

## Fingerabdrücke von DNA-Polymerasen: mehrfache simultane Enzym-Charakterisierung auf DNA-Arrays\*\*

Ramon Kranaster und Andreas Marx\*

DNA Polymerasen kommen bei einer ganzen Fülle von biotechnologischen Anwendungen zum Einsatz, insbesondere bei der Polymerasekettenreaktion (PCR), genetischen Klonierungen, Genomsequenzierungen und bei diagnostischen Anwendungen.<sup>[1]</sup> Für Klonierungen sind hoch prozessive und möglichst fehlerfreie DNA Polymerasen erwünscht, da diese zu kürzeren Verlängerungszeiten und zu einer robusteren Amplifikation mit großer Ausbeute führen. Eine höhere Genauigkeit von DNA Polymerasen könnte Genomsequenzierungen und diagnostische Anwendungen verlässlicher machen.<sup>[2]</sup> Die Amplifikation von prähistorischen DNA Proben erfordert DNA Polymerasen mit einem erweiterten Substratspektrum, damit typische DNA Schäden effizient überlesen werden können.<sup>[3]</sup> Um die Effizienz von forensischen DNA Tests zu erhöhen, braucht man DNA Polymerasen, die resistent gegen Inhibitoren aus Blut und Erdproben sind und somit eine PCR ohne vorherige DNA Reinigung möglich machen.<sup>[4]</sup> Weitere Verbesserungen von DNA Polymerasen sind z.B. notwendig, um den Anforderungen von DNA Sequenzierungen einzelner Moleküle zu genügen, die auf dem effizienten Einbau modifizierter Nucleotide beruhen.<sup>[5]</sup> Insgesamt werden dringend maßgeschneiderte, künstliche DNA Polymerasen benötigt, die zu robusteren und spezifischeren Reaktionssystemen führen.

Die gerichtete Evolution ist eine vielversprechende Methode zur Erzeugung von Nucleinsäure Polymerasen mit veränderten Eigenschaften.<sup>[6]</sup> Diese veränderten Eigenschaften werden hauptsächlich durch gerichtete molekulare Evolution erzeugt, z.B. durch genetische Komplementierung, Screening, Phagen Display oder In vitro Kompartimentierung.<sup>[7-10]</sup> Nach unserem Wissen sind jedoch alle bekannten Methoden für die Evolution von DNA Polymerasen auf eine einzelne Enzymeigenschaft begrenzt, z.B. auf erhöhte Selektivität oder verbessertes Prozessieren von DNA Schäden.<sup>[7-10]</sup> Um diese offensichtliche Beschränkung zu überwinden, entwickelten wir eine Technik, die uns das mehrfache Durchmusterung (Screening) mehrerer Eigenschaften von DNA Polymerasen nebeneinander ermöglicht.

Wir berichten hier von einem Chip basierten Screening Format, das uns eine gleichzeitige, mehrfache Charakterisierung von verschiedensten Enzymeigenschaften im Hochdurchsatz ermöglicht. Das System beruht auf der räumlichen Trennung von unterschiedlichen, kovalent gebundenen DNA Substraten auf einem Glasträger und deren selektiver Adressierung durch Oligonucleotidhybridisierung. Dabei genügt eine Standard Mikroarray Ausrüstung, um die Reaktionen auszuführen und auszuwerten. Unsere Methode ist zeit und kosteneffizient und verbraucht nur geringste Mengen an Reagentien.

Das Prinzip unseres Ansatzes, genannt Oligonucleotid adressierender Enzymassay (OAEA), ist in Abbildung 1a dargestellt. Im Wesentlichen besteht er aus zwei Spotting Schritten und einem Inkubationsschritt. Zuerst werden 5' NH<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> modifizierte DNA Oligonucleotide kovalent in definierten Spot Reihen auf 1,4 Phenylendiisothiocyanat aktivierten Glasträgern angebracht.<sup>[11]</sup> Diese Oligonucleotide fungieren als Primer Stränge in den nachfolgenden enzymatischen Reaktionen. Die Glasträger können bei 4°C mehrere Wochen aufbewahrt werden, ohne ihre Brauchbarkeit merklich einzubüßen. Danach werden während eines zweiten Spotting Schrittes Enzymmutanten in einem Puffer aufgetragen, der entsprechende DNA Template, dNTPs und ein Biotin dUTP Derivat enthält.

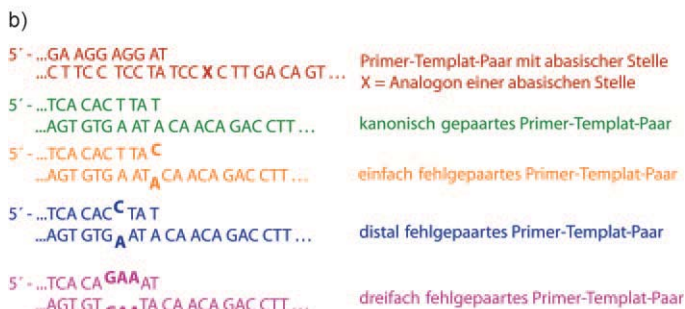
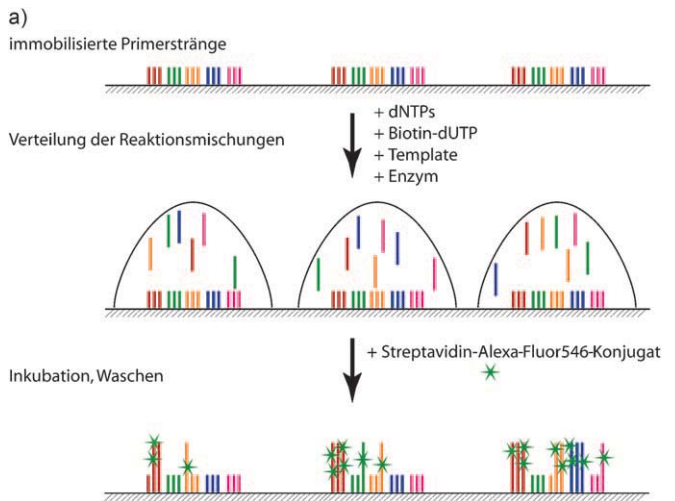
Die Mischungen werden in Nanolitermengen auf dieselben Positionen wie zuvor die durch Spotting aufgetragenen Primer Stränge verteilt. Während dieses Vorganges trocknen die Spots ein. Anschließend werden die Glasträger in einer Feuchtigkeitskammer bei ca. 50°C inkubiert, was zur Rehydratation der Spots führt. Bemerkenswert ist, dass wir in unabhängigen Studien in Lösung trotz des Eintrocknens und Rehydratisierens kaum eine Veränderung der Aktivität der verwendeten DNA Polymerase (siehe unten) beobachtet haben (siehe Hintergrundinformationen).

Die Rehydratation der Spots lässt kleine, getrennte Reaktionsräume entstehen, in denen jeweils eine DNA Polymerasenmutante die Primer Template Duplexstrukturen, die durch den Spot bedeckt werden, prozessiert. Anschließend werden alle Reaktionen auf dem Glasträger durch kurzes, mehrfaches Spülen mit wässriger Tensidlösung beendet. Hat eine Primer Verlängerung stattgefunden, wurde Biotin dUTP in den entsprechenden Primer Strang eingebaut. Anschließend wird durch Inkubation mit einem Streptavidin Alexa Fluor546 Konjugat, das an das eingebaute Biotin bindet, ein Fluoreszenzsignal generiert (Abbildung 1a).

Zur Überprüfung unseres experimentellen Aufbaus testeten wir das Mikroarray System auf die Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen aktiven und inaktiven DNA Polymerasenmutanten. Deshalb immobilisierten wir zunächst

[\*] Dipl. Chem. R. Kranaster, 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](mailto:andreas.marx@uni-konstanz.de)

[\*\*] Wir danken der DFG (SPP1170) und dem BMBF (BioChancePlus) für finanzielle Unterstützung.



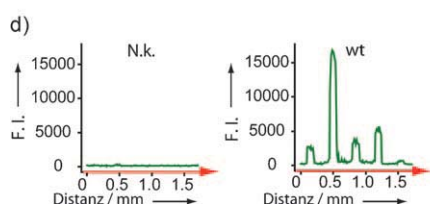
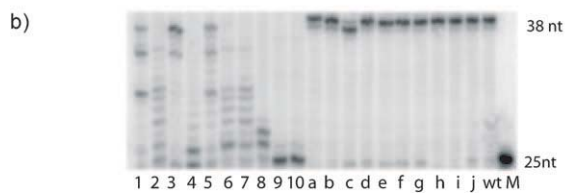
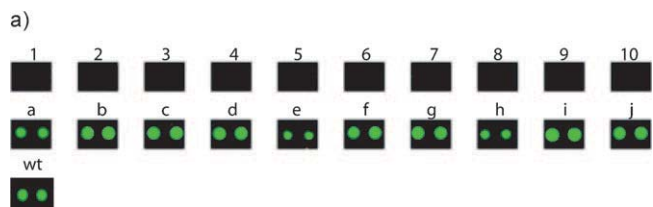
**Abbildung 1.** OAEA Prinzip. a) Kurze farbige Balken repräsentieren im immobilisierte Primer Stränge; lange farbige Balken repräsentieren Template, die selektiv durch die Hybridisierung mit den komplementären Primer Strängen adressiert werden. Grüne Sterne repräsentieren Streptavidin Alexa Fluor546 Konjugate, die an die eingebauten Biotine der verlängerten Primer Stränge binden. b) In dieser Studie verwendete Teilssequenzen.

Primer Stränge, die komplett kanonisch an ein Template (120 Nucleotide lang) binden. Für das Screening verwendeten wir eine Bibliothek einer N terminal verkürzten DNA Polymerase von *Thermus aquaticus* (KlenTaq),<sup>[12]</sup> die durch fehlerbehaftete PCR erhalten worden war.<sup>[8b,d]</sup> Die Polymerasenbibliothek wurde zunächst in *E. coli* Zellen, verteilt in 96er Lochplatten, exprimiert. Nach Expression, Zellyse und Hitzedenaturierung von Gastproteinen wurden die Zellysate mit Puffer, DNA Template, dNTPs und einem Biotin dUTP Derivat gemischt. Durch Spotting wurden die Polymeraselösungen daraufhin so aufgetragen, dass jede Enzymvariante zwei Primer Spots bedeckte, sodass duplizierte Resultate unter identischen Bedingungen erhalten werden konnten.

Wir konnten die Menge an immobilisierter DNA zu 100 amol und jene an Enzym zu 200 300 amol abschätzen (weitere experimentelle Details siehe Hintergrundinformationen). Nach Inkubation und Reaktionsabbruch durch Waschen wurden die Glaträger mit einer wässrigen Lösung von Streptavidin Alexa Fluor546 Konjugat behandelt, erneut gewaschen und mit einem Standard Mikroarray Scanner aus gelesen.

Wir testeten darüber hinaus den Einsatz fluoreszenzmarkierter 2' Desoxynucleosid 5' triphosphate als Ersatz für den oben beschriebenen Ansatz auf Biotin Streptavidin Basis, erhielten jedoch selbst nach gründlichem Waschen noch hohe Fluoreszenz Hintergrundwerte, die von einer unspezifischen Bindung des modifizierten Triphosphats herrührten, was diese Variante für unsere Zwecke nutzlos machte.

Als nächstes suchten wir zur weiteren Charakterisierung zufällig jeweils zehn Mutanten aus, die sich durch das Fehlen oder Vorhandensein von fluoreszierenden Spots auf dem Mikroarray als nichtaktiv bzw. aktiv zeigten (Abbildung 2 a). In der Tat führten die OAEAs nichtaktiver Mutanten auch in Lösung nur zu geringen Primer Verlängerungen, im Unterschied zu den OAEA aktiven Mutanten, die Volllängenprodukte lieferten (38 Nucleotide lang, Abbildung 2 b). Wir verwendeten ein kürzeres Template für die Primer Verlängerungsreaktionen in Lösung, das sich im gleichen Sequenzkontext wie jenes für die Durchmusterung befand, um eine bessere Auflösung bei der Analyse der Reaktionsprodukte mithilfe von Gelelektrophorese zu erhalten. Die Enzyme



**Abbildung 2.** OAEA Evaluierung. a) Zehn zufällig ausgesuchte nichtaktive Mutanten (1-10) und zehn zufällig ausgesuchte aktive Mutanten (a-j). Eine genauere Betrachtung der Daten findet sich in den Hintergrundinformationen. b) Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese von in Lösung durchgeführten Primer Verlängerungsreaktionen durch die ausgesuchten Mutanten aus (a). M: Marker, Reaktion ohne Zellysate. c,d) OAEA Ergebnisse mit KlenTaq Wildtyp (wt) exprimierendem Zellysate und einer Negativkontrolle (N.k.) von Zellysaten mit einem Plasmid ohne das *KlenTaq* Gen. d) Fluoreszenz Intensitäts Profile (F.I.) entlang des roten Pfeils, wie in (c) angedeutet. Weitere experimentelle Details finden sich in den Hintergrundinformationen.

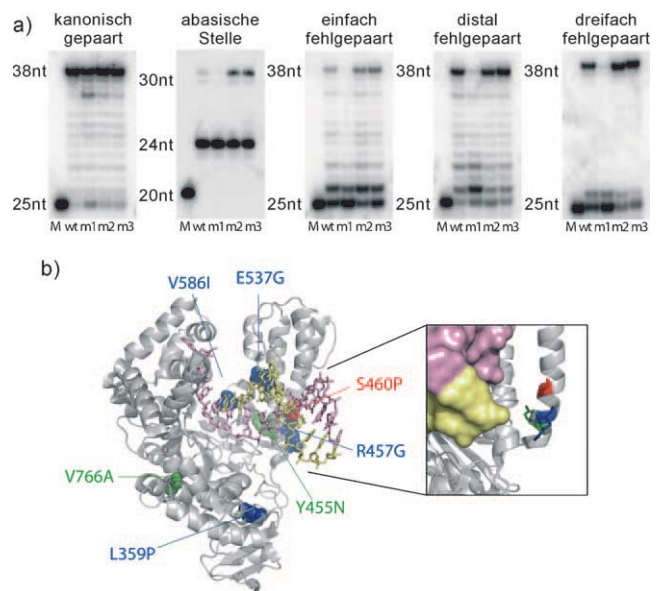
knüpfen zudem ein zusätzliches Nucleotid an das Vollständiggenprodukt, wie es für DNA Polymerasen mit fehlender 3' 5' Exonuclease-domäne schon beschrieben wurde.<sup>[13]</sup> Folglich stimmen unsere Befunde in Lösung mit den an fester Phase erhaltenen hervorragend überein.

Als nächstes testeten wir das gleichzeitige Prozessieren von fünf unterschiedlichen Primer-Templat-Komplexen mit einer DNA-Polymerasenbibliothek. Wir verwendeten ein Templat mit einem Analogon einer abasischen Stelle, das bekanntermaßen ein großes Hindernis für viele DNA-Polymerasen darstellt.<sup>[14]</sup> Zudem untersuchten wir verschiedene am 3' Ende des Primer-Stranges fehlgepaarte Substrate: ein einfach endständig, ein einfach distal und ein dreifach fehlgepaartes Substrat (DNA-Sequenzen siehe Abbildung 1b und Hintergrundinformationen). Als Referenz wurde ein vollständig kanonisch gepaarter Primer-Templat-Komplex verwendet. Wir durchmusterten ohne weitere Optimierung eine kleine Bibliothek von 736 *KlenTaq* Mutanten mit den fünf verschiedenen Primer-Templat-Komplexen. Dabei bedeckte jeder einzelne Enzym- und Puffer enthaltende Reaktionsraum alle fünf Primer-Spots in Duplikaten. Generell fanden wir wie erwartet für den vollständig kanonischen Fall die höchste Fluoreszenzintensität. Das Signal/Rausch-Verhältnis des *KlenTaq* Wildtyps mit dem unmodifizierten Primer-Templat-Substrat war immer größer als 35:1, während für die Negativkontrolle (N.k.), bei der ein Bakterienextrakt ohne *KlenTaq* Gen verwendet wurde, die geringste Fluoreszenz detektiert wurde (Abbildung 2c,d). Die erhaltenen Signal/Rausch-Verhältnisse übertreffen zuvor beschriebene Werte für Fluoreszenz-basierte Screening-Methoden.<sup>[8,15]</sup>

Die Verlängerungsaktivitäten für das einfach und das distal fehlgepaarte Substrat sowie die abasische Stelle betragen nur 15–30% derjenigen für das kanonische Substrat, für das dreifach fehlgepaarte Substrat sogar nur 3–5%. Insgesamt fanden wir ein breites Spektrum an unterschiedlichen Aktivitäten in den durchmusterten 736 Enzymmutanten. Dies ermöglichte uns das Charakterisieren und Klassifizieren durch spezifische „Fingerabdrücke“ der DNA-Polymerasen. Die vielversprechendsten drei Mutanten (m1–m3) wurden daraufhin erneut exprimiert, gereinigt und in Reaktionen in Lösung weitergehend charakterisiert (siehe Hintergrundinformationen).

Mutante m1 zeigte eine außergewöhnliche Diskriminierung fehlgepaarter Substrate und eine geringere Tendenz zur Überwindung der abasischen Stelle als das Wildtypenzym (Abbildung 3a). Die Sequenzierung des mutierten Gens wies die Einzelmutation Serin 460 (S460) zu Prolin (P) auf. S460 ist in der H-Helix der *KlenTaq* Daumendomäne lokalisiert (Abbildung 3b). Wegen der Helix-brechenden Eigenschaften von Prolin<sup>[17]</sup> kann angenommen werden, dass die Helix in der S460P-Mutante ihre definierte Konformation verloren hat. Die Mutanten m2 und m3 zeigten gegensätzliche Eigenschaften und wiesen eine höhere Fähigkeit für die Überwindung der abasischen Stelle (an Nucleotidposition 24) als das Wildtypenzym auf. Ebenfalls zeigten m2 und m3 eine höhere Verlängerungsaktivität mit den fehlgepaarten Substraten als der Wildtyp und Mutante m1.

Die Sequenzierung der Mutanten offenbarte zwei Mutationen für m2 (Y455N, V766A) und vier Mutationen für m3



**Abbildung 3.** Evaluierung der veränderten Eigenschaften der durch OAEA identifizierten Mutanten. a) Prozessierung verschiedener DNA-Substrate in Lösung durch die evolvierten *KlenTaq* Mutanten (m1–m3) im Vergleich mit dem Wildtypenzym. Alle Reaktionen wurden mit den identischen Reaktionspuffer und dNTP-Konzentrationen durchgeführt (je 100  $\mu$ M). Enzymkonzentrationen und Inkubationszeiten: kanonisch gepaart, einfach und distal fehlgepaart: 1 nM, 15 min; dreifach fehlgepaart und abasisch: 50 nM, 60 min. In den letzten beiden Fällen waren eine höhere Enzymkonzentration und eine verlängerte Inkubationszeit notwendig, um die Verlängerung der stärker gestörten DNA-Komplexe zu erzielen. Genauere experimentelle Details finden sich in den Hintergrundinformationen. M: Marker, Reaktion ohne Enzym. b) Die Mutationsstellen in den evolvierten *KlenTaq* DNA-Polymerasen m1 (rot), m2 (grün) und m3 (blau) sind in Form eines Bändermodells der *KlenTaq* (PDB-Code: 1QSS)<sup>[16]</sup> dargestellt. Die Vergrößerung zeigt die gefundenen Mutationsstellen von m1–m3 in der H-Helix.

(L359P, R457G, E537G, V586I). Bisher ist noch unklar, welcher Aminosäureaustausch am stärksten zu den beobachteten Effekten beiträgt. Beide Mutanten m2 und m3 weisen genau wie m1 Mutationen in der H-Helix auf (Abbildung 3b). Zwar geht die H-Helix keinen direkten Van-der-Waals-Kontakt mit dem DNA-Substrat ein, unsere Befunde zeigen allerdings, dass eine Mutation in dieser Helix einen Einfluss auf das Prozessieren von verschiedenen Substraten haben kann.

Unsere Screening-Methode ermöglicht die Erstellung von DNA-Polymerase-„Fingerabdrücken“ durch direktes Vergleichen der Prozessierungseigenschaften der DNA-Polymerase mit den verschiedenen DNA-Substraten. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit der Tatsache, dass die leichtere Überwindung von DNA-Schäden durch m2 und m3 mit einer geringeren Diskriminierung von fehlgepaarten Substraten einhergeht, in Einklang mit früheren Berichten.<sup>[8d,10b]</sup> m1 scheint hingegen generell eine höhere Diskriminierung für gestörte DNA-Strukturen, wie fehlgepaarte Primer-Stränge und DNA-Schäden, aufzuweisen.

Wir haben hier von einem neuen Mikroarray zur gerichteten Evolution von DNA-Polymerasen berichtet, den wir Oligonucleotid-adressierenden Enzymassay (OAEA) nennen. Erste Ergebnisse demonstrieren die Brauchbarkeit

unserer Methode. Wir konnten neue DNA Polymerasemutanten mit veränderten Eigenschaften identifizieren. Im Vergleich zu anderen bekannten Methoden für die gerichtete Evolution von DNA Polymerasen bietet der OAEA mehrere signifikante Vorteile: Zum einen ermöglicht diese Methode das mehrfache simultane Durchmustern von verschiedensten DNA Polymeraseaktivitäten unter identischen Bedingungen. Zusätzlich können ohne weiteres Mehrfachbestimmungen, wie hier mit Duplikaten gezeigt, von jeder Reaktion durchgeführt werden. Diese Eigenschaften machen den OAEA zu einer verlässlichen und wenig fehlerbehafteten Methode in Bezug auf falsch positive und falsch negative Befunde. Weiterhin können bei einem äußerst geringen Verbrauch an Reagentien alle Schritte durch automatisierte Pipettierroboter durchgeführt werden. Angesichts der heutigen Fortschritte bei der Mikroarray Herstellung mit mehr als 6000000 möglichen diskreten Spots<sup>[18]</sup> auf einem Chip könnte ein simultanes Ultra Hochdurchsatz Screening von großen Bibliotheken mit Tausenden von Mutanten realisiert werden. Ferner könnten, da alle Reaktionen einzeln ausgeführt werden können, einzelne DNA Polymerasen verschiedenen Ursprungs parallel charakterisiert werden. Zusätzlich können andere DNA modifizierende Enzyme wie Ligasen oder Endonucleasen zur mehrfachen gerichteten Evolution mithilfe von OAEA verwendet werden.

- 
- [1] J. Sambrook, D. W. Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **2001**.
- [2] B. Gilje, R. Heikkilä, S. Oltedal, K. Tjensvoll, O. Nordgård, *J. Mol. Diagn.* **2008**, *10*, 325–331.
- [3] M. d'Abbadie, M. Hofreiter, A. Vaisman, D. Loakes, J. Gasparutto, R. Cadet, S. Woodgate, S. Pääbo, P. Holliger, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 939–943.
- [4] M. B. Kermekchiev, L. I. Kirilova, E. E. Vail, W. M. Barnes, *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, e40.
- [5] J. Eid et al., *Science* **2009**, *323*, 133–138.
- [6] 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.
- [7] 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) E. Loh, J. Choe, L. A. Loeb, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 12201–12209.
- [8] a) D. Summerer, N. Z. Rudinger, I. Detmer, A. Marx, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4791–4794; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4712–4715; b) K. B. M. Sauter, A. Marx, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7795–7797; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7633–7635; c) M. Strerath, C. Gloeckner, D. Liu, A. Schnur, A. Marx, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 395–401; d) C. Gloeckner, K. B. M. Sauter, A. Marx, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 3175–3178; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 3115–3117.
- [9] 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.
- [10] 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. Jaroslowski, K. Too, P. Holliger, *J. Mol. Biol.* **2006**, *361*, 537–550.
- [11] a) R. Kranaster, P. Ketzer, A. Marx, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 694–697; b) J. Gaster, G. Rangam, A. Marx, *Chem. Commun.* **2007**, 1692–1694.
- [12] W. M. Barnes, *Gene* **1992**, *112*, 29–35.
- [13] J. M. Clark, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 9677–9686.
- [14] a) L. A. Loeb, B. D. Preston, *Annu. Rev. Genet.* **1986**, *20*, 201–230; b) M. F. Goodman, H. Cai, L. B. Bloom, R. Eritja, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1994**, *726*, 132–142.
- [15] D. Summerer, A. Marx, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3778–3780; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 3620–3622.
- [16] Y. Li, V. Mitaxov, G. Waksman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9491–9496.
- [17] N. Sewald, H. D. Jakubke, *Peptides: Chemistry and Biology*, Wiley VCH, Weinheim, **2002**.
- [18] T. C. Mockler, S. Chan, A. Sundaresan, H. Chen, S. E. Jacobsen, J. R. Ecker, *Genomics* **2005**, *85*, 1–15.