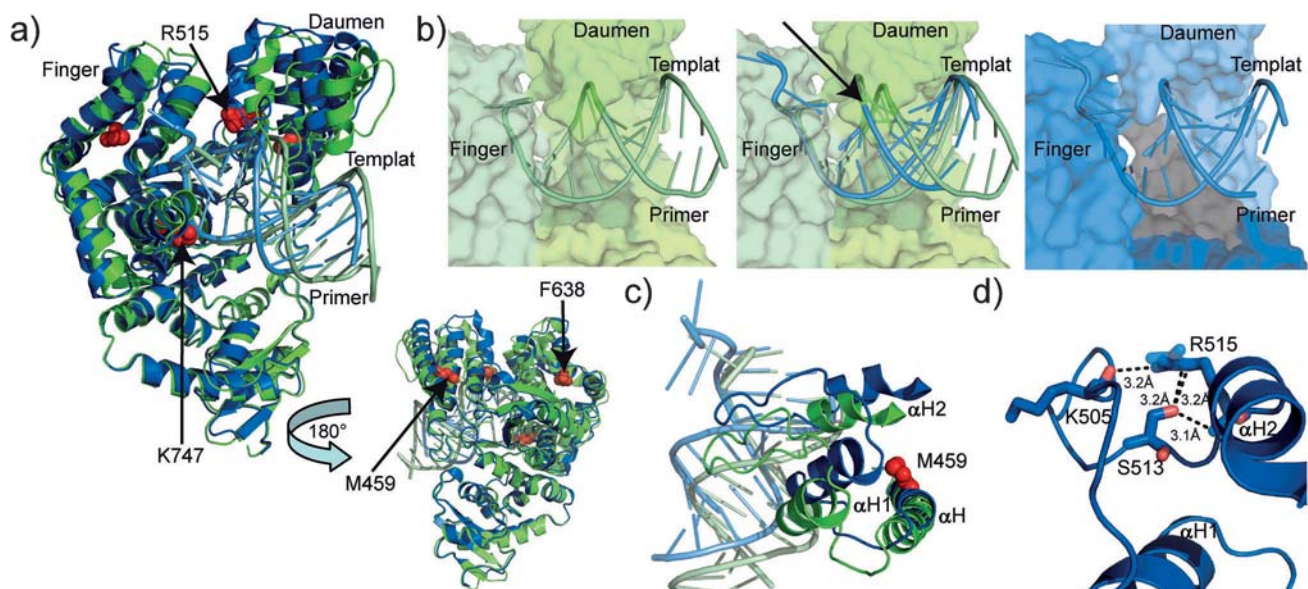
Variante	Spezifische Aktivität <sup>[a]</sup> [min <sup>-1</sup> ] DNA-Templat	Spezifische Aktivität <sup>[a]</sup> [min <sup>-1</sup> ] RNA-Templat
KTq wt	145 ± 14	n.a. <sup>[b]</sup>
KTq M1	252 ± 21	1.67 ± 0.05
KTq M747K	279 ± 18	0.31 ± 0.01
KTq M1/M747K	342 ± 11	32.2 ± 1.8
RT-KTq1	181 ± 12	15.7 ± 0.6
RT-KTq2	349 ± 13	34.9 ± 1.3

[a] Der gemessene Umsatz an dNTPs pro Minute wurde gegen verschiedene Polymerasemengen aufgetragen; die daraus resultierende Geradensteigung ergab die spezifische Aktivität des jeweiligen Enzyms. [b] n.a.: nicht auswertbar, da keine signifikante Aktivität auf einem RNA-Templat nachgewiesen werden konnte.

Eine Quantifizierung der jeweiligen Aktivitäten auf einem DNA- und RNA-Templat<sup>[9]</sup> bestätigte die Überlegenheit der identifizierten Varianten M1/M747K, RT-KTq1 und 2 gegenüber den parental Enzymen (Tabelle 1). Die Rekombination zweier KTq-Mutanten führte zu einer neuen Generation von KTq-Varianten, die gegenüber der parental Variante KTq M1 eine bis zu 20-fach und gegenüber KTq M747K eine bis zu 100-fach erhöhte Reverse-Transkriptase-Aktivität aufweist (Tabelle 1). Falls die Kombination der Mutationen einen additiven Effekt zur Folge hätte, würde man eine zweifach erhöhte Reverse-Transkriptase-Aktivität erwarten. Allerdings deuten unsere Ergebnisse auf eine nicht-additive Interaktion der einzelnen Mutationen hin, mit dem Ergebnis eines synergistischen Effekts.<sup>[10]</sup>

Aufgrund der höheren Gesamtaktivität von RT-KTq2 im Vergleich zu RT-KTq1 (Tabelle 1) und einer höheren Stabilität gegenüber KTq M1/M747K (Abbildung S2) verwendeten wir RT-KTq2 für die weitergehenden Experimente. Um strukturelle Einblicke zu gewinnen, versuchten wir als nächstes, Kristalle von RT-KTq2 zu erhalten. Dafür kristallisierten wir RT-KTq2 im Komplex mit einem DNA-Primer (11-mer) und einem RNA-Templat (16-mer) und zum Vergleich mit dem entsprechenden Primer/Templat-DNA-Duplex. Detaillierte Angaben zur Probenvorbereitung, Kristallisation sowie die kristallographische Statistik sind in den Hintergrundinformationen aufgeführt. Wir waren in der Lage, die Struktur von RT-KTq2 im Komplex mit einem Primer/Templat-DNA-Duplex und einem eintretenden 2',3'-Dideoxycytidin-5'-triphosphat (ddCTP) mit einer Auflösung von 1.55 Å (benannt RT-KTq2<sub>DNA</sub>, PDB ID 4BWJ) zu lösen.

Die Gesamtstruktur von RT-KTq2<sub>DNA</sub> ist fast identisch zu bereits beschriebenen geschlossen ternären Strukturen für den KTq-Wildtyp mit einem DNA-Duplex<sup>[4]</sup> (z. B. PDB ID 3RTV)<sup>[4d]</sup> und zeigt eine geringe mittlere Standardabweichung (rmsd) des Ca um 0.33 Å (Abbildung S3 a,b). Darüber hinaus gelang es uns, Kristalle der Enzymvariante im Komplex mit einem DNA/RNA-Hybridduplex mit einer Auflösung von 1.75 Å (benannt RT-KTq2<sub>RNA</sub>, PDB ID 4BWM) zu erhalten. Die Struktur zeigt einen halboffenen Zustand, der vermutlich durch Kristallkontakte erzeugt wird. Ein Vergleich von RT-KTq2<sub>RNA</sub> und RT-KTq2<sub>DNA</sub> offenbart größere Veränderungen in der Daumendomäne aufgrund der veränderten geometrischen Eigenschaften des Hybrid-Duplexes (Abbildung 2a). Dabei zeigt das RNA-Templat Ribose-Konformationen, die typisch für die A-Form sind, während die Zucker des DNA-Primers verschiedene Konformationen annehmen, die von der typischen B-Form abweichen (Tabelle S1).<sup>[11]</sup> Die drei Basenpaare am Ende eines DNA/DNA-Duplexes, in der Nähe der O-Helix der DNA-Polymerase, liegen schon in der A-Form vor.<sup>[4a]</sup> Daher werden nur strukturelle Änderungen des Proteins in den Bereichen unterhalb dieser drei, am aktiven Zentrum gelegenen Basenpaare benötigt, um sich der veränderten Geometrie des DNA/RNA-Hybrid-Duplexes anzupassen (Abbildung 2b). Eine Überlagerung des DNA/DNA- und des Hybrid-Duplexes in RT-KTq2<sub>DNA</sub> zeigt, dass sich ein Teil der Daumendomäne des Proteins mit dem DNA/RNA-Hybrid-Duplex überschneiden würde. Infolgedessen wird eine weitere strukturelle Anpassung des Proteins benötigt. Verglichen mit RT-KTq2<sub>DNA</sub> be-

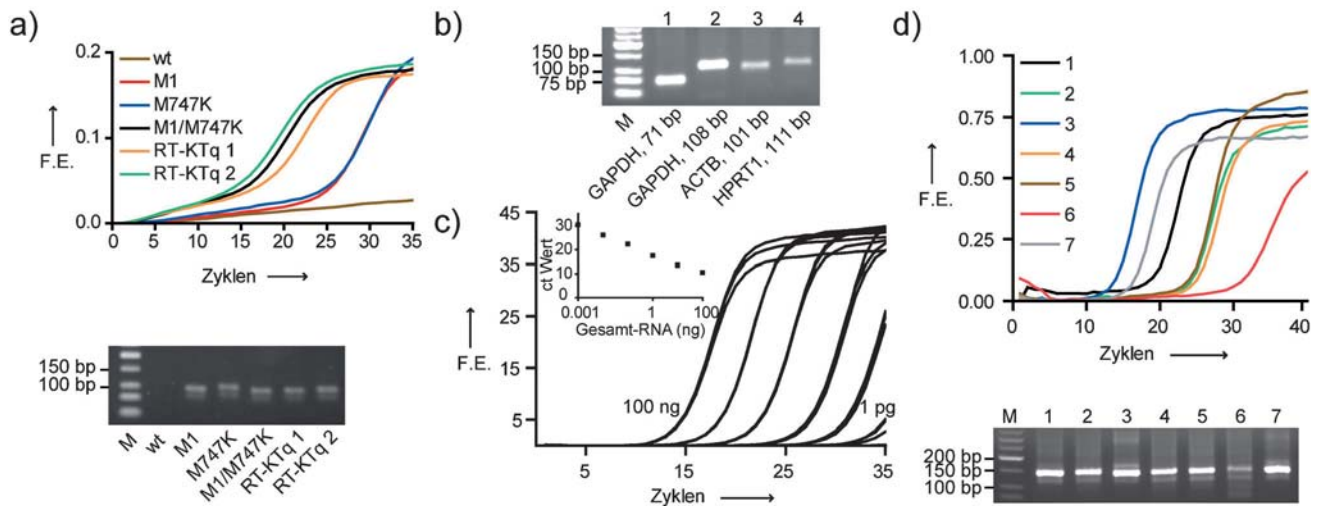


**Abbildung 2.** Kristallstrukturen von RT-KTq2<sub>DNA</sub> und RT-KTq2<sub>RNA</sub>. a) Struktur von RT-KTq2<sub>DNA</sub> (grün) überlagert mit RT-KTq2<sub>RNA</sub> (blau). DNA-Duplex und DNA/RNA-Hybrid sind jeweils hellgrün und hellblau abgebildet. Die Mutationen sind im Kugelmodell (rot) dargestellt. b) Eine Nahaufnahme zeigt den DNA-Duplex in RT-KTq2<sub>DNA</sub> (links), eine Überlagerung des DNA- und Hybrid-Duplexes in RT-KTq2<sub>DNA</sub> (mittig) und den DNA/RNA-Hybrid-Duplex in RT-KTq2<sub>RNA</sub> (rechts). Die Überlagerung des Hybrid- und des DNA-Duplexes verdeutlicht, dass die Daumendomäne aufgrund der veränderten Geometrie des DNA/RNA-Hybrids umlagern muss, da sonst ein Zusammenstoß mit dem Enzym die Folge wäre (markiert durch den Pfeil). c) Die Nahaufnahme hebt die Lage der M459-Mutation in den H-Helices hervor. M459 ist als Kugelmodell (rot) dargestellt. d) Die Nahaufnahme zeigt die Interaktionen ausgehend von der Mutation S515R. Die Mutation R515 ist als Stabmodell (blau) dargestellt; eine alternative Konformation ist transparent gezeigt.

obachteten wir daher, vorwiegend in der 3'-Region des Templats, eine verringerte Anzahl an Kontakten zwischen dem Enzym und dem Hybrid-Duplex und mehrere Veränderungen im Interaktionsmuster (Abbildung S4). Auffällig dabei ist, dass der größere Teil der Umstrukturierung des Proteins in der Daumendomäne ab L459M in  $\alpha$ H beginnt (Abbildung 2c, S3c). Diese Veränderung entspringt wahrscheinlich der Mutation von L459 zu der sterisch weniger anspruchsvollen und flexibleren Seitenkette von Methionin. Diese ermöglicht das Verkrümmen der  $\alpha$ H und eine anschließende Verschiebung von  $\alpha$ H1 und  $\alpha$ H2 in die Nähe des Hybrid-Duplexes, wodurch die Eigenschaften dieses Bindemotivs gewahrt werden (Abbildung 2c).<sup>[4a]</sup> Dieses Motiv wird durch die S515R-Mutation in der  $\alpha$ H2 stabilisiert. Diese zeigt zwei Konformationen des Arginins in der RT-KTq2<sub>RNA</sub>-Struktur, wodurch Interaktionen mit der Hydroxygruppe von S513 und dem Peptidrückgrat von K505 ermöglicht werden (Abbildung 2d). Die Funktion der I638F-Mutation ist weniger offensichtlich; sie könnte jedoch aufgrund von hydrophoben und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit benachbarten Aminosäuren eine stärkere Faltung der Fingerdomäne bewirken. Im Gegensatz zu der RT-KTq2<sub>DNA</sub>-Struktur sind hier die Mutationen R515 und F638 in „simulated-annealing-omit“-Karten aufgelöst, was wiederum auf eine Stabilisierung der jeweiligen Region hindeutet und unsere Annahme weiter stützt (Abbildung S3 d,e). Letztendlich erhöht die Mutation M747K die positive Oberflächenladung in der Nähe des negativ geladenen Rückgrats der DNA.<sup>[5b]</sup> Dies könnte die Bindung des Nucleinsäurerückgrats erleichtern und dadurch die Fähigkeit, ungewöhnliche Substrate zu akzeptieren, för-

dern. Analog dazu gibt es eine Studie, bei der eine positive Ladung, eingeführt in die Daumendomäne einer thermostabilen DNA-Polymerase, identifiziert wurde, die eine effizientere Prozessierung eines nicht-natürlichen RNA-Primer/DNA-Templat-Duplexes beim Einbau von Ribonucleotiden erlaubt.<sup>[12]</sup>

Als nächstes untersuchten wir die potentielle Anwendung von RT-KTq2 in der Molekularbiologie oder klinischen Diagnostik, indem wir PCR-Experimente mit reverser Transkription (RT-PCR) durchführten. RNA wird als Templat in der Transkriptomanalyse, der Pathogendetektion und der krankheitsspezifischen Markererkennung im Zuge der RT-PCR verwendet.<sup>[13]</sup> Diese Methode beruht auf der Detektion und Quantifizierung von RNA, die enzymatisch zu ihrer komplementären DNA umgeschrieben (reverse Transkription) und anschließend in der PCR amplifiziert wird. Dadurch kann das Vorkommen von spezifischen RNA-Molekülen, auch in Echtzeit, verfolgt werden. Da die DNA-Polymerasen, die in einer gewöhnlichen PCR verwendet werden, keine ausreichende Reverse-Transkriptase-Aktivität besitzen, werden zwei Enzyme für die RT-PCR benötigt: eine reverse Transkriptase und eine PCR-kompetente DNA-Polymerase. Obwohl der Einsatz von zwei Enzymen der Standard ist, entstehen durch die Hitzeinstabilität der verwendeten retroviralen mesophilen reversen Transkriptasen<sup>[14]</sup> einige Nachteile, wie z. B. eine unspezifische Bindung der Primer, geringe Ausbeuten bei komplexen RNA-Molekülen, die Sekundärstrukturen ausbilden, und ein vorzeitiger Abbruch der Reaktion.<sup>[13a]</sup> Zusätzlich verlängert der RT-Schritt das PCR-Protokoll bis zu 30 min, eine Verzögerung, die gerade bei



**Abbildung 3.** RT-PCR durchgeführt mit RT-KTq2. a) Echtzeit-RT-PCR, durchgeführt mit Wildtyp (wt), M1, M747K, M1/M747K, RT-KTq1 und 2 (wie angegeben), in der ausgehend von MS2-Bakteriophagen-RNA ein 100-mer amplifiziert wurde. Die Fluoreszenzmessung basierte auf der Bindung von SYBRGreen I an doppelsträngige DNA. Die Produktbildung wurde auf einem 2.5% Agarosegel analysiert. M: Marker. F.E. = Fluoreszenzeinheiten. b) Der Nachweis von mRNA-Transkripten erfolgte ausgehend von der gesamten humanen zellulären RNA (Jurkat-Zellen) in ca. 20 min in einer extrem schnellen PCR. Amplifikate: GAPDH (71 bp; 108 bp, Annealing/Verlängerung bei 61 °C), Actin (ACTB; 101 bp, Annealing/Verlängerung bei 72 °C) und Hypoxanthinphosphoribosyltransferase 1 (HPRT1; 111 bp, Annealing/Verlängerung bei 63 °C), jeweils in Spur 1, 2, 3 und 4 gezeigt. M: Marker. c) Echtzeit RT-PCR, in der ein Fragment (90-mer) des humanen  $\beta$ -Actins ausgehend von verschiedenen Verdünnungen gesamteter RNA (Jurkat-Zellen) amplifiziert wurde. Die Templat-Verdünnungsreihe reichte von 100 ng bis 1 pg, jeweils um einen Faktor 10 verdünnt. Die Reaktionen wurden in Triplikaten durchgeführt. Einschub: Auftragung der ct (cycle threshold)-Werte gegen die Menge an gesamteter zellulärer RNA. d) Nachweis von Influenzavirus A ausgehend von RNA-Extrakten von sieben verschiedenen Proben. Die Produktbildung wurde per 2.5% Agarosegel analysiert. M: Marker.

Krankheitsausbrüchen – wenn Hunderte von Abstrichen analysiert werden müssen – einen kritischen Punkt darstellt. Daher würden thermostabile DNA-Polymerasen mit der Fähigkeit für RT und PCR die Verwendung von zwei Enzymen überflüssig machen und eine Zeit- und Arbeitsreduzierung bieten. Zuerst wurden die gereinigten Enzyme in Echtzeit-RT-PCR unter Verwendung eines MS2-Bakteriophagen-RNA-Templats untersucht.<sup>[6]</sup> Unter den verwendeten Bedingungen zeigt RT-KTq2 ungefähr 10 Zyklen früher als das parentale Enzym KTq M1 eine Produktbildung, während der Wildtyp keine erkennbare Aktivität aufweist (Abbildung 3a). Die korrekte Produktbildung wurde per Agarosegelanalyse bestätigt. Zusätzlich konnten wir demonstrieren, dass RT-KTq2, verglichen mit dem parentalen Enzym M1, in der Lage ist, signifikant längere Produkte zu generieren (Abbildung S5). Um die Anwendung von RT-KTq2 zum Nachweis von verschiedenen mRNA-Transkripten ausgehend von extrahierter, humaner zellulärer RNA (isoliert aus Jurkat-Zellen) zu untersuchen, wurden 71 bis 111 Basenpaare (bp) lange Produkte mit RT-PCR amplifiziert (Abbildung 3b). Eine DNA-Kontamination konnte ausgeschlossen werden, da Zielsequenzen mit zugehörigem Intron ausgewählt wurden. Ein extrem schnelles PCR-Protokoll wurde in diesem Experiment verwendet, das neben einer Initialdenaturierung von 30 s bei 98 °C aus zwei Schritten (insgesamt 30 Zyklen) bestand: 2 s Denaturierung und 15 s für einen kombinierten Annealing-/Verlängerungsschritt (die verwendeten Temperaturen sind in der Abbildungslegende angegeben). Ein zusätzlicher RT-Schritt wurde ausgelassen, wodurch eine weitere Zeitersparnis erzielt wurde. Somit konnte ein RNA-

Nachweis in ungefähr 20 min erreicht werden. Die Bildung des erwarteten Produkts konnte für alle Zielsequenzen beobachtet werden (Abbildung 3b). Zusätzlich untersuchten wir mit Echtzeit-RT-PCR die Sensitivität von RT-KTq2 in der RNA-Detektion. Ein 90 Nukleotide (nt) langer Abschnitt der humanen  $\beta$ -Actin-mRNA wurde ausgewählt und ausgehend von der gesamten zellulären RNA (Jurkat-Zellen) amplifiziert (Abbildung 3c). Wiederum wurde ein PCR-Programm bestehend aus zwei Schritten verwendet und die Produktbildung durch Bindung von SYBRGreen I nachgewiesen. Die RNA-Detektion war über eine große Bandbreite an Konzentrationen, von 100 ng bis zu der geringen Menge von 1 pg, linear und kann damit durchaus mit kommerziell erhältlichen Enzymen konkurrieren (Abbildung S6).

Als nächstes untersuchten wir die Fähigkeit von RT-KTq2, Influenzavirus A mit TaqMan-basierter Echtzeit-RT-PCR nachzuweisen. Influenzaviren waren der Auslöser für mehrere Pandemien,<sup>[15]</sup> weshalb schnelle Detektionsmethoden benötigt werden, um neue Ausbrüche früh zu erkennen und medizinisch eingreifen zu können. Da eine 5'-Nuklease-Aktivität für die Hydrolyse zweifach-markierter TaqMan-Sonden benötigt wird, verwendeten wir eine Enzymmischung bestehend aus Taq-DNA-Polymerase-Wildtyp und RT-KTq2. Die RNA-Extrakte stammten von Rachen-Abstrichen auf Influenza A positiv getesteter Patienten. Ein 141 nt langer Bereich des Influenza A-Matrixproteins wurde mit Echtzeit-RT-PCR unter Verwendung eines zweistufigen PCR-Protokolls amplifiziert. Darüber hinaus verwendet wurden eine TaqMan-Sonde, die mit einem Molekül konjugiert wurde, das in die kleine Furche der DNA bindet,<sup>[16]</sup> um die Spezifität der

Reaktion zu erhöhen, und zusätzlich für Influenza A-Detektion empfohlene, optimierte Primer. Ein ansteigendes Fluoreszenzsignal wurde für sieben verschiedene Proben beobachtet und die korrekte Produktbildung auf einem Agarosegel sichtbar gemacht (Abbildung 3 d).

Wir haben hier die erste Struktur einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase beim Einbau eines Nucleotids gegenüber einem RNA-Templat vorgestellt, deren Wildtyp-Vorläufer keine signifikante Reverse-Transkriptase-Aktivität zeigte. Die Ergebnisse zeigen deutlich die veränderte Struktur des DNA/RNA-Duplexes verglichen mit einem DNA/DNA-Duplex. Zusätzlich wurden wichtige Aminosäuren identifiziert, die den Wildtyp daran hindern, RNA effektiv als Templat zu verwenden. Während die Mutation M747K die Bindungsaffinität zu jeder negativ geladenen Nucleinsäure erhöhen könnte, stabilisiert die S515R-Mutation das Nucleinsäurebindemotiv in der Daumendomäne. Die L459M-Mutation bringt eine erhöhte Flexibilität der Daumendomäne mit sich, die dazu beiträgt, eine Kollision mit dem DNA/RNA-Hybriden zu verhindern. Darüber hinaus konnten wir vielversprechende Eigenschaften der Enzymvariante aufzeigen, die ihren Einsatz in schneller Detektion und Quantifizierung von RNA mit RT-PCR nach ungefähr 20 min ermöglichen. Das Enzym ermöglicht eine Vielzahl von Anwendungen, wie z. B. schnelle Transkriptionsanalyse oder der RNA- und DNA-Nachweis von Pathogenen. Da RT-KTq2 Reverse-Transkriptase- und PCR-Aktivität in einem Enzym vereint, besitzt es ein großes Potential, den Arbeitsaufwand und zeitaufwändige Optimierungen auf ein Mindestmaß zu reduzieren, ohne dabei die Zuverlässigkeit der Analyse zu beeinträchtigen.

Eingegangen am 30. Juli 2013,

veränderte Fassung am 16. August 2013

Online veröffentlicht am 17. September 2013

**Stichwörter:** DNA-Polymerasen · Enzym-Engineering · Polymerasekettenreaktion · Reverse Transkription · Strukturbioogie

- [1] T. A. Kunkel, K. Bebenek, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 497–529.
- [2] a) M. Ricchetti, H. Buc, *EMBO J.* **1993**, *12*, 387–396; b) C. M. Joyce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 1619–1622 und vorhandene Referenzen; c) P. H. Patel, L. A. Loeb, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 40266–40272; d) M. Ogawa, A. Tosaka, Y. Ito, S. Yoshida, M. Suzuki, *Mutat. Res.* **2001**, *485*, 197–207; e) G. Xia, L. Chen, T. Sera, M. Fa, P. G. Schultz, F. E. Romesberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 6597–6602; f) J. L. Ong, D. Loakes, S. Jaroslowski, K. Too, P. Holliger, *J. Mol. Biol.* **2006**, *361*, 537–550; g) S. A. N. McElhinny, D. Kumar, A. B. Clark, D. L. Watt, B. E. Watts, E. B. Lundstrom, E. Johansson, A. Chabes, T. A. Kunkel, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 774–781;
- h) J. A. Brown, Z. Suo, *Biochemistry* **2011**, *50*, 1135–1142; i) W. Wang, E. Y. Wu, H. W. Hellinga, L. S. Beese, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 28215–28226.
- [3] a) L. A. Kohlstaedt, J. Wang, J. M. Friedman, P. A. Rice, T. A. Steitz, *Science* **1992**, *256*, 1783–1790; b) A. Jacobo-Molina, J. Ding, R. G. Nanni, A. D. Clark, Jr., X. Lu, C. Tantillo, R. L. Williams, G. Kamer, A. L. Ferris, P. Clark, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 6320–6324; c) H. Huang, R. Chopra, G. L. Verdine, S. C. Harrison, *Science* **1998**, *282*, 1669–1675; d) J. Ding, K. Das, Y. Hsiou, S. G. Sarafianos, A. D. Clark, Jr., A. Jacobo-Molina, C. Tantillo, S. H. Hughes, E. Arnold, *J. Mol. Biol.* **1998**, *284*, 1095–1111; e) S. G. Sarafianos, K. Das, C. Tantillo, A. D. Clark, Jr., J. Ding, J. M. Whitcomb, P. L. Boyer, S. H. Hughes, E. Arnold, *EMBO J.* **2001**, *20*, 1449–1461; f) E. Nowak, W. Potrzebowski, P. V. Konarev, J. W. Rausch, M. K. Bona, D. I. Svergun, J. M. Bujnicki, S. F. Le Grice, M. Nowotny, *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 3874–3887.
- [4] a) Y. Li, S. Korolev, G. Waksman, *EMBO J.* **1998**, *17*, 7514–7525; b) Y. Li, V. Mitaxov, G. Waksman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9491–9496; c) Y. Li, G. Waksman, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 1225–1233; d) K. Betz, D. A. Malyshev, T. Lavergne, W. Welte, K. Diederichs, T. J. Dwyer, P. Ordoukhanian, F. E. Romesberg, A. Marx, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 612–614; e) S. Obeid, H. Busskamp, W. Welte, K. Diederichs, A. Marx, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 8320–8322; f) K. Bergen, A.-L. Steck, S. Strütt, A. Baccaro, W. Welte, K. Diederichs, A. Marx, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 11840–11843; g) S. Obeid, A. Baccaro, W. Welte, K. Diederichs, A. Marx, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 21327–21331.
- [5] a) S. Obeid, N. Blatter, R. Kranaster, A. Schnur, K. Diederichs, W. Welte, A. Marx, *EMBO J.* **2010**, *29*, 1738–1747; b) S. Obeid, A. Schnur, C. Gloeckner, N. Blatter, W. Welte, K. Diederichs, A. Marx, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 1574–1580; c) S. Obeid, W. Welte, K. Diederichs, A. Marx, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 14099–14108.
- [6] K. B. Sauter, A. Marx, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7795–7797; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7633–7635.
- [7] C. Gloeckner, K. B. Sauter, A. Marx, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3175–3178; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3115–3117.
- [8] J. M. Clark, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 9677–9686.
- [9] N. Z. Rudinger, R. Kranaster, A. Marx, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 185–194.
- [10] M. T. Reetz, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 2720–2729; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2658–2666.
- [11] O. Fedoroff, M. Salazar, B. R. Reid, *J. Mol. Biol.* **1993**, *233*, 509–523.
- [12] C. Cozens, V. B. Pinheiro, A. Vaisman, R. Woodgate, P. Holliger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 8067–8072.
- [13] a) S. A. Bustin, *J. Mol. Endocrinol.* **2000**, *25*, 169–193; b) S. A. Bustin, R. Mueller, *Clin. Sci.* **2005**, *109*, 365–379.
- [14] G. F. Gerard, R. J. Potter, M. D. Smith, K. Rosenthal, G. Dhariwal, J. Lee, D. K. Chatterjee, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 3118–3129.
- [15] P. Palese, *Nat. Med.* **2004**, *10*, S82–87.
- [16] I. V. Kutyavin, I. A. Afonina, A. Mills, V. V. Gorn, E. A. Lukhtanov, E. S. Belousov, M. J. Singer, D. K. Walburger, S. G. Likhov, A. A. Gall, R. Dempcy, M. W. Reed, R. B. Meyer, J. Hedgpeth, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 655–661.