

**Erzeugung von Taq-DNA-Polymerasemutanten
und Untersuchung ihrer Substratspezifität
mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von

Claudia Matthies

geb. Pauk

aus Wedel

Hamburg 2003

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden in der Zeit von Oktober 1997 bis Januar 2002 unter der Leitung von Prof. Dr. H. Köster am Institut für Organische Chemie, Abteilung für Biochemie und Molekularbiologie, des Fachbereiches Chemie der Universität Hamburg sowie bei der Firma SEQUENOM GmbH, Hamburg, durchgeführt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. H. Köster

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. J. Voß

Tag der Disputation: 02.05.2003

Wir sollten nie aufhören, zu neuen Zielen aufzubrechen.
Doch am Ende unserer Erkundung sind wir plötzlich wieder da,
wo die Reise begann, und wir meinen, zum ersten Mal hier zu sein.

T.S. Elliot

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis.....	I
II	Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1	Einleitung.....	1
1.1	Die wachsende Bedeutung der DNA-Analytik.....	1
1.2	MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	3
1.3	DNA-Polymerase I aus <i>Thermus aquaticus</i>	5
2	Problemstellung.....	11
3	Klonierung mutagenisierter Taq-Polymerase-Gene.....	13
3.1	Expressionssystem.....	13
3.2	Konzeption der Punktmutationen.....	14
3.3	Erzeugung und Klonierung der Punktmutationen.....	18
4	Expression, Isolierung und Voruntersuchungen.....	21
4.1	Proteinexpression.....	21
4.2	Proteinisolierung.....	21
4.3	Quantifizierung der gewonnenen Proteinmengen.....	24
4.4	Standard-PCR mit den Polymerasevarianten.....	25
4.5	Bestimmung der spezifischen Aktivität.....	27
5	Hochdurchsatzanalyse modifizierter Taq-Polymerasen mittels MALDI-TOF-MS.....	33
5.1	Primer-Extension-Reaktion.....	33
5.2	Reaktionsführung und Probenkonditionierung.....	34
5.3	Quantitative MALDI-TOF-Analyse der Reaktionsprodukte.....	37
5.3.1	Quantifizierung von Oligonukleotiden.....	37
5.3.2	Voruntersuchungen zur quantitativen Auswertung von MALDI-Spektren.....	38
5.4	Untersuchungsergebnisse mit verschiedenen Nukleotiden.....	42
5.4.1	Desoxyribonukleotide.....	42
5.4.2	Ribonukleotide.....	68
5.4.3	α -Thiodesoxynukleotide (α -S-dNTP).....	71
5.4.4	Weitere modifizierte Nukleotide.....	86
5.4.4.1	2'-Desoxy-7,9-Dideaza-7-oxoadenosin-5'-triphosphat (dA*TP).....	86
5.4.4.2	5-Hydroxy-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat (OH-dCTP).....	89
5.4.4.3	2-Thio-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat (S-dCTP).....	92
5.4.4.4	2-Thio-2'-desoxythymidin-5'-triphosphat (S-dTTP).....	94
5.4.4.5	5'-Thio-5'-desoxythymidin-5'-S-triphosphat (5'-S-dTTP).....	96
5.4.5	PCR-Untersuchungen mit modifizierten Nukleotiden.....	99
5.4.6	Untersuchung von Fehleinbauten.....	104
6	Versuche zur Immobilisierung der Taq-Polymerase.....	115
6.1	Klonierung, Expression und Isolierung einer Taq-Polymerase-Variante mit carboxyterminalen Lysinresten.....	119
6.2	Funktionalisierung und Aktivierung der Silizium Chips.....	120
6.3	Immobilisierungsreaktion der Taq-Polymerase.....	121
6.4	Untersuchungen der immobilisierten Taq-Polymerase.....	122
6.4.1	Quantifizierung der immobilisierten Taq-Polymerase.....	122
6.4.2	Untersuchungen zur Aktivität der immobilisierten Taq-Polymerase.....	122
6.4.2.1	PCR mit Enzym-Chips.....	122
6.4.2.2	Primer-Extension-Reaktion mit Enzym-Chips.....	123
7	Diskussion.....	127
8	Zusammenfassung.....	139

9	Summary.....	141
10	Experimenteller Teil.....	143
10.1	Allgemeine Hinweise.....	143
10.1.1	Geräte und Methoden.....	143
10.1.2	Bakterienstämme.....	145
10.1.3	Nährmedien.....	146
10.1.4	Plasmide.....	146
10.1.5	Synthetische Oligonukleotide.....	147
10.2	Mikrobiologische Methoden.....	148
10.2.1	Bakterienkulturen.....	148
10.2.2	Induktion.....	148
10.2.3	Bakterientransformation.....	149
10.2.4	Lagerung von Bakterienkulturen.....	150
10.3	Molekularbiologische Methoden.....	150
10.3.1	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA.....	150
10.3.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (Minilysat).....	150
10.3.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab.....	151
10.3.1.3	Ethanol-fällung.....	152
10.3.2	Enzymatische Reaktionen mit DNA.....	153
10.3.2.1	Restriktionskartierung von Plasmid-DNA.....	153
10.3.2.2	Präparative Restriktionsspaltung.....	154
10.3.2.3	Partielle Restriktionsspaltung.....	154
10.3.2.4	Ligation.....	155
10.3.2.5	Dephosphorylierung.....	155
10.3.2.6	Phosphorylierung.....	156
10.3.2.7	Klenow-Polishing.....	157
10.3.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	157
10.3.4	Isolierung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese.....	158
10.3.5	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	159
10.3.5.1	Vektor-PCR.....	159
10.3.5.2	PCR-Bedingungen für die Aktivitätsuntersuchung der Taq-Polymerasen.....	161
10.3.5.3	Standard-PCR ohne Proteinisolierung.....	163
10.3.5.4	Festphasen-PCR mit Silizium-Chips.....	164
10.3.6	DNA-Sequenzierung nach Sanger.....	165
10.3.7	Quantifizierung synthetischer Oligonukleotide.....	167
10.3.7.1	UV-Messung.....	167
10.3.7.2	Fluoreszenzmessung.....	167
10.4	Proteinchemische Methoden.....	168
10.4.1	Zellaufschluß.....	168
10.4.2	Metallchelate-Affinitätschromatographie.....	168
10.4.3	Ultrafiltration.....	169
10.4.4	Präparation von Proteinproben für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	170
10.4.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	171
10.4.6	Bestimmung der Proteinmengenkonzentration.....	173
10.4.7	Methoden der Enzymcharakterisierung.....	174
10.4.7.1	Bestimmung der spezifischen Aktivität (radioaktiver Polymerase-Assay).....	174
10.4.7.2	Bestimmung der spezifischen Aktivität (nicht-radioaktiver Polymerase-Assay).....	175
10.4.7.3	Primer-Extension-Reaktion.....	177
10.4.7.4	Probenkonditionierung für die MALDI-TOF-MS.....	178
10.4.7.5	Primer-Extension-Reaktion mit immobilisierter Taq-Polymerase.....	179
10.5	Chemische Methoden.....	181

10.5.1	Funktionalisierung der Silizium-Oberfläche.....	181
10.5.2	Aktivierung der aminofunktionalisierten Silizium-Chips mit DITC.....	181
10.5.3	Immobilisierung von Taq-Polymerase an Silizium-Chips.....	182
11	Anhang.....	183
11.1	Gefahrstoffe.....	183
11.2	Entsorgungshinweise.....	184
12	Literaturverzeichnis.....	185

II Abkürzungsverzeichnis

α -S-dNTP	α -Thio-2'-desoxynukleosid-5'-triphosphat
μ l	Mikroliter
2-S-dCTP	2-Thio-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat
2-S-dTTP	2-Thio-2'-desoxythymidin-5'-triphosphat
3-HPA	3-Hydroxypicolinsäure
5'-S-dTTP	5'-Thio-5'-desoxythymidin-5'-S-triphosphat
5-OH-dCTP	5-Hydroxy-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat
A	Adenin bzw. Alanin (Ala)
ABTS	2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin-sulfonat (6)]
ACN	Acetonitril
AMPS	Ammoniumpersulfat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> (2,2-Bicinchoninsäure)
Bio	Biotinyl-
Bis	N,N'-Methylen-bis-acrylamid
bla	β -Lactamasegen
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
BPB	Bromphenolblau
C	Cytosin bzw. Cystein (Cys)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonium]-propansulfonat
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
D	Asparaginsäure (Asp)
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dA*TTP	2'-Desoxyadenosin-7,9-dideaza-7-oxoadenosin-5'-O-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
ddATP	Didesoxyadenosin-5'-triphosphat
ddCTP	Didesoxycytidin-5'-triphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosin-5'-triphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
ddTTP	Didesoxythymidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DITC	1,4-Phenylendiisothiocyanat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DMF	Dimethylformamid
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
E	Glutaminsäure (Glu)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
F	Phenylalanin (Phe)
G	Guanin bzw. Glycin (Gly)
h	Stunde(n)
H	Histidin (His)

His ₆	Hexahistidin-Tail
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
K	Lysin (Lys)
kb	Kilobasen
keV	Kiloelektronenvolt
L	Leucin
lacI	<i>lac</i> -Repressorgen
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
M	Methionin (Met)
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption/ionisation</i>
MHz	Megahertz
min	Minute
<i>MoMLV</i>	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
N	Asparagin (Asn)
NMWG	nominal Molekulargewichtsausschlußgrenze
NTA	<i>nitriiloacetic acid</i> (Nitrilotriessigsäure)
OD	optische Dichte
Omp	<i>outer membrane protein</i>
ori	Replikationsursprung
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PNK	Polynukleotidkinase
ppm	<i>parts per million</i>
ptac	<i>tac</i> -Promotor
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>
Q	Glutamin (Glu)
R	Arginin (Arg)
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RSP	Reverser Sequenzierprimer
RT	Raumtemperatur
S	Serin (Ser)
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin bzw. Threonin (Thr)
t	Zeit
TAPS	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-3-aminopropansulfonsäure
<i>T. aquaticus</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Taq-DNA-Polymerase	DNA-Polymerase I aus <i>T. aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOF	<i>time-of-flight</i> (Flugzeitanalysator)
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i>
USP	Universaler Sequenzierprimer

UTR	untranslatierte Region
V	Valin (Val)
W	Tryptophan (Trp)
w/v	Volumenprozent
w/w	Gewichtsprozent
Y	Tyrosin

1 Einleitung

1.1 Die wachsende Bedeutung der DNA-Analytik

Das Forschungsgebiet der Genforschung hat in den vergangenen zwei Jahrzehnten eine geradezu stürmische Entwicklung erlebt. Die Veröffentlichung eines ersten Arbeitsentwurfes der Sequenz des menschlichen Genoms erfolgte 2001 durch zwei konkurrierende Arbeitsgruppen^{1,2}: der Human Genome Organization (HUGO)^{3,4}, einem aus öffentlichen Forschungsgeldern finanzierten Wissenschaftlerkonsortium, und der US-Firma Celera⁵. Damit war schon rund zwei Jahre vor dem offiziellen Zeitplan von HUGO⁶ etwa 94 % der Sequenz in öffentlichen Datenbanken zugänglich⁷. Die Geschwindigkeit dieser Entwicklung ist sicher in großem Maße den Fortschritten in der Sequenzierungstechnik⁸ zuzuschreiben, die innerhalb dieses Zeitraumes erreicht wurden, wie z.B. die Einführung der Kapillarelektrophorese^{9,10} oder fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide¹¹. Die Kenntnis der Sequenz des menschlichen Genoms ist allerdings nur der Ausgangspunkt für den Beginn einer zweiten Phase, bei der es um die Kartierung aller menschlichen Gene und die Erforschung ihrer Funktion und ihres Zusammenspiels gehen wird. Die Analyse individueller Unterschiede wird es erst ermöglichen, Prädispositionen gegenüber Erkrankungen, Nebenwirkungen von Arzneimitteln und Unverträglichkeiten gegenüber Umweltfaktoren zu erkennen. Diagnostisches und vergleichendes Sequenzieren wird damit, neben dem Forschungsgebiet der *Proteomics*, gegenüber der *de novo*-Sequenzierung in den Vordergrund treten¹².

Insbesondere für die Analyse von *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) innerhalb des menschlichen Genoms werden dringend schnellere, dabei gleichzeitig kostengünstige und exakte Sequenzierungstechniken benötigt. Unter den sogenannten SNPs versteht man Variationen der DNA-Sequenz an einer einzelnen Nukleotidposition¹³. SNPs treten im Abstand von etwa 100 bis 300 Basen entlang des humanen Genoms auf und finden sich in codierenden und nicht-codierenden Regionen. Da 99,9 % der menschlichen DNA-Sequenz konstant ist, verursachen die geringfügigen Änderungen der DNA-Sequenz die Unterschiede in der individuellen Empfänglichkeit für bestimmte Krankheiten und Medikamentenwirkungen und -nebenwirkungen¹⁴. Die Kenntnis über SNPs und ihre Verteilung in Bevölkerungsgruppen haben daher einen hohen Wert für die biomedizinische Forschung in Hinsicht auf Prävention sowie die Entwicklung pharmazeutischer Produkte und medizinischer

Diagnostika. Die genetischen Grundlagen komplexer Krankheiten wie Asthma¹⁵, Diabetes¹⁶, Alzheimer¹⁷ und Krebs¹⁸ sollen durch die Kartierung der SNPs im menschlichen Genom identifiziert werden.

Dies führt zu einer immer weiter fortschreitenden Entwicklung von Sequenzierungstechniken, für die generell modifizierte Nukleotide benötigt werden. Dazu gehören z.B. fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide für die Sanger Sequenzierung¹⁹ und α -S-Desoxynukleotide für die Reverse Sanger Sequenzierung²⁰. Eine neuere Strategie²¹ verwendet chemisch labile Nukleotide, deren spezifische Spaltung nach Inkorporation die Identifizierung der Einbauposition und damit eine Genotypisierung erlaubt. Um derartige Konzepte umsetzen zu können, werden kompatible DNA- und RNA-Polymerasen benötigt, die diese modifizierten Nukleotide als Substrat erkennen und effizient ohne Verlust der Sequenzinformation inkorporieren. Auch hier sind Hochdurchsatztechniken²² notwendig, um bekannte Polymerasen und ihre gentechnischen Modifikationen auf die Fähigkeit, diese Nukleotide einbauen zu können, zu untersuchen.

Bisher werden für derartige Vorhaben Techniken verwendet, die auf der Nutzung der Gelelektrophorese für die Analyse der erzeugten DNA-Fragmente beruhen. Die Produkte der Polymerasereaktion werden mit Hilfe der Gelelektrophorese durch Vergleich der Mobilität mit einem bekannten Standard identifiziert. Diese Methode ist jedoch nur indirekt und notwendigerweise an die Anwesenheit einer Reporterfunktion gebunden, die mit hoher Empfindlichkeit detektierbar sein muß. Als Reporterfunktionen werden in der Regel Radioaktivität in Form der Isotope ³²P und ³⁵S, Fluoreszenz oder Chemilumineszenz verwendet. Die Vorgänge des Markierens der DNA mit der entsprechenden Reporterfunktion, die Elektrophorese und anschließende Detektion sind zeitaufwendig und vor allen Dingen fehlerbehaftet. Insbesondere die Elektrophorese ist anfällig für Fehler, da die Fragmentlänge bzw. das Molekulargewicht nicht direkt mit der Mobilität korrelieren, die hier aber als Meßgröße verwendet wird. Es werden durch eine Vielzahl sequenzspezifischer Effekte, Sekundärstrukturen und anderen Interaktionen mit der Gelmatrix Artefakte hervorgerufen²³.

Eine Alternative zur längenspezifischen Analyse von Nukleinsäurefragmenten bietet die Massenspektrometrie als exakte, molekulargewichtsspezifische Analysemethode. Massenspektrometrische Verfahren wie die MALDI-TOF-Technik können den zeitaufwendigen und ungenauen Schritt der gelelektrophoretischen Trennung der DNA-Fragmente ersetzen und bieten ein hohes Automatisie-

rungspotential zur Erhöhung des Probendurchsatzes. Darüber hinaus ist dieses Verfahren nicht von einer indirekten Reporterfunktion zur Identifizierung der DNA abhängig, da mit dem Molekulargewicht eine definierte physikalische Größe detektiert wird.

1.2 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Durch die Einführung des matrix-unterstützten Laserdesorptionsverfahrens^{24,25,26,27} wurde die massenspektrometrische Analyse von Biomolekülen mit einer Masse bis in den Megadalton-Bereich²⁸ ermöglicht.

Bei dieser Methode wird die zu untersuchende Probe mit einem 100 – 1000fachen Überschuß einer sogenannten Matrix versetzt, mit der sie auf einem Probenträger kokristallisiert. Typische Matrixsubstanzen sind kleine aromatische Säuren, die mit ihrem π -Elektronen-System Licht im Wellenlängenbereich des jeweils verwendeten Lasers absorbieren können²⁹. Bei der Kokristallisation erfolgt vermutlich der Einbau der Probenmoleküle in das Kristallgitter der Matrix, was als Voraussetzung der nachfolgenden Laserdesorption/Ionisierung angesehen wird³⁰. Im Hochvakuum des Massenspektrometers wird die kristalline Oberfläche der Probe einem intensiven Impuls kurzwelliger Laserstrahlung von wenigen Nanosekunden Dauer ausgesetzt. Die Einkopplung der für die Ionen notwendigen Energie erfolgt bei UV-Bestrahlung über resonante Anregung der Matrixmoleküle, etwa in das π Elektronensystem aromatischer Verbindungen. Theoretische Berechnungen lassen vermuten, daß die zunächst in den Matrixmolekülen gespeicherte elektronische Anregungsenergie in extrem kurzer Zeit in das Festkörpergitter relaxiert und dort eine starke Störung und Ausdehnung bewirkt. Es erfolgt dann weit vor Erreichen eines thermischen Gleichgewichts ein Phasenübergang, der explosiv einen Teil der Festkörperoberfläche auflöst. Dabei werden neben Matrixmolekülen auch Probenmoleküle in die Gasphase freigesetzt. Offensichtlich ist dabei die Anregung innerer Freiheitsgrade der beteiligten Moleküle so gering, daß sogar thermisch labile Makromoleküle diesen Prozeß intakt überstehen. MALDI-TOF-MS-Spektren bestehen in der Regel aus Molekülionen, die einfach positiv geladen sind.

Die Matrix spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Ionisation der Probenmoleküle. Photo-

nisierte, radikalische Matrixmoleküle bewirken durch Protonentransfer eine hohe Ausbeute an elektrisch geladenen Probenmolekülen. Für die MALDI verwendet man Impulsfestkörperlaser (Nd-YAG-Laser im Wellenlängenbereich von 355 nm bzw. 260 nm) oder Stickstoff-Gaslaser mit einer Wellenlänge von 337 nm. In dieser Arbeit beschriebene Experimente wurden mit Stickstoff-Gaslaser durchgeführt.

Die geladenen Probenmoleküle werden in einem elektrostatischen Feld von der Oberfläche des Probenträgers in Richtung des Analysators beschleunigt. In der Regel werden in Kombination mit der matrix-unterstützten Laserdesorption Flugzeitmassenspektrometer (TOF = time of flight) eingesetzt³¹, bei denen die Massenbestimmung im Hochvakuum über eine sehr genaue elektronische Messung der Zeit erfolgt, die zwischen dem Start der Ionen in der Quelle bis zum Eintreffen am Detektor vergeht. Eine deutliche Verbesserung der Massenauflösung kann dabei durch die Verwendung eines Ionenreflektors³² zur Verlängerung der Flugstrecke erzielt werden (vgl. Abb. 1-1). Die Kalibrierung erfolgt über Referenzsubstanzen bekannter Masse.

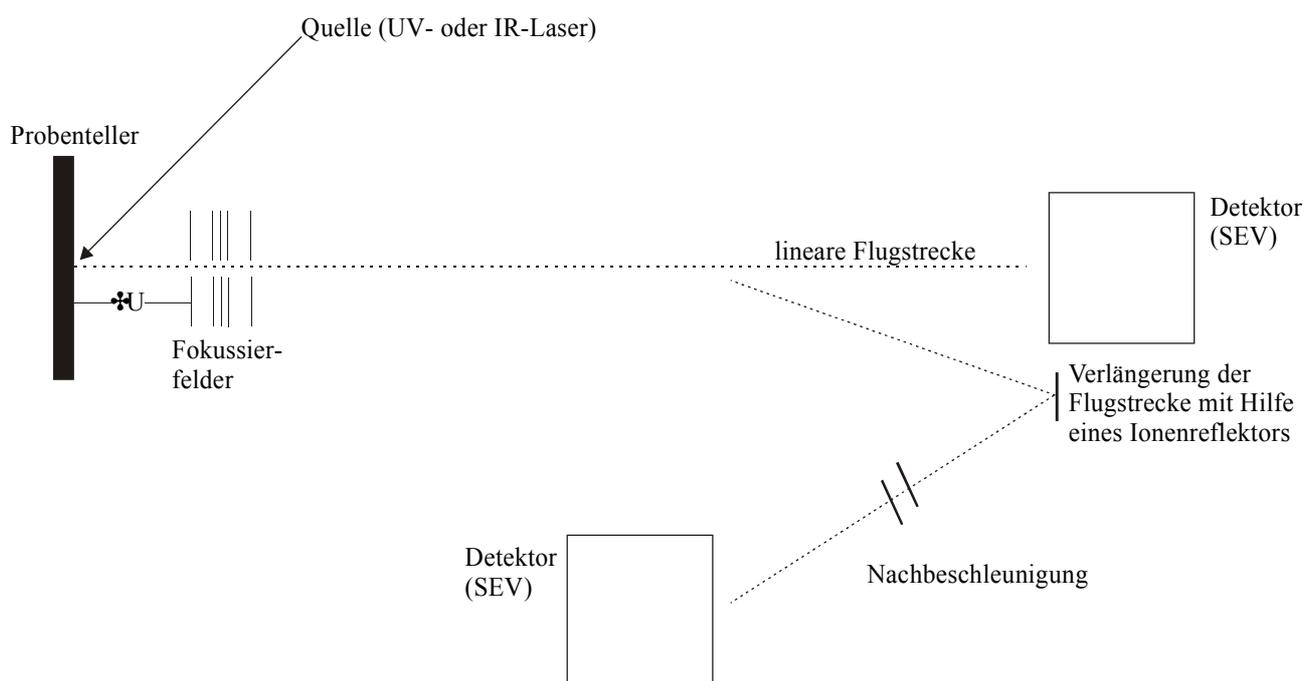


Abb. 1-1: Schematischer Aufbau eines MALDI-TOF-Massenspektrometers

Der Einsatz von 3-Hydroxypicolinsäure^{29,33} als Matrix hat die Anwendung der MALDI-TOF-Massenspektrometrie auch in der Nukleinsäureanalytik ermöglicht. Sie wird heute zur Sequenzierung^{34,35,36,37}, Analyse von SNPs^{21,38,39,40,41,42,43} und Überprüfung von synthetischen Oligonukleotiden

eingesetzt und zeichnet sich vor allem durch folgende Vorteile aus:

- kurze Analysendauer
- geringer Probenbedarf
- hohe Massengenauigkeit und –auflösung
- einfach interpretierbare Massenspektren aufgrund geringer Fragmentierung
- Separation und Detektion in einem Arbeitsgang bei Probengemischen
- hohe Reproduzierbarkeit

Diese Vorteile zusammen mit dem hohen Automatisierungspotential eröffnen in Kombination mit DNA-Chip-Techniken die Möglichkeit zur Hochdurchsatzanalyse von DNA.

1.3 DNA-Polymerase I aus *Thermus aquaticus*

Der Einsatz thermostabiler DNA-Polymerasen hat die Handhabung vieler biotechnologischer Methoden entscheidend verbessert. Insbesondere die DNA-Polymerase I aus *Thermus aquaticus* hat entscheidende Vorteile gebracht und so die starke Entwicklung dieses Forschungsgebietes begünstigt.

So wurde z.B. die Anwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR)⁴⁴ stark vereinfacht: Das hohe Temperaturoptimum von 75 °C bringt grundlegende Vorteile gegenüber Polymerasen aus mesophilen Organismen mit sich, da bei hohen Temperaturen eine größere Spezifität der Oligonukleotidhybridisierung erreicht wird. Basenfalschpaarungen und damit die Menge an unspezifischen Nebenprodukten werden dadurch verringert. Außerdem werden Probleme, die durch die Bildung von Sekundärstrukturen der DNA entstehen, reduziert. Die Stabilität der Polymerase bei 93 – 95 °C erübrigt die Zugabe von frischem Enzym nach jedem Denaturierungsschritt.

Ein weiteres Anwendungsgebiet thermostabiler Polymerasen stellt das sogenannte Cycle Sequencing⁴⁵ dar. Es handelt sich dabei um eine Weiterentwicklung der Sanger Sequenzierung, die den zyklischen Ablauf der PCR und die Sequenzierungsreaktion miteinander kombiniert. Die Durchfüh-

Die Polymerasereaktion ist aus den obigen Gründen auch hier vorteilhaft. Außerdem ermöglicht eine zyklische Wiederholung des Polymerisierungsprozesses eine lineare Amplifikation des Sequenzierproduktes, da dieses in jedem neuen Zyklus erneut als Template zur Verfügung steht. Auf diese Weise können selbst geringe Mengen an Ausgangsmaterial sequenziert werden.

Die Taq-DNA-Polymerase I hat eine Länge von 832 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 94 kDa⁴⁶. Sie ist eine DNA-abhängige DNA-Polymerase, die zur DNA-Synthese neben dem Template und den Nukleotiden auch einen Primer benötigt. Durch die Ergebnisse von Röntgenstrukturanalysen^{47,48} des Enzyms kann sie in die PolI-Polymerasefamilie^{49,50} eingeordnet werden, deren Prototyp die DNA-Polymerase I aus *E. coli* ist. Die Aminosäuresequenz der beiden Enzyme besitzen eine Übereinstimmung von 38 %, auf die Polymerasedomäne beschränkt ergibt sich sogar eine Übereinstimmung von 51 %. Die Röntgenstrukturen zeigen, daß sich auch die Tertiärstrukturen der beiden Polymerasen sehr stark ähneln, hier besonders wieder die Polymerasedomänen. Trotz unterschiedlicher kinetischer Eigenschaften kann davon ausgegangen werden, daß die beiden Polymerasen einen identischen Reaktionsmechanismus aufweisen⁵¹.

Wie auch die DNA-Polymerase I aus *E. coli* verfügt die Taq-DNA-Polymerase über eine aminoterminal 5'-3'-Exonukleasefunktion, die sich über die Aminosäurereste 1- 289 [1-323]^a erstreckt. Diese Domäne enthält mehrere stark konservative Motive, in denen saure Aminosäurereste auftreten. Diese binden wahrscheinlich zwei divalente Metallionen und ermöglichen so die Exonuklease-Reaktion. Durch Mutations-Experimente⁵² wurden mit Arg25 und Arg74 zwei weitere Aminosäurereste identifiziert, die für diese Aktivität notwendig sind. Bei *E. coli* spielt diese Domäne eine Rolle beim Abbau der Primer nach der DNA-Replikation.

Der zwischen 5'-3'-Exonuklease und Polymerase-Domäne liegende Abschnitt mit den Resten 294 – 422 [324 – 514] hat, im Gegensatz zur *E. coli*-DNA-Polymerase I, die 3'-5'-Exonukleaseaktivität verloren. Die stärksten Sequenz- und Strukturabweichungen von der *E. coli*-DNA-Polymerase I sind in dieser Domäne zu finden. Bei der Taq-DNA-Polymerase ist diese Domäne kleiner und kompakter. Die für die 3'-5'-Exonukleaseaktivität wichtigen Aminosäuren fehlen oder sind substituiert. Die potentielle DNA-Bindungstasche ist mit hydrophoben Resten ausgekleidet⁵³. Der Grund für die fehlende 3'-5'-Exonukleaseaktivität liegt wahrscheinlich in der Thermophilie der Taq-DNA-Polymerase.

^a Die homologen Aminosäurereste in der *E. coli*-DNA-Polymerase I sind jeweils in eckigen Klammern angegeben.

rase. Durch den Selektionsdruck einer sehr viel höheren Umgebungstemperatur hat sich die Anzahl der Aminosäuren verringert. Ihre Tertiärstruktur ist kompakter geworden, die inaktive 3'-5'-Exonukleasedomäne liegt deutlich enger an der Polymerasedomäne an. Dadurch weist die Taq-DNA-Polymerase im Vergleich zur *E. coli*-DNA-Polymerase I einen deutlich größeren hydrophoben Kernbereich auf, wie er für thermostabile Proteine typisch ist. Durch die fehlende 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt die Taq-DNA-Polymerase eine geringere Replikationsgenauigkeit und eine höhere Mutationsrate pro eingebautem dNTP ($2 \times 10^{-4} - 8 \times 10^{-6}$)^{54,55} als die *E. coli*-DNA-Polymerase I ($10^{-6} - 10^{-12}$)⁵⁶.

Der Aufbau der carboxyterminalen Polymerasedomäne (Reste 424 – 835 [515 – 928]) ist bei den beiden Enzymen nahezu identisch. Sie ähnelt entfernt einer rechten Hand und kann in drei Subdomänen unterteilt werden (s. Abb. 1-2)^{57,58}. Durch die Lage konservierter Sequenzmotive innerhalb der Domäne können jeweils Rückschlüsse auf deren Bedeutung gezogen werden.

- **Handfläche:** Diese Subdomäne bildet den Boden einer auffälligen Tasche im Protein und enthält das katalytische Zentrum. Die katalytisch aktiven Aminosäurereste sind in den stark konservierten Sequenzmotiven A und C enthalten. Es handelt sich dabei insbesondere um zwei Reste (Asp610, Asp785 [Asp705, Asp882]), die zwei zweiwertige Magnesiumionen in der notwendigen geometrischen Konformation binden, um die Reaktion zu ermöglichen. Sie interagieren mit der α -ständigen Phosphatgruppe des Desoxyribonukleotidtriphosphates. Ein dritter Carboxylatrest (Glu786 [Glu883]) ist ebenfalls an der Bindung der Metallkationen beteiligt. Eine Veränderung dieses Restes hat nicht dieselben Auswirkungen auf die katalytische Aktivität wie eine Mutation der anderen beiden Reste. Außerdem bildet dieser Proteinabschnitt die Bindungstasche für das 3'-Ende des Primers und trägt zur Bindung des Triphosphates bei.
- **Finger:** In dieser Subdomäne ist das Sequenzmotiv B enthalten. Es gibt Hinweise darauf, daß Aminosäurereste aus diesem Bereich sowohl an der Bindung und Ausrichtung des Template-Stranges⁵⁹, als auch an Wechselwirkungen mit dem neu eintretenden Nukleotidsubstrat^{60,61,62,63} beteiligt sind. Die Aminosäurereste des Sequenzmotivs sind auf der O-Helix zu finden. Ihre Bedeutung für die Substratdiskriminierung wurde durch Mutationsexperimente^{64,65} bestätigt. Der Austausch eines Phenylalaninrestes gegen einen Tyrosinrest an Position 677, die innerhalb der O-Helix liegt, bewirkt eine Veränderung der Substratspezifität⁶⁶: Das modifizierte Enzym zeigt

eine größere Affinität für Didesoxyribonukleotide als für die nativen Desoxyribonukleotide. Beim Wildtypenzym beträgt das Verhältnis der Einbauraten dNTP/ddNTP 3000, das modifizierte Enzym zeigt ein Verhältnis von 0,5. Der verbesserte Einbau der Didesoxysubstrate als Terminatoren stellt einen großen Vorteil für den Einsatz des Enzyms bei der Sanger Sequenzierung dar. Taq-DNA-Polymerasen mit dieser Mutation bilden die Basis für den weitverbreiteten Einsatz der Sanger Sequenzierung und haben sie entscheidend vereinfacht und verbessert.

- **Daumen:** Dieser in erster Linie helikale Abschnitt stellt den Kontakt zur kleinen Furche des DNA-Produktes her. Er ist strukturell und sequenziell am wenigsten konserviert. Seine Funktion konnte bisher nur grob identifiziert werden.

Die Funktion der Taq-DNA-Polymerase *in vivo* ist im Gegensatz zu der der *E. coli*-DNA-Polymerase I, die beim Replikationsvorgang an der Synthese der Okazaki-Fragmente und an der Reparatur beschädigter DNA beteiligt ist, nicht bekannt. Es könnte sich in Analogie zu *E. coli* um ein Reparatorenzym handeln, aber auch um das Replikationsenzym von *T. aquaticus*. Ob die 3'-5'-Exonukleaseaktivität vollständig fehlt oder von einem Hilfsprotein übernommen wird, ist bisher ungeklärt.

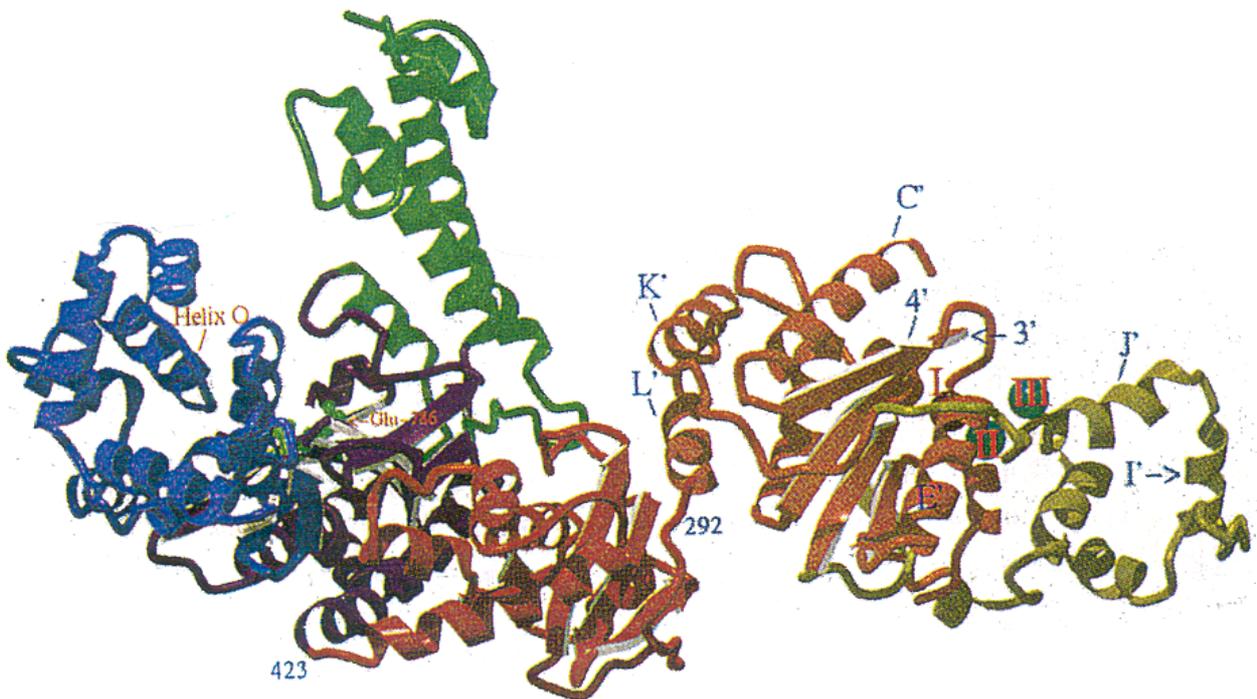


Abb. 1-2: Schematische Darstellung der DNA-Polymerase I aus *T. Aquaticus*. 5'-3'-Exonuklease-Domäne: orange, gelb (das aktive Zentrum ist durch ein rotes Zn²⁺- und zwei blaue Mn²⁺-Ionen markiert); 3'-5'-Exonukleasedomäne: rot; Polymerasedomäne: Daumen: grün; Finger: blau; Handfläche: lila (die drei katalytisch aktiven Aminosäuren Asp610, Asp785 und Glu786 sind dunkelgrün gekennzeichnet)

2 Problemstellung

Die Gründe für die Einführung modifizierter Nukleotide in DNA und RNA sind ausgesprochen vielfältig und beschränken sich nicht nur auf die in der Einleitung angesprochenen Sequenzieretechniken. Ein erweitertes genetisches Alphabet mit funktionalisierten Bausteinen eröffnet die Möglichkeit zur Identifizierung von DNA- und RNA-Molekülen mit neuen katalytischen und Bindungseigenschaften^{67,68,69,70}. Derartig veränderte Nukleinsäuren weisen gegenüber natürlichen Nukleinsäuren eine erhöhte Variabilität auf und können als Liganden, Rezeptoren oder Katalysatoren dienen. In einer neueren Untersuchung konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß durch die Verwendung modifizierter Nukleotide eine verstärkte Stabilität komplementärer Duplex-RNA erreicht werden kann. Bei der Anwendung auf das sogenannte Expression Profiling, einer DNA-Array-Technik mit der die Untersuchung der Expressionsrate vieler Gene einer Zelle gleichzeitig erfolgen kann und die auf Hybridisierung beruht, führt dies zu einer Verbesserung der Signalintensität und einer eindeutigeren Signaldetektion⁷¹. Für die Nukleinsäureanalyse mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie werden ebenfalls modifizierte Nukleotide benötigt, die die Stabilität der DNA während der massenspektrometrischen Analyse erhöhen und so die Massenauflösung verbessern^{72,73}.

Um derartige Konzepte umzusetzen, sind Enzyme erforderlich, mit denen dieses erweiterte genetische Alphabet entsprechend den Anforderungen manipuliert werden kann. Dafür werden insbesondere DNA- und RNA-Polymerasen, die modifizierte Nukleotide mit gleicher Effizienz inkorporieren wie ihre natürlichen Substrate, benötigt. Da Polymerasen evolutionär für die natürlich vorkommenden Nukleotide, sowohl im Template als auch in Form des Triphosphats, optimiert sind, werden modifizierte Nukleotide häufig nur schlecht akzeptiert. Das Aufeinandertreffen von Polymerase und modifiziertem Substrat führt in der Regel zu einem Pausieren des Enzyms an dieser Stelle oder sogar zu einem kompletten Abbruch der Polymerisierungsreaktion. Dies hat nicht nur Konsequenzen für die PCR-Amplifikation, sondern geht häufig auch mit einem Verlust an Sequenzinformation einher. Die Suche nach geeigneten Polymerasevarianten ist bisher nur rein empirisch, meist nach ungezielter Mutagenisierung möglich und gestaltet sich häufig sehr zeitaufwendig.

In der vorliegenden Arbeit sollten daher auf der Basis eines bestehenden Expressionssystems mutagenisierte Taq-Polymerase-Gene kloniert werden. Eine Schlüsselposition nahmen dabei gezielte

Aminosäureaustausche in der O-Helix der Fingersubdomäne des Enzyms ein, die nach den vorliegenden Röntgenstrukturanalysen und Mutagenisierungsstudien direkt an der Substraterkennung beteiligt sind. Nach Expression und Isolierung der modifizierten Taq-Polymerasen sollten die Auswirkungen dieser Mutationen auf den Einbau ausgewählter modifizierter Nukleotide und der natürlichen dNTPs untersucht werden. Um die Untersuchung der erzeugten Mutanten zu beschleunigen, sollten die Vorteile der Analyse mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie auf diese Experimente übertragen werden und die sonst übliche Gelelektrophorese der Reaktionsprodukte ersetzt werden. Dabei sollte auch der Nachweis einer quantitativen Auswertbarkeit der erhaltenen Spektren erfolgen.

Darüber hinaus sollte die Taq-DNA-Polymerase auf der Basis eines bestehenden Systems an eine Siliziumoberfläche kovalent immobilisiert und die erhaltene Oberfläche auf Polymeraseaktivität hin untersucht werden.

3 Klonierung mutagenisierter Taq-Polymerase-Gene

3.1 Expressionssystem

Als Voraussetzung für die Erzeugung von Taq-Polymerase-Varianten sowie deren routinemäßige Untersuchung und Anwendung müssen diese Enzyme in ausreichenden Mengen produziert und isoliert werden können. Die Gewinnung aus *T. aquaticus* ist dafür ungeeignet, da der Expressionsgrad des Enzyms in seinem Ursprungsorganismus lediglich bei 0,01 – 0,02 % des Gesamtproteingehaltes liegt^{74,51} und die Kulturbedingungen, insbesondere das nährstoffarme Medium, ein schnelles Wachstum der Bakterien verhindern⁷⁵. Es wurde daher die Expression im Eubakterium *E. coli* angestrebt.

Als Ausgangspunkt für die Mutagenese des Taq-Polymerase-Gens stand ein Expressionssystem zur Verfügung, das bereits in vorangegangenen Arbeiten konstruiert worden war⁷⁶. Es handelt sich dabei um ein Plasmid auf der Basis des Expressionsvektors pHK236 mit einem Taq-Polymerase-Gen, das am aminoterminal codierenden Ende um 735 Basenpaare verkürzt wurde. Dadurch wird die 5'-3'-Exonukleasedomäne in weiten Teilen deletiert. Es verbleibt ein nur Polymerase-aktives *core*-Fragment, so daß ein Abbau von DNA in PCR und Sequenzierungsreaktionen nicht mehr möglich ist. Zusätzlich ist das Genfragment C-terminal um eine codierende Sequenz für ein Peptid mit 6 Histidinen (His-Tag) verlängert. Auf diese Weise wird eine einfache und schnelle Aufreinigung der Enzymvarianten mittels Metallchelate-Affinitätschromatographie ermöglicht.

Die Expression des rekombinanten Polymerase-Gens steht in der Serie der pTAP7-Expressionsvektoren unter der Kontrolle des *tac*-Promotors⁷⁷, einem Hybridpromotor, der durch Fusion von Sequenzabschnitten des *trp*- und des *lac*-Promotors konstruiert wurde. Darüber hinaus enthält die pTAP7-Serie (vgl. Abb. 3-1) Abschnitte aus dem *ompA*-Gen von *E. coli*, die ebenfalls Einfluß auf die Expression der Polymerase haben: An das His-Tag schließt sich die 3'-untranslatierte Region des *ompA*-Gens an. Mit dem aminoterminal codierenden Ende des Taq-Genfragments wurden die 5'-untranslatierte Region sowie der Proteinstart und die ersten 6 Codons des *ompA*-Leserasters fusioniert. Der Proteinstart mit der *E. coli*-eigenen Signalsequenz ist besser kompatibel mit dem Pro-

teinsyntheseapparat, als die entsprechende *T. aquaticus*-Sequenz und ermöglicht so eine höhere Expressionsrate. Das Membranprotein OmpA ist eines der am stärksten exprimierten Proteine in *E. coli* mit einer Molekülzahl von etwa 10^5 pro Zelle. Dies liegt unter anderem in der ausgeprägten Stabilität der mRNA in der Zelle begründet, für die Sekundärstrukturen in den untranslatierten Regionen der mRNA verantwortlich gemacht werden⁷⁸.

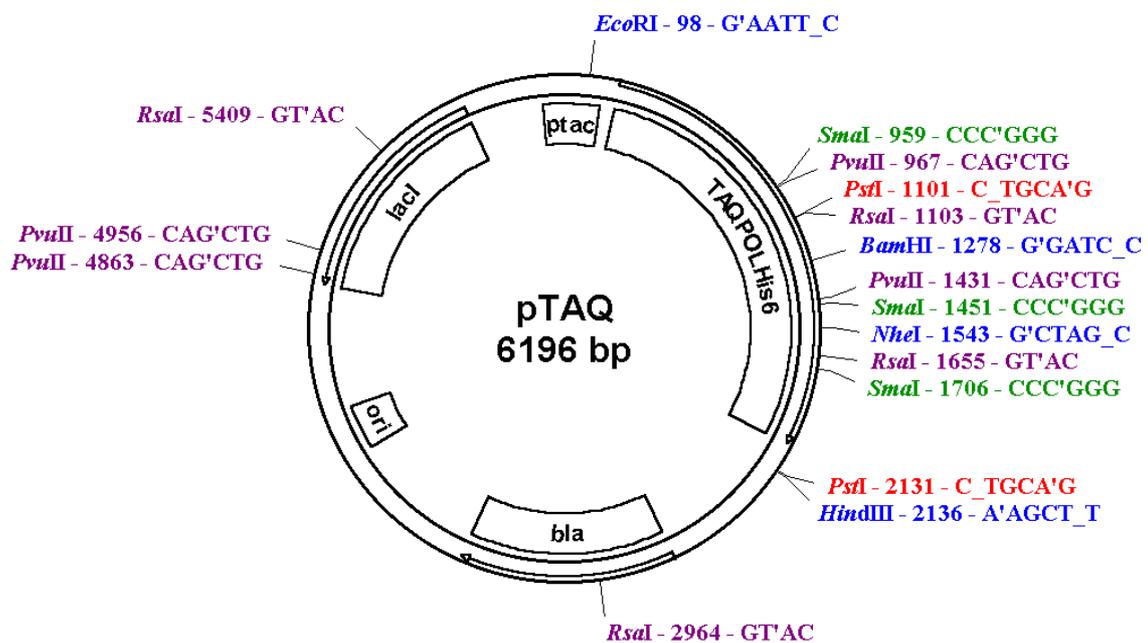


Abb. 3-1: Karte des Expressionsvektors pTAP7
 TAQPOLHis6: Taq-Polymerase-Gen mit His-Tag
 lacI: lac-Repressorgen
 ori: Replikationsursprung
 bla: β -Lactamasegen
 ptac: tac-Promotor

3.2 Konzeption der Punktmutationen

Die Taq-Polymerase lässt sich aufgrund ihrer Aminosäuresequenz und ihrer dreidimensionalen Struktur in die Familie der PolII-Polymerasen einordnen^{49,50}. Insbesondere im Bereich der Polymerasedomäne weist sie eine starke Homologie mit der DNA-Polymerase I aus *E. coli* auf. Für die Vari-

antenplanung wurden daher nicht nur Untersuchungen zu Struktur-Funktionsbeziehungen der Taq-Polymerase genutzt, sondern auch Ergebnisse aus der Untersuchung der *E. coli* DNA- Polymerase I auf das thermostabile Enzym übertragen und miteinbezogen. Neben den bekannten Röntgenstrukturen^{47,48,53,60} dienten bereits veröffentlichte Mutagenesestudien^{57,58,61,79,80,81} der beiden Enzyme als Grundlage für die eingeführten Modifikationen.

Das Ziel der Mutagenese war eine Veränderung der Substratdiskriminierung der Taq-Polymerase. So sollten insbesondere modifizierte, nicht natürlich vorkommende Nukleosidtriphosphate, aber auch natürliche Ribonukleotide, die von der nativen Polymerase nicht akzeptiert werden, in einen wachsenden DNA-Strang eingebaut werden können. *Tabor* und *Richardson* war dies im Fall der Taq-Polymerase schon gelungen⁶⁶. Der Austausch eines Phenylalanins an Position 667 gegen ein Tyrosin bewirkt eine Veränderung der Substratspezifität: Das modifizierte Enzym zeigt eine gesteigerte Affinität für Didesoxyribonukleotide im Vergleich zu Desoxyribonukleotiden. Die Vorarbeiten zu dieser Modifikation waren ausgedehnte Sequenzvergleiche homologer DNA-Polymerasen. Die Aminosäure Tyrosin befindet sich an der homologen Position im aktiven Zentrum der T7-DNA-Polymerase, die Didesoxynukleotide effizient inkorporiert. Diese Eigenschaft konnte auf die so veränderte Taq-Polymerase übertragen werden, mit deren Hilfe das Verfahren der Sanger Sequenzierung erheblich verbessert werden konnte⁴⁵. Der mutagenisierte Aminosäurerest befindet sich in der sogenannten O-Helix im Bereich der *finger*-Subdomäne, deren Bedeutung für die Substratdiskriminierung durch weitere Mutageneseexperimente bestätigt werden konnte^{64,65}.

Im Zeitraum dieser Arbeit wurden zwei ternäre Röntgenstrukturen der Taq-DNA-Polymerase veröffentlicht⁸². Sie zeigen jeweils einen Komplex aus Polymerase, Template-Primer-Duplex und einem ddCTP, die eine Strukturveränderung des katalytisch aktiven Enzym-Komplexes dokumentieren. Auffällig ist dabei die Konformationsänderung der O-Helix von der "offenen" in die "geschlossene" Form. Dabei verändert sich insbesondere die Orientierung der Aminosäuren Phenylalanin in Position 677 bzw. Tyrosin in Position 671 in der O-Helix (*finger*-Subdomäne) relativ zum ddCTP. Die Orientierung der DNA und des ddCTPs selbst dagegen bleibt annähernd gleich (s. Abb. 3-2).

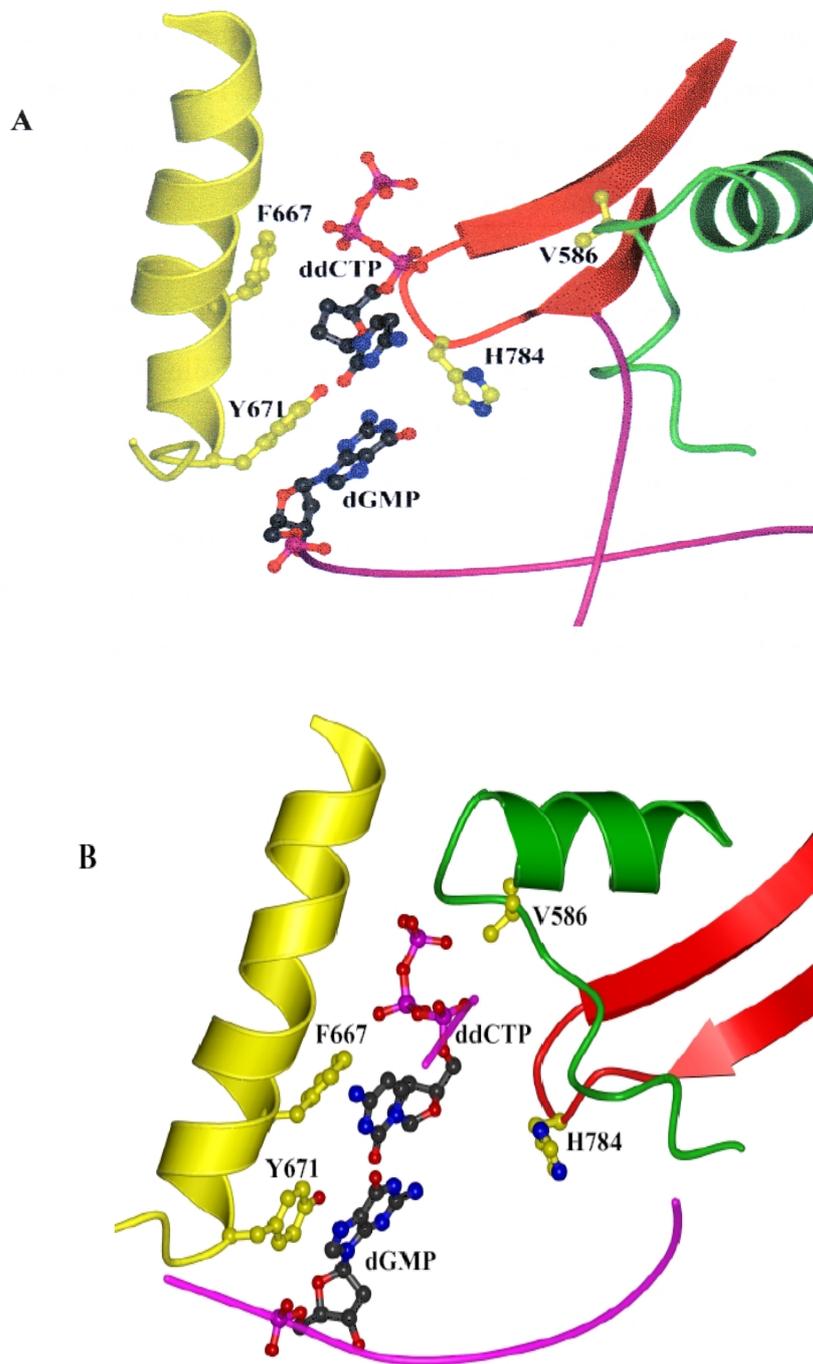


Abb. 3-2: Ternäre Struktur des katalytischen Zentrums der Taq-Polymerase⁸³. Es sind die Aminosäuren Y671, F667 (finger-Subdomäne, α -Helix O, gelb), Val586 (thumb-Subdomäne, α -Helix J und K, grün) und His784 (palm-Subdomäne, β -Strang 12 und 13, rot) eingezeichnet. Das ddCTP und das komplementäre dGMP des Templates sind ebenfalls dargestellt. **A** ist die offene Form (Brookhaven Datenbank Struktur 2KTQ), **B** die geschlossene Form (Brookhaven Datenbank 3KTQ). In Abbildung **B** ist aufgrund der besseren Sichtbarkeit der Substrate der Blickwinkel verändert worden.

In der "offenen" Form der Taq-Polymerase liegt Tyr671 auf dem ersten Basenpaar der Primer-Template-Doppelhelix und nimmt an den *stacking*-Wechselwirkungen der Basenpaare teil. Der Tyrosinrest dient möglicherweise als Positionierhilfe für die DNA, so daß sie in der korrekten Position in das aktive Zentrum gelangt. Außerdem ist sie an der lokalen Ausbildung einer A-Form der DNA beteiligt. In der "geschlossenen" Form wird durch die konformationelle Änderung der Tyrosinrest aus seiner Position gezogen, das hinzukommende ddCTP nimmt dann die Position des Tyrosinringes ein. Dabei befindet sich der Phenylalaninrest an Position 667 in unmittelbarer Nähe zum ddCTP und geht *stacking*-Wechselwirkungen mit der Base ein.

Mutagenesestudien zur DNA- bzw. dNTP-Substrataffinität der *E. coli* DNA-Polymerase I ergaben für die Aminosäure Tyr766[Tyr671] unterschiedliche Ergebnisse^{60,61,62}. Im Fall der T7-RNA-Polymerase konnte durch den Austausch von Tyrosin gegen Phenylalanin in der korrespondierenden Position 639 eindeutig eine Lockerung der Substratspezifität erreicht werden.^{84,85} Das resultierende Enzym ist in der Lage neben Ribonukleotiden auch Desoxyribonukleotide als Substrate effizient einzubauen und hat die Fähigkeit, sowohl DNA als auch RNA als Template zu erkennen. Dadurch ist sowohl eine *de novo*- als auch eine Primer-abhängige Synthese möglich.

Daher wurden die Aminosäurereste Phe667 und Tyr671 für eine gezielte Mutagenese ausgewählt. Phenylalanin an Position 667 wurde gegen Tyrosin ausgetauscht, um den bereits bekannten Einbau von Didesoxynukleotiden zu ermöglichen. Für die Position 671 wurden mehrere Aminosäuren ausgewählt. Durch die Mutation Tyr671Phe wird die Funktion der Wasserstoffbrückenbindung aufgehoben, die räumliche Struktur und die aromatischen Eigenschaften der ersetzten Aminosäure bleiben jedoch erhalten. Die Mutationen Tyr671Thr und Tyr671Ser erhalten die Funktion der Wasserstoffbrückenbildung, die Fähigkeit zum *stacking* geht aber durch den Verlust des aromatischen Charakters verloren. Außerdem wurden zwei weitere Varianten erzeugt, die mit Tryptophan bzw. Histidin an dieser Position den aromatischen Charakter beibehielten. Schließlich sollte noch durch die Einführung von Prolin an dieser Position die Auswirkung einer signifikanten Strukturänderung im aktiven Zentrum untersucht werden. Alle Varianten an Position 671 wurden jeweils als Einzelmutationen und in Kombination mit Phe667Tyr kloniert (vgl. Tab. 3-1).

<i>Bezeichnung des Proteins</i>	<i>Mutation</i>	<i>Bezeichnung des Expressionsplasmides</i>
TAQ	Wildtyp	pTAP7
TAQY	F667Y	pTAP8
TAQF	Y671F	pTAP16
TAQT	Y671T	pTAP15
TAQS	Y671S	pTAP14
TAQW	Y671W	pTAP20
TAQP	Y671P	pTAP21
TAQH	Y671H	pTAP22
TAQYF	F667Y, Y671F	pTAP11
TAQYT	F667Y, Y671T	pTAP10
TAQYS	F667Y, Y671S	pTAP9
TAQYW	F667Y, Y671W	pTAP17
TAQYP	F667Y, Y671P	pTAP18
TAQYH	F667Y, Y671H	pTAP19

Tab. 3-1: Übersicht über die erzeugten Taq-Polymerase-Varianten

3.3 Erzeugung und Klonierung der Punktmutationen

Für die Erzeugung der Punktmutationen wurde zunächst ein Basisvektor kloniert, der den codierenden Sequenzabschnitt für die O-Helix der Taq-Polymerase enthält. Dazu wurde aus dem Expressionsplasmid pTAQ (vgl. Abb. 3-1) mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Hind*III ein 769 bp langes Fragment herausgeschnitten und in den ebenfalls mit *Bam*HI und *Hind*III linearisierten Klonierungsvektor pOM8 (vgl. Kap. 10.4.1) ligiert. Das resultierende Plasmid p8taq diente als Ausgangsvektor für alle erzeugten Polymerasevarianten.

Die Mutationen wurden mit Hilfe von synthetischen Oligonukleotiden durch gezielte Basenfehlpaarungen in der PCR erzeugt. Dazu wurde das Verfahren der Vektor-PCR (vgl. Kap. 10.3.5.3) angewandt. Bei dieser PCR-Variante wird nicht nur ein kurzer Abschnitt des Plasmids amplifiziert, sondern der gesamte Vektor. Die Primer sind so plaziert, daß ihre 5'-Enden direkt nebeneinander liegen (s. Abb. 3-3). Man erhält ein lineares PCR-Produkt, das die komplette Vektorsequenz beinhaltet. Dieses wurde durch Agarose-Gelelektrophorese von möglichen Nebenprodukten gereinigt und nach der Phosphorylierung der 5'-Enden erneut zu einem vollständigen Vektor ligiert.

3 Klonierung mutagenisierter Taq-Polymerase-Gene

Für diese Methode wurde aufgrund der Länge der zu amplifizierenden DNA ein PCR-Programm mit längeren Extensionszeiten von bis zu 20 Minuten verwendet. Da die Mutationsrate in der PCR mit der Länge des PCR-Produkts steigt, wurde für diese Reaktionen das ExpandTM High Fidelity-PCR-System der Firma Roche benutzt. Es enthält eine Enzymmischung aus Taq-Polymerase und *Pwo* DNA-Polymerase, einem ebenfalls thermostabilen Enzym, das im Gegensatz zur Taq-Polymerase über eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität verfügt. Die hohe Prozessivität der Taq-Polymerase wird so durch eine *proofreading* Aktivität ergänzt und die Fehlerrate der PCR herabgesetzt.

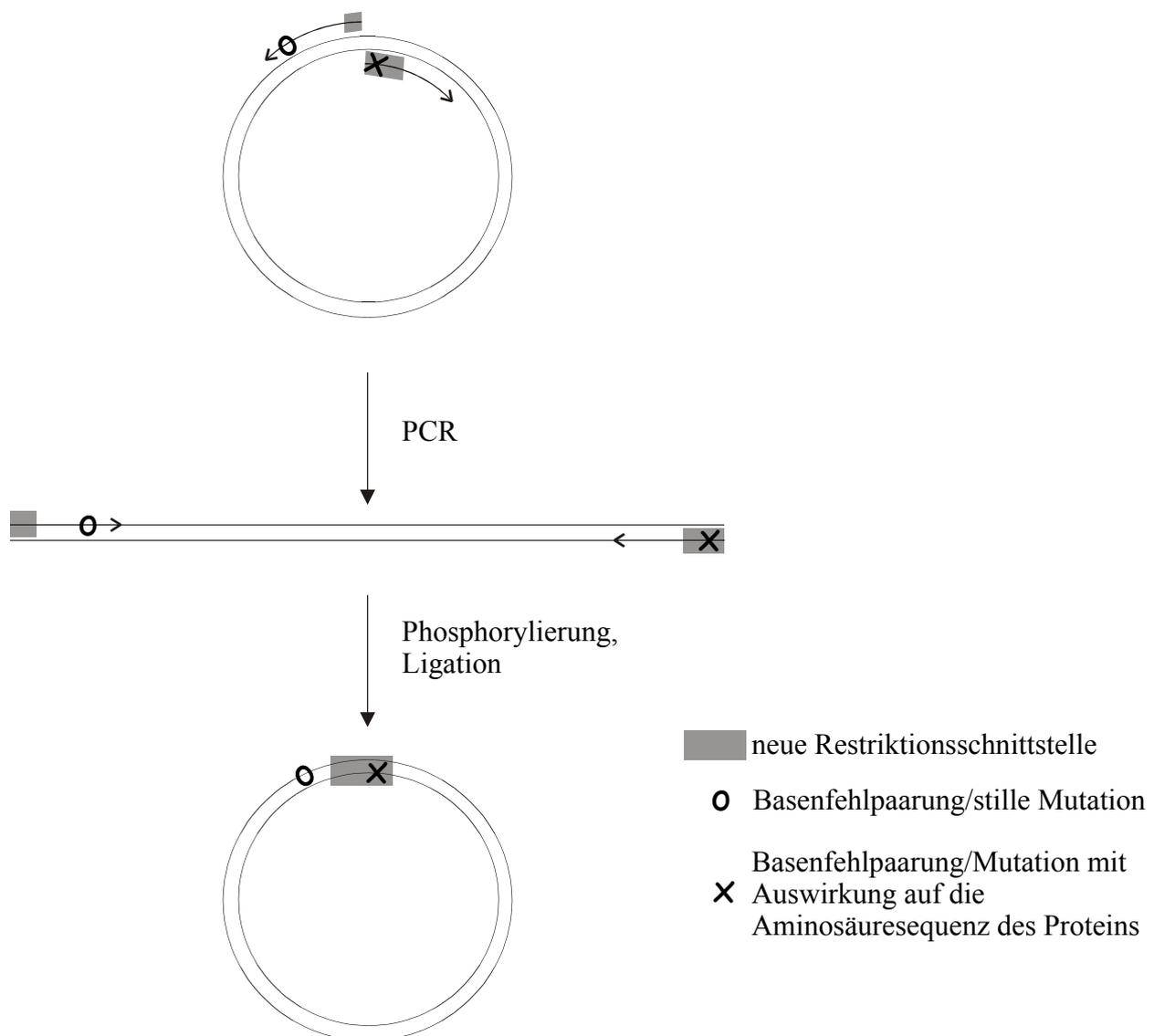


Abb. 3-3: Schematische Darstellung der Vektor-PCR

Die *annealing*-Temperatur des PCR-Programmes wurde für die jeweils verwendeten Primer für jede

Reaktion optimiert, um eine ausreichende Menge an Produkt für die nachfolgenden Klonierungsschritte zu erhalten. Die Primersequenz war dabei so konzipiert, daß neben dem für die Veränderung der Aminosäuresequenz nötigen Basenaustausch zusätzlich eine neue Restriktionsschnittstelle eingeführt wurde (vgl. Kap. 10.5.1). Dies geschah als stille Mutation, die keinen Einfluß auf die Aminosäuresequenz hat. Diese neue Schnittstelle erstreckte sich möglichst über den Bereich der neu eingeführten Mutation. Gelingt dies aus sequenztechnischen Gründen nicht, dann wurde der Restriktionsschnitt so gelegt, daß er nur nach korrekter Ligation des Vektor-PCR-Produktes entstand. Die erhaltenen Klone wurden nach Transformation in *E. coli*-Zellen des Stammes DH10B zunächst durch Restriktionsanalyse überprüft. Die zusätzlich eingeführten Restriktionsschnitte dienten dabei der Selektion korrekt amplifizierter und ligierter Plasmide. Vor der Rückklonierung des mutagenisierten Genabschnitts erfolgte zusätzlich eine Verifizierung der erzeugten Sequenz durch Sanger Sequenzierung.

Zur Rückführung des veränderten DNA-Abschnitts wurden die entsprechenden Plasmide mit *NheI* und *BamHI* geschnitten. Die resultierenden 265 bp Fragmente konnten in den ebenfalls mit *NheI* und *BamHI* linearisierten Expressionsvektor pTAQ ligiert werden. Die resultierenden Expressionsplasmide wurden wieder in *E. coli* Zellen des Typs DH10B transformiert und durch Restriktionskartierung analysiert. Die Expression der rekombinanten Proteine erfolgte in Zellen des Stammes JM83.

4 Expression, Isolierung und Voruntersuchungen

4.1 Proteinexpression

Die Taq-Polymerase-Varianten wurden in *E. coli*-Zellen des Stammes JM83 überexprimiert. Da in allen hergestellten Expressionsvektoren das Polymerase-Gen unter der Kontrolle des *tac*-Promotors⁷⁷ steht, kann die Proteinexpression durch Bindung des *lac*-Repressors an die Operator-Region unterdrückt werden. Die Induktion ist durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) über das Nährmedium möglich. Es verhindert in Analogie zum natürlichen Substrat Lactose die Bindung des *lac*-Repressors an den Promotor, kann aber im Gegensatz zu Lactose nicht enzymatisch abgebaut werden. Das für den *lac*-Repressor codierende Gen *lacI*^a mit einer expressionsverstärkenden Mutation im Promotor befindet sich ebenfalls auf dem Vektor pHK236.

Die präparative Expression der Taq-Polymerase und der Varianten wurde bei 37°C in 2TY-Medium durchgeführt. Die Induktion erfolgte nach einer Wachstumsphase von 2,5 Stunden durch Zugabe von 1 mM IPTG. Nach weiteren 2,5 Stunden Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet.

4.2 Proteinisolierung

Aufgrund der Thermostabilität der Taq-Polymerase konnte ein vereinfachtes Zellaufschlußverfahren verwendet werden, das sich besonders für die parallele Bearbeitung großer Probenzahlen eignet. Das sonst übliche Sonifizieren der Kulturen wurde durch eine Abfolge von Detergenzien- und Wärmebehandlungen ersetzt. Dazu wurden für die Proteinaufreinigung im präparativen Maßstab die Zellen aus 500 ml induzierter Kultur durch Zentrifugation sedimentiert und in 20 ml Triton X-100-haltiger Phosphatpufferlösung aufgenommen (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 2 % (v/v) Triton X-100, pH 8,0). Es folgte eine Abfolge aus Einfrieren bei -20 °C für ca. 1 h, Erhitzen im Wasserbad

auf ca. 70 °C für 15 min, erneutem Einfrieren bei -70 °C für ca. 30 min und abschließendem Erhitzen auf ca. 70 °C für 15 min. Ein großer Teil der *E. coli*-Proteine wurde durch diese Behandlung denaturiert, die dadurch nicht mehr wasserlöslich waren und mittels Zentrifugation (5000 rpm/30 min) abgetrennt werden konnten. Die Polymerase wurde im Überstand angereichert.

Das carboxyterminale His-Tag der rekombinanten Polymerasen ermöglichte die Isolierung aus diesem Rohextrakt durch *Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography* (IMAC)^{86,87}. Das Trennprinzip dieser Methode beruht auf der großen Affinität der Imidazolreste benachbarter Histidinreste zu zweiwertigen Metallkationen wie Nickel(II). Die Metallionen werden über Chelatliganden, die mit einer festen Matrix kovalent verknüpft sind, gebunden. Zur Aufreinigung der Taq-Polymerase-Varianten wurde Ni-NTA-Agarose (Fa. Qiagen) verwendet. An der Agarose-Matrix werden Ni(II)-Ionen durch den vierzähligen Chelatliganden Nitrilotriessigsäure (*nitrilo-tri-acetic acid*, NTA) fixiert, der kovalent an die Agarose-Moleküle gebunden ist^{88,89}. Der Chelatligand besetzt vier der sechs Ligandenbindungsstellen in der Koordinationssphäre des Ni(II)-Ions. Die zwei verbleibenden Koordinationsstellen ermöglichen eine Wechselwirkung mit dem His-Tag (s. Abb. 4-1).

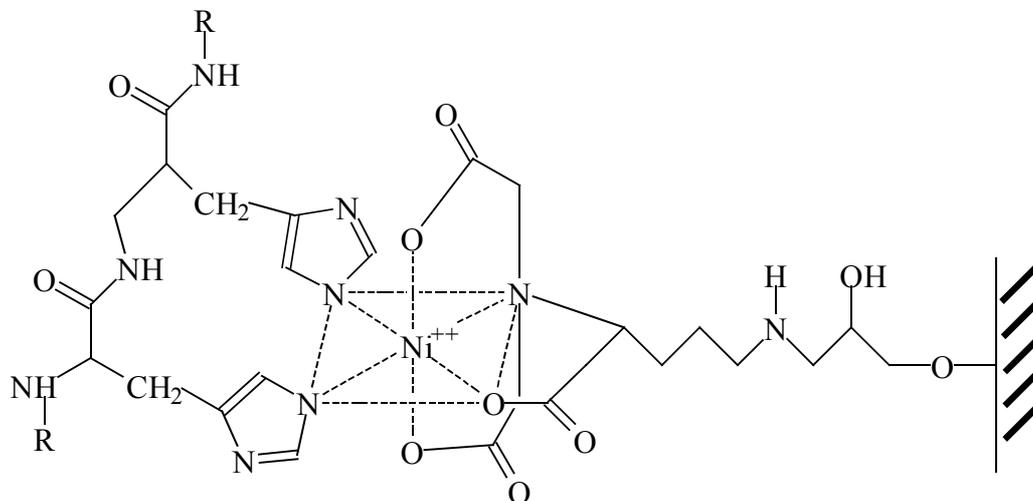


Abb. 4-1: Struktur des Imidazol-Ni-NTA-Agarose Komplexes⁹⁰

Nach einer Behandlung der Matrix mit Nickelchloridlösung wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verfahren. Der Zellrohextrakt wurde mit 2 ml Agarose-Matrix versetzt, dabei komplexieren die Histidinreste das Ni(II)-Ion und werden an der festen Phase zurückgehalten. Die Immobilisierung vereinfacht die nachfolgenden Reinigungsschritte, die sich auf das Waschen mit einer

Pufferlösung (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, pH 6,9) beschränken. Verunreinigungen wurden durch Zentrifugation in einem Filter auf einfache Weise entfernt. Die Elution des Enzyms erfolgte durch imidazolhaltigen Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, 500 mM Imidazol, pH 6,9), da Imidazol eine höhere Affinität zu Nickel(II)-Ionen besitzt und die Histidin-Reste aus der Koordinationssphäre verdrängen kann. Die einzelnen Isolierungsschritte wurden durch SDS-PAGE überprüft (s. Abb. 4-2). Dazu wurde jeweils ein Aliquot entsprechend 50 µl der Ausgangskultur aufgetragen.

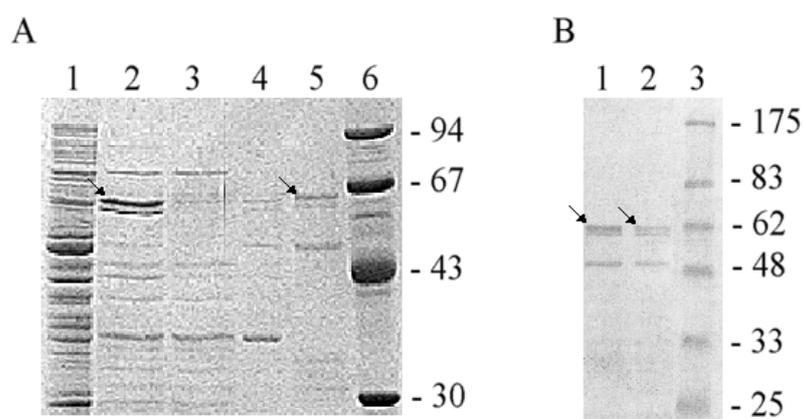


Abb. 4-2: A: SDS-Polyacrylamidgel der Aufreinigungsschritte mit Ni-NTA-Agarose. Es wurden Aliquots der einzelnen Reinigungsstufen aufgetragen. Exemplarisch ist hier die Isolierung am Beispiel des Klons pTAP7 gezeigt. Das rekombinante Protein TAQ ist jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet.

1: denaturierte *E. coli*-Proteine nach der Detergenzien-/Hitzebehandlung

2: Zellrohextrakt nach Zellaufschluß

3: Zellrohextrakt nach Binden der Polymerase

4: Ni-NTA-Agarose nach Elution

5: Eluat

6: Proteingrößenmarker (Angaben in kDa)

B: SDS-Polyacrylamidgel der aufgereinigten Enzyme. Exemplarisch für alle Varianten sind hier die Modifikationen TAQ und TAQY dargestellt.

1: TAQY

2: TAQ

3: Proteingrößenmarker (Angaben in kDa)

Abschließend wurden die isolierten Taq-Polymerasen durch Ultrazentrifugation mit Hilfe von Einweg-Mikrokonzentratoren über Membranen mit einer Ausschlußgröße von 30000 Da gereinigt und konzentriert. Das Protein wurde mit Wasser eluiert, in Aufbewahrungspuffer (20 mM Tris-HCl,

1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 100 mM KCl, 1 % (v/v) Tween 20, pH 8,0) aufgenommen und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Aus 500 ml Ausgangskulturvolumen wurden 400 μl wässrige Polymeraselösung erhalten.

4.3 Quantifizierung der gewonnenen Proteinmengen

Die Proteinmengenbestimmung erfolgte photometrisch mit einem handelsüblichen Proteinassay, der auf dem Prinzip der Proteinmengenbestimmung nach Lowry⁹¹ beruht. Dabei wird die Biuret-Reaktion, bei der Cu(II)-Ionen durch Proteine in alkalischem Medium zu Cu(I)-Ionen reduziert werden, kombiniert mit deren Komplexbildung durch Bicinchoninsäure⁹². Das violette Reaktionsprodukt des Bicinchoninsäure-Assays (*bicinchoninic acid*, BCA)⁹³ ist wasserlöslich und hat ein Absorptionsmaximum bei 562 nm. Die Bildung des farbigen Komplexes mit BCA wird durch die makromolekulare Struktur des Proteins, die Anzahl der Peptidbindungen sowie die Anwesenheit der Aminosäuren Cystein, Tryptophan und Tyrosin verursacht⁹⁴.

Da der BCA-Assay keine Endpunktmethode ist, sondern die Farbentwicklung mit der Zeit fortschreitet, ist es erforderlich, für jede Quantifizierung eine Kalibrierungsgerade mit einer BSA-Verdünnungsreihe parallel zu erstellen. Die Reagenzlösungen wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit einem Aliquot der Enzym- bzw. der BSA-Lösung versetzt und im Wasserbad 30 Minuten bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde von jeder Probe 200 μl in eine Mikrotiterplatte pipettiert und in einem Mikrotiterplatten-Reader gegen eine Blindprobe bei 562 nm gemessen. Aus den Meßwerten der BSA-Verdünnungsreihe wurde eine Kalibrierungsgerade erstellt, mit der die Meßwerte der Proben verglichen wurden. 1 μl der nach Kapitel 4.2 isolierten Enzymlösung enthielt Proteinmengen von 2 – 3 μg . Dies entspricht, bezogen auf das Ausgangskulturvolumen von 250 ml, einer Menge von ca. 2 mg/l Kulturmedium.

Eine starke Schwankung der Proteinausbeute zwischen den verschiedenen Polymerasemodifikationen war nicht festzustellen; es gibt also keinen Zusammenhang zwischen biologischer Aktivität und gewonnener Proteinmenge. Die Veränderungen in der DNA-Sequenz, die durch die Punktmutationen eingeführt wurden, scheinen ebenfalls keinen Einfluß auf die Expressionsrate zu haben. Da die

gewonnenen Proteinmengen zur Charakterisierung ausreichend waren, wurde keine weitere Optimierung der Expression angestrebt.

4.4 Standard-PCR mit den Polymerasevarianten

Für erste Aktivitätsuntersuchungen der Polymerase-Varianten wurde eine standardisierte PCR verwendet, um zu überprüfen, ob die Enzyme noch Polymeraseaktivität besitzen und ob diese Eigenschaft unter den Bedingungen der PCR thermostabil ist. Die Parameter der Reaktion wie die Template-Konzentration, die Temperatur des Hybridisierungsschrittes sowie die Anzahl der Zyklen wurden aus vorangegangenen Versuchen übernommen (vgl. Kap. 10.3.5.2). Sie sind für die Taq-Polymerase der Firma Roche optimiert worden. PCR-Ansätze mit 2,5 U dieses Enzyms dienten als Standard gegenüber den modifizierten Polymerasen. Als Template diente Plasmid-DNA. Die Länge des PCR-Produkts von ca. 700 bp erlaubte eine einfache Detektion des Produkts auf Agarose-Gelen.

In einer vereinfachten Prozedur wurden nicht aufgereinigte Polymerase-Varianten, sondern Zellrohextrakte untersucht, die durch eine Kombination aus Hitze- und Detergenzienbehandlung gewonnen wurden. Die induzierten Zellkulturen wurden zentrifugiert und die Zellen dann in 1 %iger Triton X-100-Lösung bei 95 °C inkubiert. Der Überstand wurde in die Reaktion eingesetzt. Es wurde dabei ein PCR-Basispuffer verwendet, der neben der Puffersubstanz Tris lediglich einen Zusatz von Magnesiumchlorid enthielt (40 mM Tris-HCl, 1 mM MgCl₂, pH 9,0). Dabei zeigte sich, daß drei der erzeugten Polymerase-Modifikationen in der PCR reaktionsfähig waren, nämlich die Varianten TAQY, TAQF und TAQYF (s. Abb. 4-3).

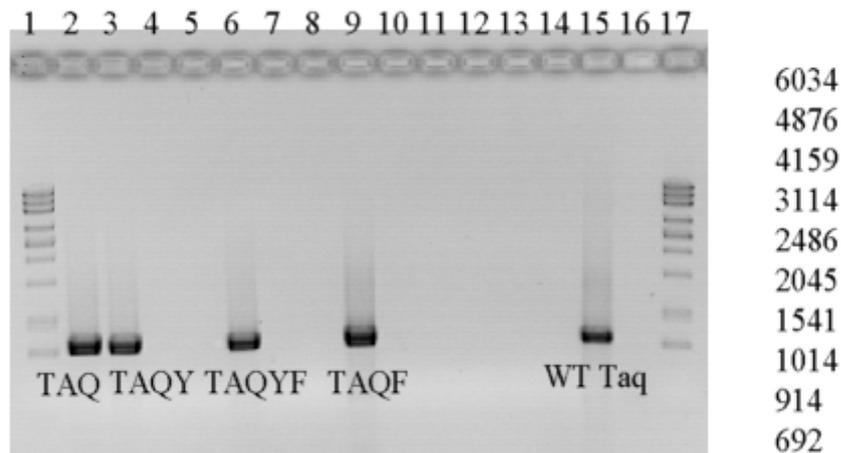


Abb. 4-3: Agarosegel (1 %ig (w/v), invertiert abgebildet) zur Überprüfung der PCR-Aktivität der Polymerasevarianten. Es sind jeweils 10 % des Gesamtreaktionsansatzes aufgetragen.

Bahn 1: DNA-Größenmarker, Bahn 2: **TAQ**, Bahn 3: **TAQY**, Bahn 4: TAQYT, Bahn 5: TAQYS, Bahn 6: **TAQYF**, Bahn 7: TAQT, Bahn 8: TAQS, Bahn 9: **TAQF**, Bahn 10: TAQYW, Bahn 11: TAQYP, Bahn 12: TAQYH, Bahn 13: TAQW, Bahn 14: TAQP, Bahn 15: Positivkontrolle (2,5 U WT Taq Polymerase, Fa Roche), Bahn 16: TAQH, Bahn 17: DNA-Größenmarker

Auch mit erhöhter Rohextraktkonzentration war bei den übrigen Varianten kein PCR-Produkt detektierbar. Die Verwendung der aufgereinigten Enzyme statt des Rohextraktes sowie Variation der Pufferbedingungen, wie z. B. die Verwendung von Kaliumchlorid mit einer Konzentration von bis zu 50 mM oder verschiedenen Detergenzien (Tween 20, Triton X-100, Nonidet P40 und CHAPS in Konzentrationen bis zu 0,2 %), führte nicht zu einer beobachtbaren Aktivität in der PCR (vgl. Tab. 4-2).

Offensichtlich wird nur der sehr konservative Austausch von Tyrosin gegen Phenylalanin an Position 671 ohne Einschränkung der Polymerase-Aktivität toleriert. Der Austausch gegen die anderen Aminosäuren führt dagegen zum Verlust bzw. zumindest zu einer erheblichen Herabsetzung der Polymeraseaktivität.

<i>Name</i>	<i>Mutation</i>	<i>PCR-Aktivität</i>
TAQ	Wildtyp	+
TAQY	F667Y	+
TAQF	Y671F	+
TAQT	Y671T	-
TAQS	Y671S	-
TAQW	Y671W	-
TAQP	Y671P	-
TAQH	Y671H	-
TAQYF	F667Y, Y671F	+
TAQYT	F667Y, Y671T	-
TAQYS	F667Y, Y671S	-
TAQYW	F667Y, Y671W	-
TAQYP	F667Y, Y671P	-
TAQYH	F667Y, Y671H	-

Tab. 4-2: Übersicht über die Aktivität der Polymerase-Varianten in der PCR

4.5 Bestimmung der spezifischen Aktivität

Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde eine Auswahl der erzeugten Polymerase-Varianten herangezogen. Diese beinhaltete zum einen die Enzyme, die in den PCR-Untersuchungen noch eine deutliche Aktivität gezeigt hatten (vgl. Kap. 4.4), und zum anderen mehrere Enzyme, für die in weiterführenden Untersuchungen noch eine gewisse Restaktivität nachgewiesen werden konnte (vgl. Kap. 5).

Beim klassischen Verfahren zur Quantifizierung von Polymeraseaktivität wird die Einbaurate eines radioaktiv markierten Nukleotids in einen DNA-Template-Strang mit Hilfe einer Säurefällung der DNA bestimmt. Dabei hat die Art des verwendeten Templates Einfluß auf die spezifische Aktivität, aber auch auf das Temperaturoptimum des Enzyms^{51,95}. Als Substrat wurde aktivierte Kalbsthymus-DNA eingesetzt. Diese wird mit DNase I vorbehandelt, um längere Einzelstrangabschnitte zu erzeugen, die dann als Ausgangspunkt für die DNA-Neusynthese dienen. Eine zusätzliche Verwendung von Primern ist dadurch überflüssig. Das Temperaturoptimum für dieses Template liegt bei 74 °C⁹⁵.

Als radioaktiv markiertes dNTP-Substrat wurde [α - 32 P]dCTP (1 μ Ci) in einer Mischung mit dCTP zu einer Endkonzentration von insgesamt 100 μ M eingesetzt. Die übrigen Nukleotide dATP, dGTP und dTTP hatten in der Reaktion eine Endkonzentration von je 200 μ M. Die Inkubationszeit betrug 10 min bei 74 °C. Zum Stoppen der Reaktion wurde mit EDTA-Lösung versetzt und auf Eis gekühlt. Für die Säurefällung wurden die Reaktionsansätze aufgeteilt: Zwei Aliquots wurden auf je zwei Glasfaserfilterpapiere pipettiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Ein Satz der Filterpapiere wurde mit 10 %iger Trichloressigsäure zur Fällung der hochmolekularen DNA behandelt, die restlichen Filter dienten zur Erfassung auch der säurelöslichen Bestandteile des Reaktionsansatzes. Beide Filtersätze wurden in Zählröhrchen überführt, mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und in einem Detektiergerät für Radioaktivität (*counter*) mit einer Meßzeit von je 5 min pro Probe vermessen. Als Referenzwert wurde bei jeder Messung die mit 1 U Taq-Polymerase (Fa. Roche) erhaltene immobilisierte Aktivität herangezogen. Für die Variante TAQ, die keine Mutation im aktiven Zentrum trägt, wurde als spezifische Aktivität 22540 U/mg aus vier Messungen ermittelt (s. Tab. 4-3). Dies deckt sich mit dem Literaturwert für die native Taq-Polymerase von 16667 – 22000 U/mg⁹⁵, jedoch nicht mit den Werten für ein vergleichbares verkürztes Konstrukt der Taq-Polymerase⁵¹. Für das sogenannte Stoffel-Fragment, bei dem die ersten 289 Aminosäuren des Aminoterminus deletiert wurden, konnte eine spezifische Aktivität von 369000 U/mg ermittelt werden. Zur Bestimmung dieser Werte wurde allerdings ein anderes Template und eine andere Pufferzusammensetzung als in dieser Arbeit verwendet. Die Meßwerte sind daher nicht direkt miteinander vergleichbar.

Für die modifizierten Taq-Polymerasen konnten mit diesem Verfahren keine reproduzierbaren Werte ermittelt werden. Es wurde daher ein zweites Verfahren hinzugezogen, das ohne den Einsatz von radioaktiv markierten Nukleotiden auskommt. Stattdessen wurde eine optimierte Mischung aus Digoxigenin- und Biotin-markierten Nukleotiden verwendet, die gleichzeitig in die Substrat-DNA eingebaut werden. Die Detektion und Quantifizierung der synthetisierten DNA erfolgte mit Hilfe eines ELISA-artigen Verfahrens (s. Abb. 4-4): Im ersten Schritt wird die Biotin-markierte DNA in Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten gebunden. Im nächsten Schritt wird ein Antikörperkonjugat zugegeben, das an die Digoxigenin-markierten Nukleotide bindet. Das Konjugat enthält das Enzym Peroxidase, das dann über eine Farbreaktion quantifiziert werden kann. Die erhaltenen Meßwerte korrelieren direkt mit der Polymeraseaktivität in den jeweiligen Proben.

4 Expression, Isolierung und Voruntersuchungen

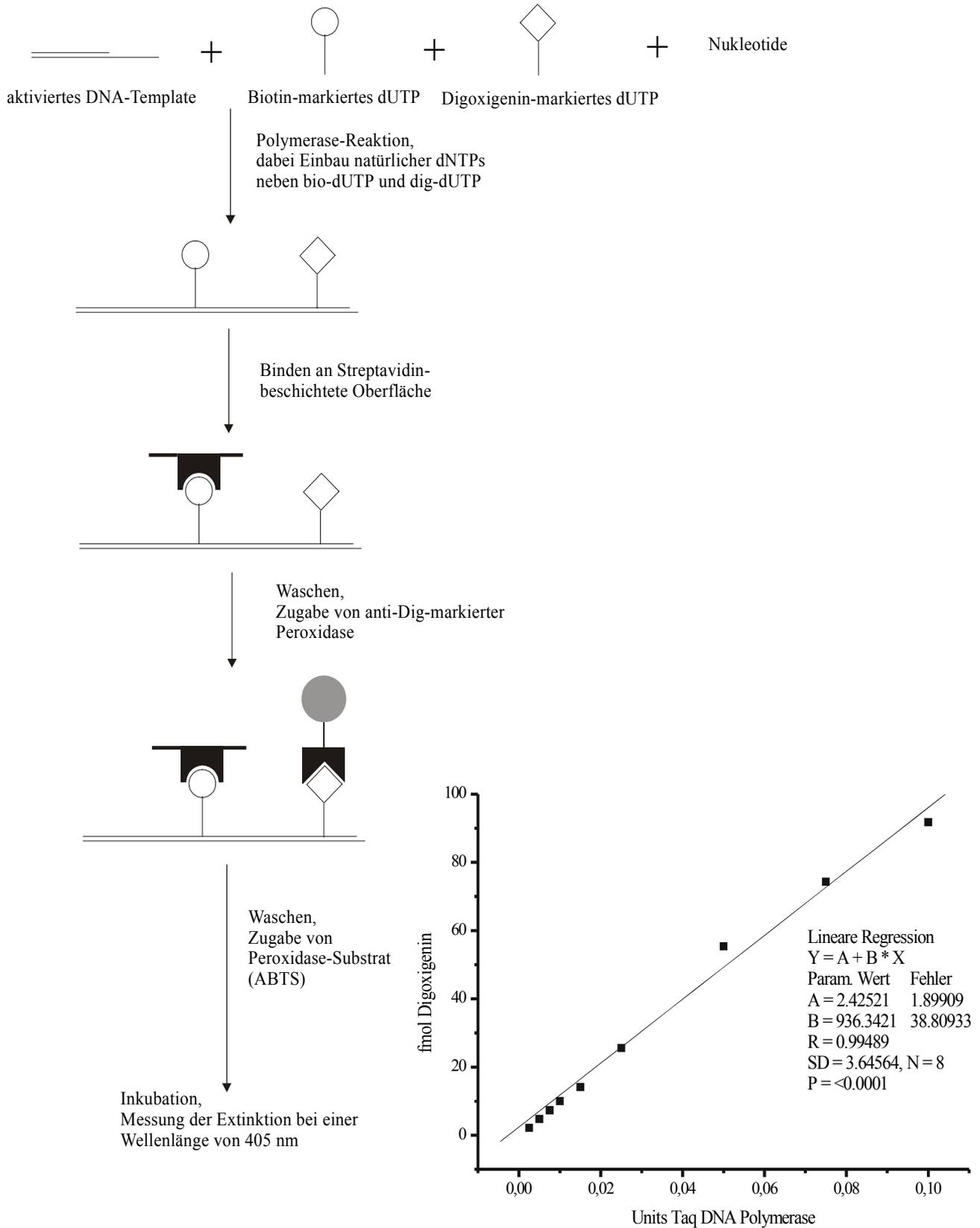


Abb. 4-4: Schematische Darstellung des nicht-radioaktiven Polymerase-Assays und Kalibriergerade für die Taq-DNA-Polymerase.

Mit einem standardisierten Kontrollpeptid, das mit je einem Biotin- und Digoxigenin-Molekül versehen ist, kann über eine Standardreihe die Einbaurate der Digoxigenin-markierten Nukleotide quantifiziert werden. Für diesen Nachweis wurde ein Kit der Firma Roche verwendet, das alle notwendigen Bestandteile enthält. Da die exakte Zusammensetzung der enthaltenen Lösungen nicht veröffentlicht ist, konnten keine Absolutwerte bestimmt werden. Es wurde daher mit gekaufter Taq-Polymerase, ebenfalls von der Firma Roche, bei jeder Messung eine Kalibriergerade erstellt, die als Referenz diente. Die spezifische Aktivität der Taq-Varianten wurde relativ dazu bestimmt.

Mit diesem Nachweis wurde für die Variante TAQ, die keine Mutation trägt, eine spezifische Aktivität von 9488 U/mg bestimmt (s. Tab. 4-3). Dieser Wert ist nur ungefähr halb so hoch, wie der durch den radioaktiven Nachweis ermittelte. Dieses Ergebnis kann so interpretiert werden, daß Digoxigenin-markierte Nukleotide von der Taq-Polymerase mit geringerer Effizienz eingebaut werden als die natürlichen Nukleotide⁹⁶. Dies würde zur Messung einer verringerten Polymeraseaktivität führen, da in diesem Fall aus der Nukleotidmischung bevorzugt die nicht-markierten Nukleotide inkorporiert werden. Vergleichbare Literaturwerte liegen hierzu leider nicht vor. Für den direkten Vergleich der in dieser Arbeit erzeugten Polymerasen, können die erhaltenen Meßwerte jedoch als Näherungswerte herangezogen werden. Die Standardabweichungen beim nicht-radioaktiven Assay liegen für die höheren Meßwerte für TAQ und TAQY bei etwa 4 – 5 % des Mittelwertes und sind damit höher als beim radioaktiven Assay mit 2 %. Bei den niedrigeren Meßwerten der übrigen Varianten sind die Schwankungen größer und liegen bei 8 – 12 % des Mittelwertes. Für TAQH und TAQYH wurden aufgrund der geringen spezifischen Aktivität jeweils nur zwei Bestimmungen durchgeführt und eine Standardabweichung daher nicht ermittelt.

<i>Enzym</i>	<i>spezifische Aktivität (nicht-radioaktives Assay)</i>	<i>Std</i>	<i>spezifische Aktivität (radioaktives Assay)</i>	<i>Std</i>	
TAQ	9488	504 (5)	22540	486 (4)	100 %
TAQY	23357	995 (5)	--		246 %
TAQF	1319	160 (5)	--		14 %
TAQYF	1674	151 (5)	--		18 %
TAQW	100	8 (5)	--		1,1 %
TAQYW	101	10 (5)	--		1,1 %
TAQH	3	(2)	--		0,03 %
TAQYH	3	(2)	--		0,03%

Tab. 4-3: Spezifische Aktivität der Taq-Polymerase und ihrer Varianten. Die Zahl der jeweils durchgeführten Versuche ist in Klammern angegeben.

Die Varianten der Taq-Polymerase weisen bis auf TAQY eine verringerte spezifische Aktivität auf. Die Aktivität von TAQY ist dagegen mehr als doppelt so hoch. Dies liegt möglicherweise darin begründet, daß die Mutation F667Y nicht nur eine höhere Affinität zu Didesoxyribonukleotiden verursacht, sondern auch einen verbesserten Einbau Digoxigenin-markierter Nukleotide ermöglicht. Die niedrigste Aktivität zeigen die beiden Histidin-tragenden Varianten TAQH und TAQYH, die bei einer Restaktivität von weit unter einem Prozent als *knock-out* Varianten bezeichnet werden können. Sowohl bei der Histidin-Variante als auch bei der Tryptophan-Variante hat die zusätzliche Mutation F667Y keinen Einfluß mehr auf die Aktivität, da die aktivitätsstörende Wirkung der ersten Mutation überwiegt. Die beiden Modifikationen TAQF und TAQYF zeigen, obwohl beide in der Lage sind ein PCR-Produkt zu erzeugen, eine deutlich geringere Aktivität als TAQ, die in der O-Helix die Wildtypsequenz trägt. In diesem Fall wird die spezifische Aktivität durch die zusätzliche Mutation F667Y verbessert, was für die obige Annahme des verbesserten Einbaus von Digoxigenin-markierten Nukleotiden sprechen könnte.

5 Hochdurchsatzanalyse modifizierter Taq-Polymerasen mittels MALDI-TOF-MS

Zur Untersuchung der Eigenschaften von DNA-Polymerasen werden herkömmlicherweise Techniken benutzt, die auf der Verwendung von Gelelektrophorese beruhen. Diese Art der Analyse von Polymerase-Reaktionsprodukten ist jedoch sehr zeitaufwendig und erlaubt weder die genaue Charakterisierung der synthetisierten Produkte noch eine Hochdurchsatzanalyse. Daher wurde in dieser Arbeit die Gelelektrophorese durch die MALDI-TOF-Massenspektrometrie ersetzt. Diese Technik erlaubt nicht nur einen höheren Probendurchsatz, sondern es wird mit der Masse eines Moleküls eine intrinsische Eigenschaft bestimmt. Zudem kann die Masse der DNA-Fragmente Aufschluß über eventuelle Fehlabbrüche oder andere Modifikationen geben.

5.1 Primer-Extension-Reaktion

Als Grundlage für die weiterführende Untersuchung der modifizierten Taq-Polymerasen wurde als einfaches Testsystem eine Primer-Extension-Reaktion herangezogen. Ihre Anwendung zur Untersuchung modifizierter Polymerasen, aber auch der Inkorporation modifizierter Nukleotide durch natürlich vorkommende Polymerasen, ist in der Literatur gut dokumentiert^{22,65,97,98}. Dabei wird ein Primer nach Hybridisierung an ein DNA-Template enzymatisch verlängert. Die Massendifferenz zwischen dem verwendeten Primer und den Reaktionsprodukten erlaubt eine massenspektrometrische Untersuchung mittels MALDI-TOF-MS. Als Template fand ein Satz synthetischer 30mere Verwendung, als Primer diente ein am 5'-Ende biotinyliertes 17mer mit einer Masse von 5664 Dalton. Die vier Templates waren dabei so konzipiert, daß jeweils eine andere Base direkt auf die Primerbindungsstelle folgte (s. Abb. 5-1).

Primer (17mer): 5' bio-GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'
bioUSP, Masse 5664

Templates (30mere):

Templ1: 3' CAA CAT TTT GCT GCC GGT CAC ACA TGC GTT 5'

Templ2: 3' CAA CAT TTT GCT GCC GGT CAG ACA TGC GTT 5'

Templ3: 3' CAA CAT TTT GCT GCC GGT CAT ACA TGC GTT 5'

Templ4: 3' CAA CAT TTT GCT GCC GGT CAA CCA TGC GTT 5'

Abb. 5-1: Sequenzen der verwendeten Primer-Template-Systeme

5.2 Reaktionsführung und Probenkonditionierung

Um einen hohen Probendurchsatz zu ermöglichen, wurden die Primer-Extension-Reaktionen in 96erMikrotiterplatten durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten neben Primer (10 – 20 pmol) und Template (1 pmol) die entsprechenden Nukleosidtriphosphate (je 50 µmol). Als Negativkontrollen fungierten Ansätze ohne Template. Die Polymerasevarianten wurden in parallelen Ansätzen in aufgereinigter Form eingesetzt, dabei wurde der Proteingehalt von parallel bearbeiteten Proteinaufreinigungen bestimmt und die Lösungen so verdünnt, daß jeweils die gleiche Proteinmenge pro Reaktion eingesetzt wurde.

Die Reaktionsmischungen wurden unterschiedlichen Reaktionsbedingungen ausgesetzt (vgl. Kap. 10.4.8.4):

- ein PCR-analoges Temperaturprogramm mit 25 Zyklen
- ein PCR-analoges Temperaturprogramm mit 10 Zyklen
- eine einfache Extensionszeit von 10 min

Bei den PCR-analogen Temperaturprogrammen ergibt sich durch den zyklisierten Temperaturverlauf die Möglichkeit der wiederholten Dissoziation und Neubildung des Reaktionskomplexes. Bei der einfachen Extensionszeit ist dies nicht möglich, allerdings ist die Elongationszeit für die Polymerase verlängert. Nach Beendigung der Reaktion konnten dann mit Hilfe von Streptavidin-be-

schichteten magnetischen Beads die Produkte isoliert werden (s. Abb. 5-2). Die Probenkonditionierung erfolgte hierbei in allen Schritten mit Hilfe eines Pipettierautomaten (Multimek, Fa. Beckmann). Dazu wurden die Reaktionsansätze mit je 10 μ l Bead-Suspension versetzt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach magnetischer Abtrennung und einmaligem Waschen der Beads mit einer 10 mM Tris-HCl-Lösung wurde mit 2 M Ammoniaklösung bei 37 °C der Primer-Template-Doppelstrang denaturiert. Das Template wurde mit dem Überstand verworfen und die Beads mit dem biotinylierten Primer erneut gewaschen. Die Abspaltung des Primers erfolgte ebenfalls mit 2 M Ammoniaklösung nach Erhöhung der Temperatur auf 65 °C. Der Überstand mit dem verlängerten Primer wurde in eine neue Mikrotiterplatte überführt und der Ammoniak durch einfaches Verdunsten bei Raumtemperatur entfernt. Durch die Verwendung des Pipettierautomaten konnte die benötigte Zeit für die Probenkonditionierung inklusive der Inkubationszeiten auf 60 min pro Platte beschränkt werden, gegenüber einem Zeitbedarf von ca. 3 h für die manuelle Aufarbeitung. Jeweils 6 nl der Proben wurden mit einer piezoelektrischen Pipette (Nanoplotter, Fa. GeSiM) automatisch auf einen Silizium-Chip mit vorgefertigten Matrix-Spots übertragen und massenspektrometrisch untersucht. Für die qualitative Untersuchung der Reaktionsprodukte wurden die Proben zunächst jeweils einfach auf SpectroChips (Fa. SEQUENOM) mit 96 Matrix-Spots transferiert. Bei den darauffolgenden quantitativen Untersuchungen wurde jede Probe jeweils vierfach auf Chips mit 384 Matrix-Spots übertragen.

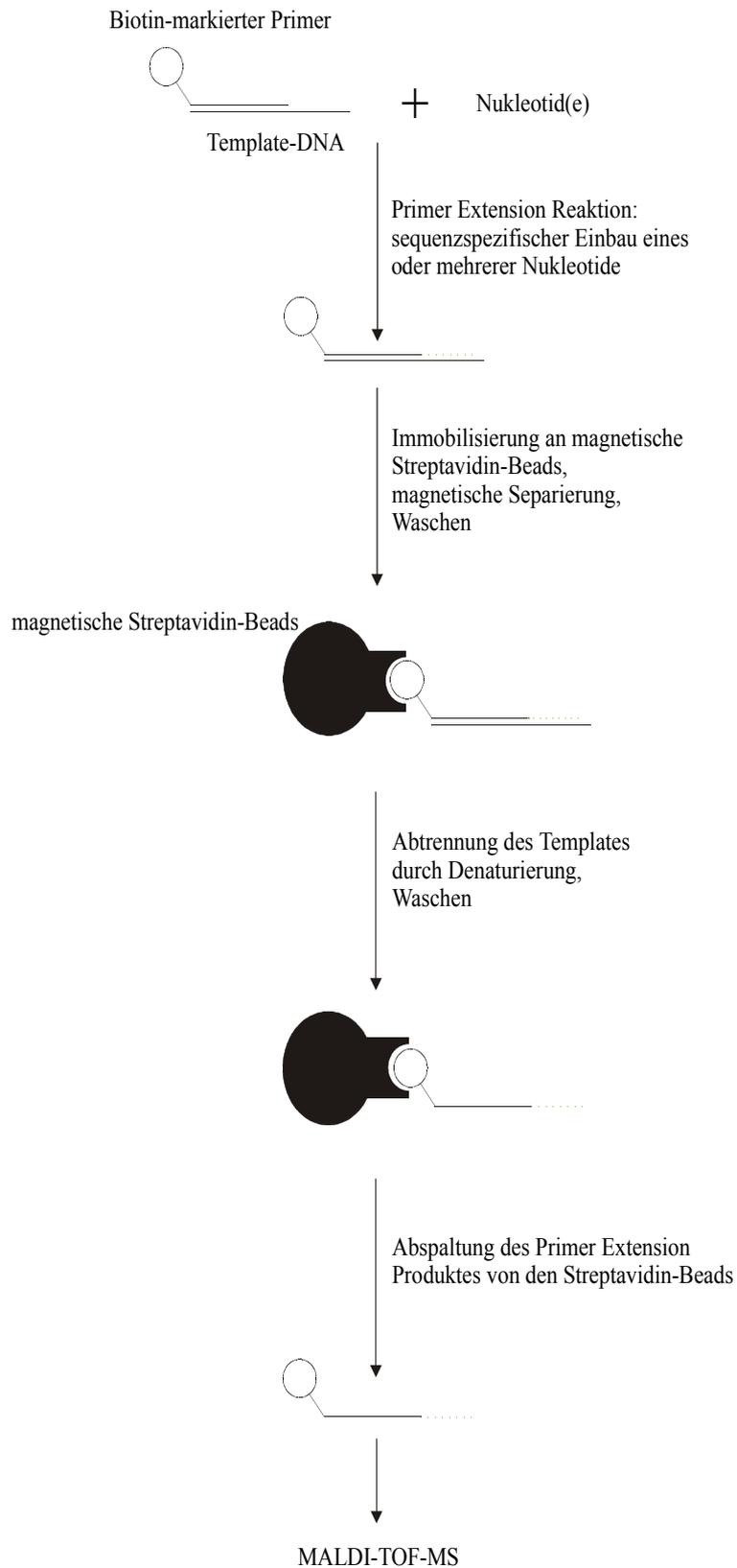


Abb. 5-2: Schematische Darstellung der Primer-Extension-Reaktion und Konditionierung der Proben für die Analyse mit MALDI-TOF-MS

5.3 Quantitative MALDI-TOF-Analyse der Reaktionsprodukte

Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie wird bisher in erster Linie für die qualitative Analyse von Biomolekülen eingesetzt. Dies ist vor allem dadurch begründet, daß die Qualität der Spektren stark vom Kristallisationsverhalten des Analyt-Matrix-Gemisches abhängt. Durch das Auftragen der Proben mit piezoelektrischen Pipetten im Nanolitermaßstab auf vorgefertigte Matrixspots auf Silizium-Chips konnte die Heterogenität der Analytkristalle vermindert und so die Reproduzierbarkeit der Spektren stark verbessert werden⁹⁹. Durch die uniforme Matrix-Analyt-Zusammensetzung auf den Chips wird die quantitative Auswertung der massenspektrometrischen Daten als Berechnung der Fläche unter den Peaks ermöglicht. Im Zuge dieser Arbeit sollte zunächst mit Oligonukleotidmischungen bekannter Zusammensetzung die Möglichkeit der quantitativen Auswertung von MALDI-TOF-Massenspektren nachgewiesen werden, um dann quantitative Aussagen über die Reaktionsprodukte der modifizierten Taq-Polymerasen treffen zu können. Dafür wurden die Proben jeweils vierfach auf Chips mit 384 Matrix-Spots übertragen.

5.3.1 Quantifizierung von Oligonukleotiden

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgt klassischerweise durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm einer wäßrigen Nukleinsäurelösung. Die Konzentration berechnet sich aus der OD bei 260 nm, der Verdünnung und einem für DNA, RNA bzw. Oligonukleotide spezifischen Multiplikationsfaktor.

$$c[\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times V \times F \text{ oder } c[\mu\text{mol/ml}] = (\text{OD}_{260} \times V \times F) / (M_{\text{W}} \times L)^{100}$$

mit c = Konzentration der Ausgangslösung

OD_{260} = optische Dichte bei 260 nm Wellenlänge

V = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikationsfaktor (20 für einzelsträngige Oligonukleotide)

L = Länge in kb, M_{W} = Molekulargewicht

Die Messungen wurden in Quarzküvetten in einem herkömmlichen Photometer (Biochrom LBK, Fa. Pharmacia) durchgeführt und die synthetischen Oligonukleotide aufgrund der Angaben des Herstellers so verdünnt, daß die zu erwartende Absorption in einem Bereich von 0,05 und 1 OD lag. Zur Überprüfung dieser Ergebnisse wurden die Oligonukleotide zusätzlich durch eine fluorometrische Bestimmung quantifiziert. Diese ist wesentlich sensitiver als die photometrische Bestimmung. Zu diesem Zweck wurde der Fluoreszenzfarbstoff OliGreen der Firma Molecular Probes verwendet, der bevorzugt an Einzelstrang-DNA bindet. Durch die Interaktion mit der DNA wird die Fluoreszenz des Farbstoffs verstärkt. Die Quantifizierung erfolgt durch Vergleich mit einer Färbung von Nucleinsäuren bekannter Konzentration. Da die Fluoreszenzverstärkung des Farbstoffs OliGreen sequenzspezifisch ist, wurde als Standard ein Oligonukleotid benutzt, das in seiner Basenzusammensetzung mit den hier verwendeten Oligonukleotiden fast identisch ist (s. Abb. 5-3) und dessen Konzentration photometrisch bestimmt wurde. Die Quantifizierung der übrigen Oligonukleotide erfolgte relativ dazu mit einem Mikrotiterplattenreader (POLARstar Galaxy Fa. BMG). Für die Messungen wurde nach Anweisung des Herstellers verfahren.

5.3.2 Voruntersuchungen zur quantitativen Auswertung von MALDI-Spektren

Um die Produktmischungen der Primer-Extension-Reaktion in den Voruntersuchungen zur Ermittlung des Mengenstandards so gut wie möglich nachzuahmen, wurde ein Satz biotinylierter Primer verwendet, die sich nur in der Länge unterschieden. Als Basissequenz diente der auch für die Extension-Reaktion benutzte bio-USP (vgl. 5-3). Die daneben verwendeten Oligonukleotide trugen am 3'-Ende 1 - 3 Basen zusätzlich.

Für die Messungen mit dem Massenspektrometer wurden verschiedene Mischungen aus jeweils zwei Oligonukleotiden hergestellt. Zur Verringerung von Pipettierfehlern wurden jeweils Volumina von 100 µl angesetzt, von denen jeweils 10 µl pro Probe in Mikrotiterplatten transferiert wurden

bioUSP (17mer): 5' bio-GTA AAA CGA CGG CCA GT 3'
Masse 5664

bioUSP+G (18mer): 5' bio-GTA AAA CGA CGG CCA GTG 3'
Masse 5993

bioUSP+GT (19mer): 5' bio-GTA AAA CGA CGG CCA GTG T 3'
Masse 6297

bioUSP+GTG (20mer): 5' bio-GTA AAA CGA CGG CCA GTG TG 3'
Masse 6626

Abb. 5-3: Sequenzen und Massen der verwendeten Oligonukleotide

Die Übertragung auf einen 384er-Matrix-Chip erfolgte vierfach je Probe und wurde ebenso automatisiert durchgeführt wie die anschließende Messung mit dem Massenspektrometer. Zur Auswertung der erhaltenen Spektren diente das Programm SpectorTyperRT der Fa. SEQUENOM, das eine semi-quantitative Auswertung zweier Peaks innerhalb eines Spektrums als Relation der Flächen unter den Peaks ermöglicht. Für jede Probe wurden die Ergebnisse aus vier Messungen gemittelt. Beispielhaft sind vier Spektren einer Probe in Abbildung 5-4 dargestellt. Auffällig ist dort das Verhältnis der Signalintensitäten im vierten Spektrum, die nicht mit den übrigen drei Spektren übereinstimmen. Für die Quantifizierung ist jedoch die Fläche unter den Peaks entscheidend, bei der neben der Intensität auch die Breite der Peakbasis und die ermittelte Intensität des Rauschens eine Rolle spielt.

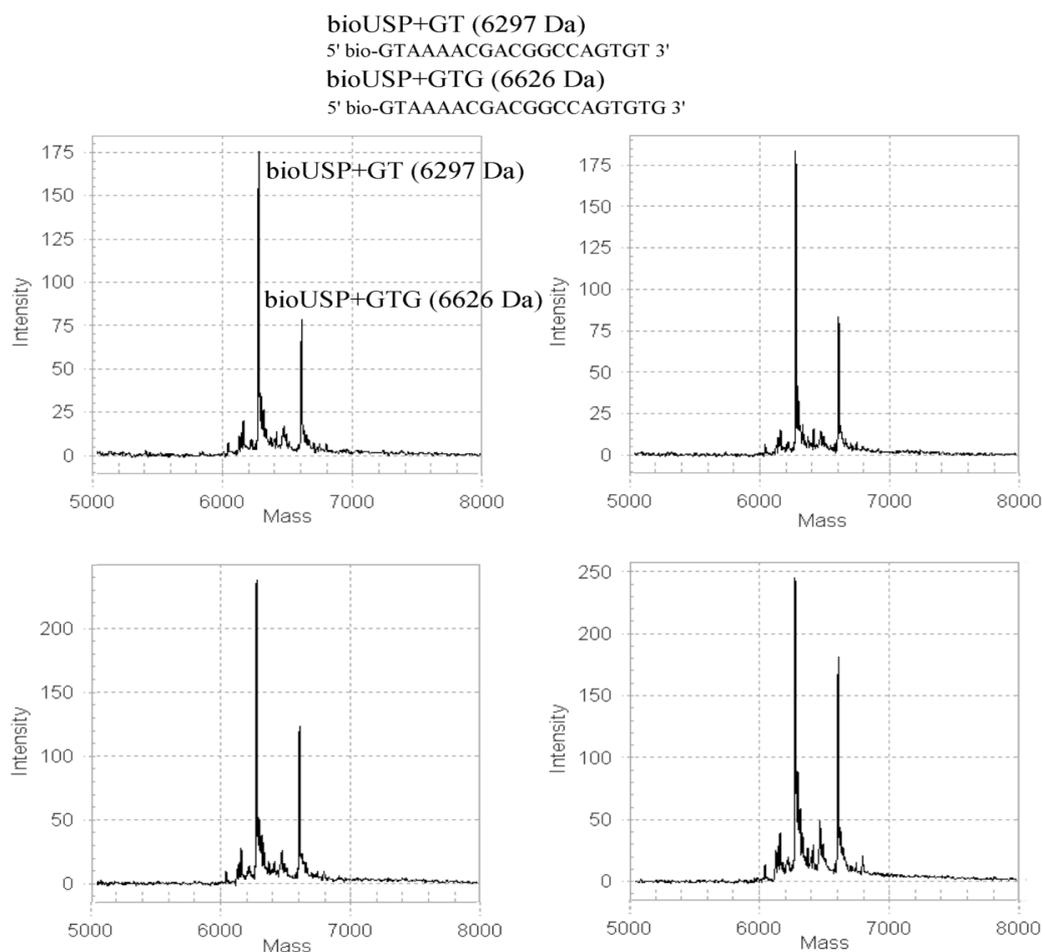
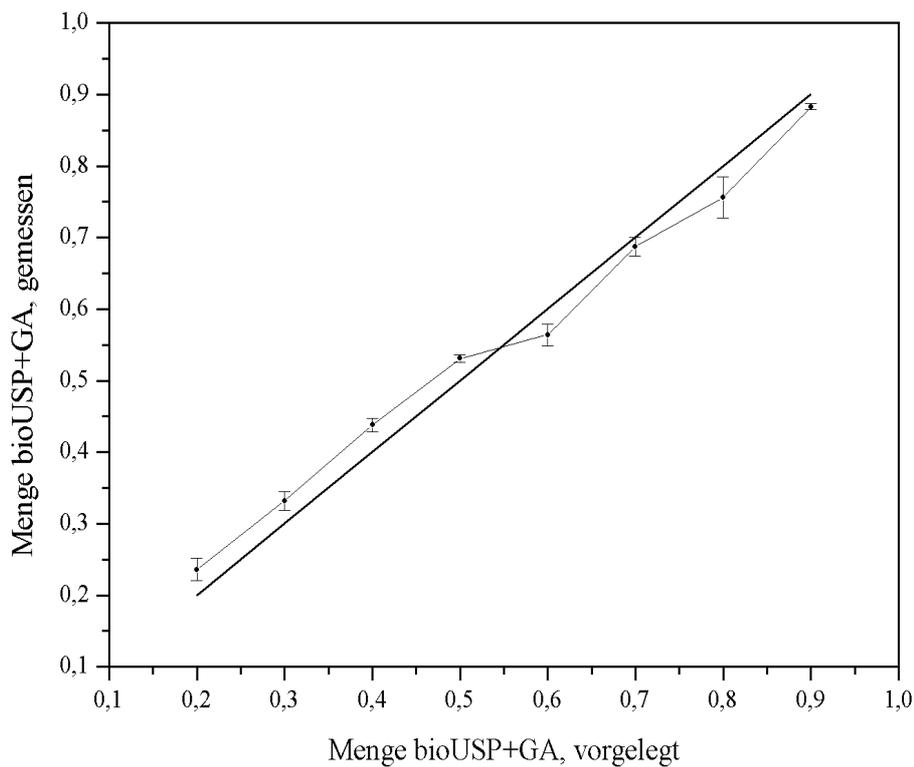


Abb. 5-4: Spektren einer Oligonukleotid-Mischung aus *bioUSP+GT* (6297 Da) und *bioUSP+GTG* (6626 Da) im Verhältnis 70 % zu 30 %. Das gemessene Verhältnis beträgt 68,7 % zu 31,3 % mit einer Standardabweichung von 1,3 %.

Die Auswertung der Meßergebnisse ergab eine gute Reproduzierbarkeit der Spektren gleicher Proben. Die Standardabweichung der gemittelten Werte lag bei maximal 3 % innerhalb eines Mengenverhältnisses von 90 – 10 %. Werte oberhalb und unterhalb dieses Bereiches waren nicht ausreichend reproduzierbar. Beim Vergleich der gemessenen mit den theoretischen Werten ergab sich eine gute Übereinstimmung mit einer Abweichung von maximal 5 %. Diese Genauigkeit war ausreichend für eine vergleichende Analyse der Polymerasen. Beispielhaft ist dies in Abbildung 5-5 für ein Primerpaar dargestellt. Für das Kreuzen der theoretischen durch die gemessenen Linie in diesem Fall bieten sich zwei mögliche Erklärungen an: Der Kreuzungspunkt bzw. zuvor die Abweichung von der Parallelen zeigt das Ende der linearen Proportionalität, also eine Sättigung. Die Kurve müßte sich dann asymptotisch einem maximalen Wert nähern. Alternativ dazu könnte oberhalb

einer bestimmten Konzentration eine Interaktion der beiden Primermoleküle, z. B. in Form von Hybridisierung, erfolgen, was sich als leicht verringerte Desorbierbarkeit der „Dimere“ zeigen könnte. Dies müßte sich graphisch zunächst durch ein Abflachen der Kurve beim Einsetzen der „Hybridisierung“ zeigen, dem dann aber mit steigender Menge der „Dimere“ ein erneuter Anstieg und ein paralleler Verlauf unterhalb der theoretischen Kurve folgen sollte.



Primermenge, vorgelegt		Primermenge, gemessen		
<i>bioUSP+GA</i>	<i>bioUSP+GAG</i>	<i>bioUSP+GA</i>	<i>bioUSP+GAG</i>	<i>STD bioUSP+GA</i>
0,900	0,100	0,883	0,117	0,004
0,800	0,200	0,756	0,244	0,029
0,700	0,300	0,687	0,313	0,013
0,600	0,400	0,564	0,436	0,015
0,500	0,500	0,531	0,469	0,005
0,400	0,600	0,438	0,563	0,009
0,300	0,700	0,332	0,668	0,013
0,200	0,800	0,236	0,764	0,016

Abb. 5-5: Graphische Auswertung der Meßergebnisse am Beispiel einer Oligonukleotid-Mischungsreihe. Die Tabelle zeigt die theoretischen Zusammensetzungen der einzelnen Lösungen im Vergleich zu den Meßergebnissen. Für die Meßergebnisse ist zusätzlich die Standardabweichung angegeben. Alle Angaben in %.

5.4 Untersuchungsergebnisse mit verschiedenen Nukleotiden

Die Auswertungssoftware SpectroTyper RT ist so konzipiert, daß innerhalb eines Spektrums das Verhältnis zweier Peaks zueinander bestimmt werden kann. Da in den Spektren der Reaktionsprodukte der Taq-Polymerasemutanten z. T. mehr als zwei Peaks auftraten, wurde in diesen Spektren ein Referenzpeak ausgewählt und die übrigen Peaks in mehreren Auswerteschritten relativ dazu bestimmt. Anschließend wurden die Relationen aller Peaks zueinander berechnet. Bei der Wahl des Referenzpeaks wurde darauf geachtet, daß sich das Verhältnis dieses Peaks zu allen anderen im Bereich von 90 – 10 % bewegte, um Ungenauigkeiten außerhalb dieses Bereiches auszuschließen.

5.4.1 Desoxyribonukleotide

Die Polymerase-Mutanten wurden zuerst auf ihre Reaktionsfähigkeit mit dem natürlichen Substrat hin untersucht. Für diese Reaktionen wurde als Template Templ1 (s. Abb. 5-1) verwendet. Die Ansätze waren dabei so konzipiert, daß die Nukleotidanzahl sukzessive erhöht wurde: Der erste Ansatz enthielt nur das Nukleotid, um das der Primer zuerst Template-spezifisch verlängert werden konnte; der nächste Ansatz zusätzlich das zweite Nukleotid usw. bis zum vierten Ansatz, der alle Nukleotide enthielt, um eine vollständige Primer-Extension-Reaktion zu erlauben. Diese Reaktionsansätze wurden jeweils allen drei beschriebenen Temperaturprogrammen unterworfen. Zunächst wurden rein qualitative Versuchsreihen durchgeführt, um einen Überblick über die Eigenschaften der Polymerasevarianten zu gewinnen. Aufgrund der Ergebnisse wurde eine Vorauswahl der für die quantitative Analyse in Frage kommenden Mutanten getroffen.

Die Enzyme TAQP und TAQYP zeigten wie auch schon in den Untersuchungen durch PCR keine Polymeraseaktivität in der Primer-Extension-Reaktion. In den Massenspektren konnte auch nach der längeren Reaktionszeit mit 25 PCR-Zyklen ausschließlich unverlängerter Primer detektiert werden. Bei diesen beiden Polymerasevarianten ist das Tyrosin an Position 671 durch Prolin ersetzt worden. Es liegt nahe, daß diese Aminosäure mit ihrer sperrigen Konformation die Anordnung der Aminosäurereste des aktiven Zentrums empfindlich stört und auf diese Weise das Enzym komplett inakti-

viert.

Eine zweite Gruppe bilden die Varianten TAQS, TAQYS, TAQT und TAQYT. In Produktmischungen dieser Enzyme ist nach der längeren Reaktionszeit sowohl der unverlängerte Primer als auch der um ein Nukleotid verlängerte Primer detektierbar. Darüber hinaus verlängerte Reaktionsprodukte konnten nicht nachgewiesen werden (s. Abb. 5-6).

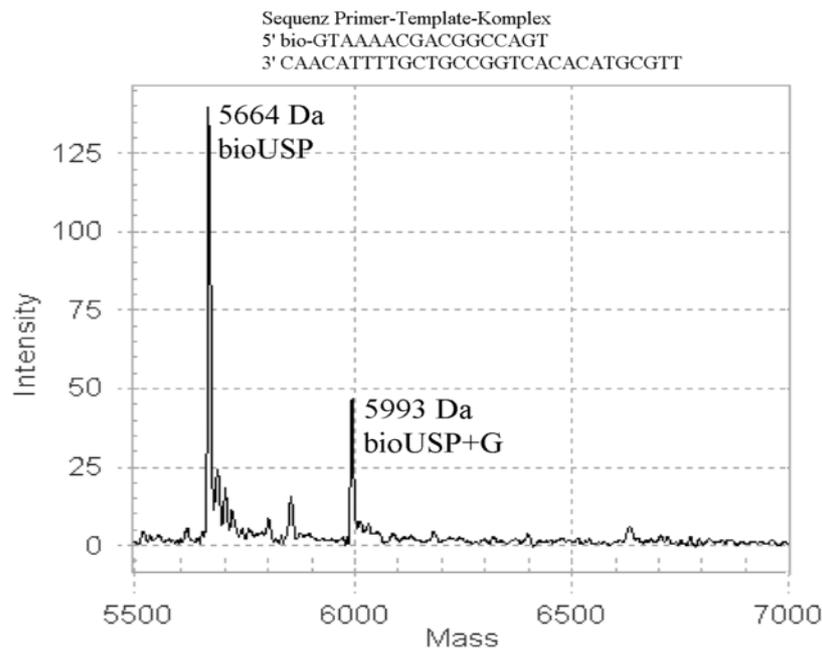


Abb. 5-6: MALDI-TOF-Massenspektrum der Primer-Extension-Reaktion mit allen vier dNTPs für das Enzym TAQS

Bei diesen Polymerasevarianten wurde Tyrosin an Position 671 durch Serin bzw. Threonin ersetzt. Die Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden blieb erhalten, während die aromatischen Anteile des ursprünglichen Aminosäurerestes fehlten. Laut Röntgenstruktur nimmt der Tyrosinrest der Wildtyppolymerase an den *stacking*-Wechselwirkungen mit der Primer-Template-Duplex teil und wirkt möglicherweise als Positionierhilfe für die DNA. Für derartige Wechselwirkungen ist der aromatische Charakter des Tyrosins essentiell. Serin und Threonin können diese Funktion offensichtlich nicht erfüllen. Der Abbruch der Reaktion nach Einbau eines Nukleotides deutet allerdings daraufhin, daß die zu katalysierende Reaktion grundsätzlich noch möglich ist, die Effizienz des Enzyms allerdings stark herabgesetzt wurde. Möglicherweise findet bei der Komplexbildung aus Enzym, Template, Primer und Nukleotid nicht mehr in jedem Fall eine korrekte Positionierung der DNA-Duplex statt, so daß die gebildeten Enzym-Substrat-Komplexe zum großen Teil ohne erfolgte

Reaktion wieder auseinanderfallen.

Außer TAQYH waren die Mutanten in der Lage, den Primer Template-spezifisch und vollständig um 10 Nukleotide zu verlängern. Sie wurden daher quantitativ untersucht. Da TAQH in diese Gruppe gehörte, wurde TAQYH als verwandte Variation trotzdem hinzugenommen.

Bei Zugabe eines Nukleotides konnten alle diese Polymerasen den Primer korrekt verlängern. Allerdings ist auffällig, daß bei allen Enzymen, außer bei der schon erwähnten Variante TAQYH, eine weitere unspezifische Verlängerung um bis zu drei Nukleotide stattfand. Dabei wird nach dem ersten, Template-spezifischen Einbau eines Nukleotids der Primer über eine G:A-Fehlpaarung verlängert. Der darauffolgende Einbau eines weiteren dGTPs erfolgt dagegen wieder sequenzspezifisch (vgl. Abb. 5-1). Bei TAQ und TAQY tritt dieser unspezifische Einbau bereits nach einer Reaktionszeit von 10 min auf, in der 12 % bzw. 7 % des Primers um drei Nukleotide verlängert wurden (vgl. Tab. 5-1, Abb 5-7). Dabei ist im Fall von TAQ das korrekte Reaktionsprodukt nicht das Hauptprodukt, sondern mit ca. 53 % der um zwei Nukleotide verlängerte Primer. Bei längeren Reaktionszeiten sinkt der Anteil des richtigen Reaktionsprodukts immer weiter ab. Bei TAQ ist nach 25 PCR-Zyklen kein korrekt verlängerter Primer mehr detektierbar, der um drei Nukleotide verlängerte Primer ist mit ca. 62 % das Hauptprodukt der Reaktion.

Bei TAQF und TAQYF ist diese Tendenz in geringerem Maße erkennbar. Das korrekte Reaktionsprodukt ist auch nach 10 PCR-Zyklen mit ca. 65 % in beiden Fällen das Hauptprodukt. Der dreifache Einbau von dGTP tritt erst nach 10 PCR-Zyklen auf. Insgesamt zeigen diese beiden Polymerasevarianten große Übereinstimmung und liegen nahe bei den Werten für die Wildtyppolymerase. TAQW, TAQYW und TAQH verlängern den Primer innerhalb von 10 min Reaktionszeit zu 100 % ohne die Bildung von Nebenprodukten (vgl. Abb 5-8). Erst nach längerer Reaktionszeit treten bis zu ca. 29 % unspezifischer Nukleotideinbau bei TAQW auf. Bei TAQH und TAQYW sind es bis zu 19 % respektive 12 %.

5 Hochdurchsatzanalyse modifizierter Taq-Polymerasen mittels MALDI-TOF-MS

		<i>bioUSP</i>	<i>bioUSP+G</i>	<i>bioUSP+GG</i>	<i>bioUSP+GGG</i>
TAQ	10 min	--	34,78±0,93	53,08±0,93	12,14±0,74
	10 Zyklen	--	7,21±0,98	61,40±0,98	31,39±1,33
	25 Zyklen	--	--	38,35±0,94	61,65±0,94
TAQY	10 min	--	59,72±0,86	33,34±0,86	6,94±0,89
	10 Zyklen	--	36,46±0,69	52,30±0,69	11,24±1,28
	25 Zyklen	--	4,97±1,30	53,17±1,30	41,91±1,94
TAQF	10 min	--	77,01±2,54	22,99±2,54	--
	10 Zyklen	--	64,39±3,88	32,33±3,88	3,28±1,16
	25 Zyklen	--	40,54±0,73	52,02±0,73	7,43±1,73
TAQYF	10 min	--	81,47±3,85	18,53±3,85	--
	10 Zyklen	--	65,38±2,76	31,12±2,76	3,50±1,36
	25 Zyklen	--	35,17±0,87	54,94±0,87	9,89±3,02
TAQW	10 min	--	100	--	--
	10 Zyklen	--	79,78±0,70	20,22±0,70	--
	25 Zyklen	--	71,36±2,34	28,64±2,34	--
TAQYW	10 min	--	100	--	--
	10 Zyklen	--	90,29±0,55	9,71±0,55	--
	25 Zyklen	--	88,01±1,14	11,99±1,14	--
TAQH	10 min	--	100	--	--
	10 Zyklen	--	90,78±0,71	9,22±0,71	--
	25 Zyklen	--	81,14±0,67	18,86±0,67	--
TAQYH	10 min	--	100	--	--
	10 Zyklen	--	100	--	--
	25 Zyklen	--	100	--	--
Taq Pol (WT)	10 min	--	85,98±2,40	14,03±2,40	--
	10 Zyklen	--	74,57±0,84	22,85±0,84	2,57±0,40
	25 Zyklen	--	50,32±0,88	42,15±0,88	7,53±0,84

Tab. 5-1: Quantitative Auswertung der Primer-Extension-Reaktion in Anwesenheit eines Nukleotides. Die Anteile der einzelnen Produkte sind in % angegeben.

5 Hochdurchsatzanalyse modifizierter Taq-Polymerasen mittels MALDI-TOF-MS

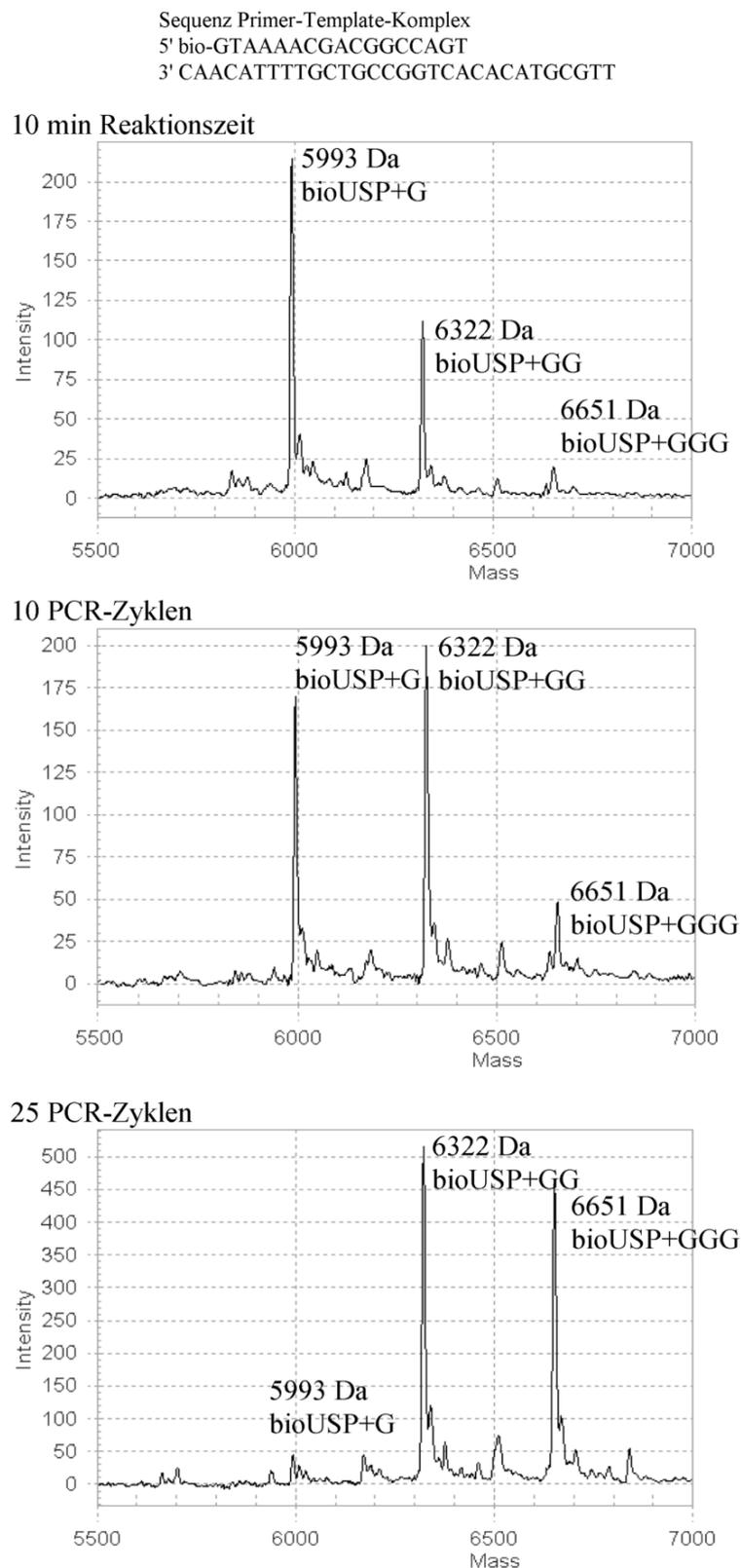


Abb. 5-7: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQY in Anwesenheit von dGTP. Massen der auftretenden Peaks: bioUSP+G = 5993 Da; bioUSP+GG = 6322; bioUSP+GGG = 6651

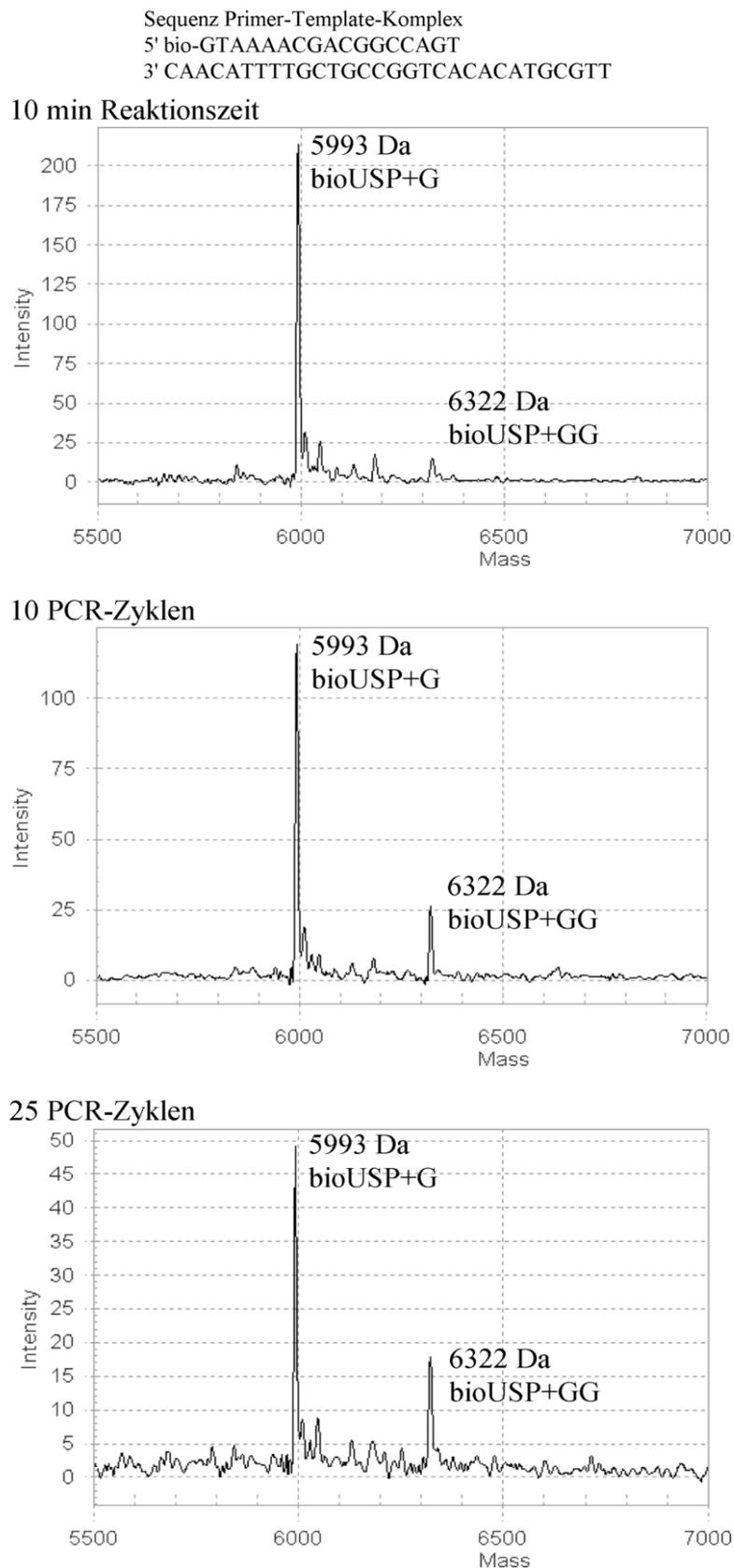


Abb. 5-8: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQW in Anwesenheit von dGTP. Massen der auftretenden Peaks: bioUSP+G = 5993 Da; bioUSP+GG = 6322

Die Fehlpaarung in der Template-Produkt-Duplex zwischen G und A ist ein sogenannter Transversion Mismatch. Bei der Paarung dieser beiden Basen ist eine Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen A(N7) und G(N1) sowie A(N6) und G(O6) erforderlich. Bei der nachfolgenden Reaktion mit einem weiteren dGTP erfolgt dann wieder eine Template-abhängige Inkorporation. Ein weiterer Fehleinbau G:A wird von den Polymerasen nicht mehr toleriert: Um vier G-Nukleotide verlängerte Primeranteile konnten nicht detektiert werden.

Auch bei gleichzeitiger Zugabe von dGTP und dTTP lassen sich in vielen Fällen falsch verlängerte Reaktionsprodukte detektieren. Erwartet wird ein Produkt, daß um vier Nukleotide mit der Sequenz GTGT erweitert ist. Die Ergebnisse zeigen, daß die Aminosäure an Position 671 in diesen Experimenten das Verhalten der Polymerasen bestimmt. Die zusätzliche Mutation F667Y hat auf die Ergebnisse dieser Versuchsreihe offensichtlich keinen Einfluß ausgeübt.

Nach einer Reaktionszeit von 10 min wurde der Primer von den Polymerasen TAQ und TAQY (vgl. Abb. 5-9) zusätzlich zu den korrekt eingebauten Nukleotiden um ein weiteres Nukleotid verlängert. Das richtige Produkt ist in den Spektren nicht mehr erkennbar. Für die zusätzliche Inkorporation werden sowohl dGTP als auch dTTP benutzt. Das Verhältnis des Fehleinbaus von G zu T liegt bei ca. 75 % zu 25 % für TAQ und ca. 60 % zu 40 % bei TAQY (vgl. Tab. 5-2). Die Länge der Reaktionszeit hat auf dieses Verhältnis keinen Einfluß. Der zusätzliche Einbau von G führt zu einer G:T-Fehlpaarung in der Produktduplex. Dabei handelt es sich um einen Transition-Mismatch. Die Paarung von Guanosin und Thymidin erfordert kaum eine Änderung der Base-Stacking-Energie und bringt nur eine geringe Störung der Helix-Konformation mit sich. Sie wird deshalb gegenüber der Fehlpaarung T:T offenbar bevorzugt. Dabei ist dieser Vorzug bei TAQ etwas stärker ausgeprägt als bei TAQY.

	bioUSP	+G	+GTG	+GTGT	+GTGTG	+GTGTT	GTGTG : GTGTT
	10 min	--	--	--	72,77±1,88	27,23±1,88	
TAQ	10 Zyklen	--	--	--	75,78±1,97	24,23±1,97	
	25 Zyklen	--	--	--	74,41±1,06	25,60±1,06	
	10 min	--	--	--	55,89±2,89	44,11±2,89	
TAQY	10 Zyklen	--	--	--	57,49±2,93	42,51±2,93	
	25 Zyklen	--	--	--	59,24±1,11	40,76±1,11	
	10 min	--	--	24,42±1,41	51,76±1,34	26,07±0,46	66,46 : 33,54 ±0,93
TAQF	10 Zyklen	--	--	9,94±1,27	60,99±1,27	29,08±1,52	68,08 : 31,93 ±1,40
	25 Zyklen	--	--	--	66,11±3,11	33,90±3,11	
	10 min	--	--	19,98±1,09	53,95±1,09	23,81±1,41	68,08 : 31,94 ±2,13
TAQYF	10 Zyklen	--	--	10,21±1,52	60,72±1,57	29,07±1,87	67,74 : 32,21 ±0,89
	25 Zyklen	--	--	--	66,91±1,49	33,09±1,49	
	10 min	24,26±1,99	11,36±2,37	--	45,81±1,99	11,67±1,73	6,70±4,22
Taq Pol (WT)	10 Zyklen	9,01±2,66	3,74±1,40	--	26,94±2,66	34,59±1,86	25,69±2,54
	25 Zyklen	--	--	--	6,15±1,19	58,47±0,94	35,39±1,19
	10 min	--	5,03±0,50	--	7,60±2,20	--	87,37±0,50
TAQW	10 Zyklen	--	--	--	--	100	
	25 Zyklen	--	--	--	--	100	
	10 min	--	8,63±3,41	--	6,11±3,41	55,89±2,89	85,26±0,33
TAQYW	10 Zyklen	--	--	--	--	100	
	25 Zyklen	--	--	--	--	100	
	10 min	--	72,10±0,74	8,25±0,74	19,65±0,71	--	--
TAQH	10 Zyklen	--	34,86±0,95	5,26±0,95	46,87±0,59	10,48±1,83	2,55±2,08
	25 Zyklen	--	7,73±2,55	--	32,48±2,55	51,72±0,88	8,08±1,89
	10 min	28,23±1,33	59,56±0,97	5,38±1,53	6,83±1,33	--	--
TAQYH	10 Zyklen	10,73±1,97	41,03±2,31	13,54±3,20	34,70±1,97	--	--

Tab. 5-2: Quantitative Auswertung der Primer-Extension-Reaktion in Anwesenheit der zwei Nukleotide G und T. Die korrekte Verlängerungssequenz ist GTGT. Die Anteile der einzelnen Produkte sind in % angegeben.

5 Hochdurchsatzanalyse modifizierter Taq-Polymerasen mittels MALDI-TOF-MS

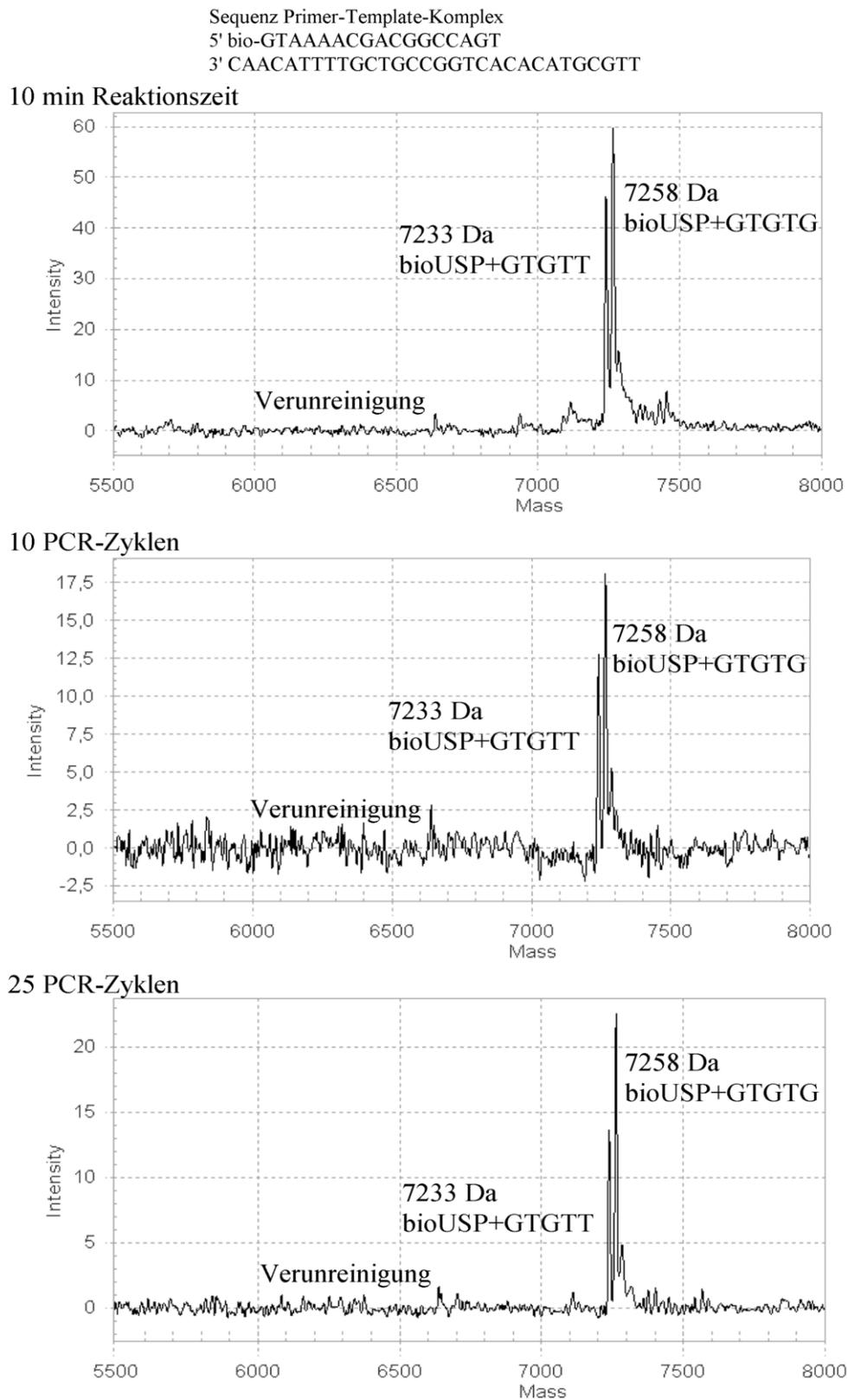
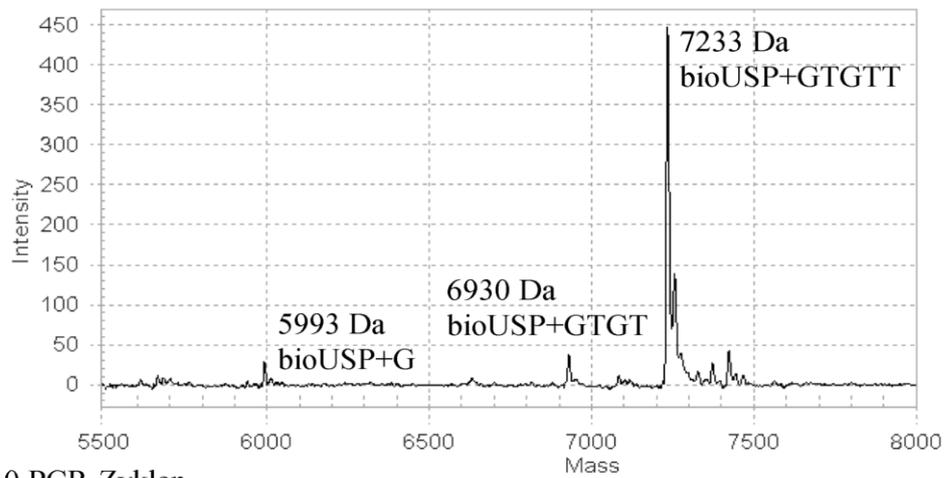


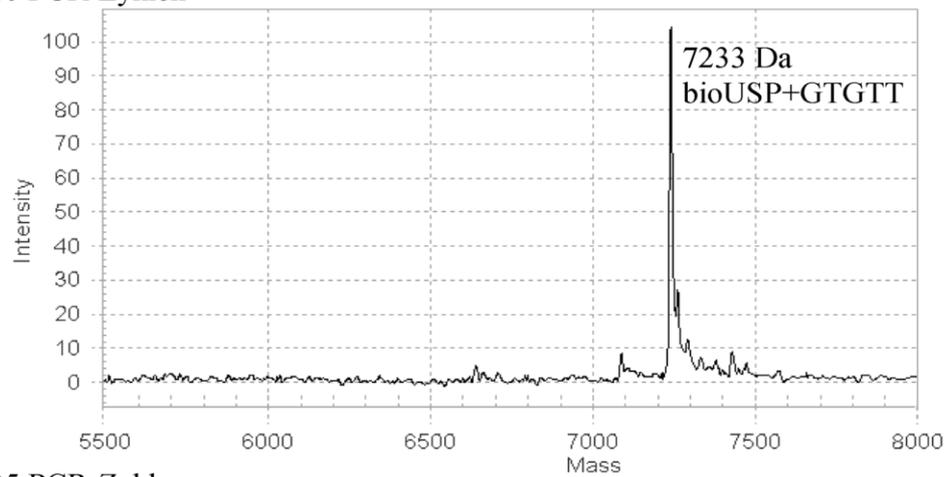
Abb. 5-9: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQY in Anwesenheit von dGTP und dTTP. Massen der auftretenden Peaks: bioUSP+GTGTT = 7233 Da; bioUSP+GTGTG = 7258

Sequenz Primer-Template-Komplex
5' bio-GTAAAACGACGGCCAGT
3' CAACATTTTGCTGCCGGTCACACATGCGTT

10 min Reaktionszeit



10 PCR-Zyklen



25 PCR-Zyklen

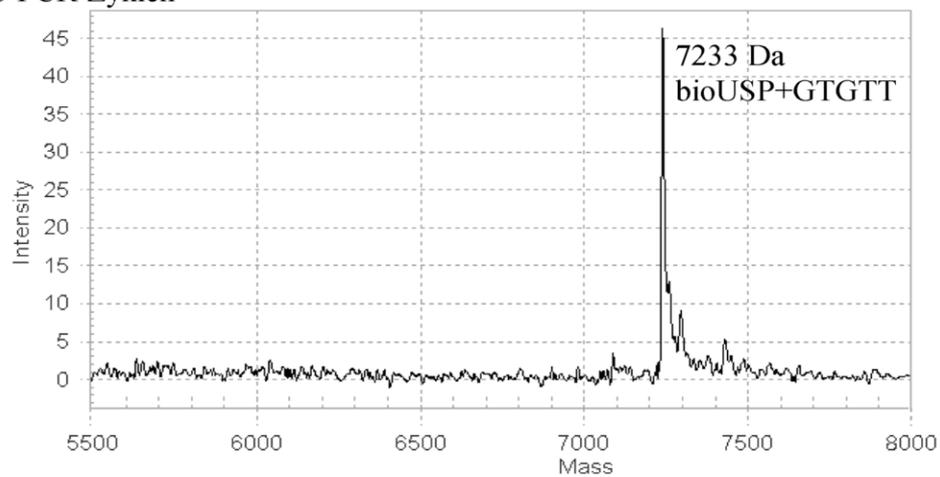


Abb. 5-10: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQW in Anwesenheit von dGTP und dTTP. Massen der Peaks: bioUSP+G = 5993 Da; bioUSP+GTGT = 6930; bioUSP+GTGTT = 7233 Da

Die Polymerasen TAQF und TAQYF zeigen ähnliche Ergebnisse: Bis zu einer Reaktionszeit von 10 PCR-Zyklen sind noch ca. 10 % des korrekten Produktes vorhanden. Aber schon nach 10 min Reaktionszeit können darüber hinaus verlängerte Primeranteile detektiert werden. Das Verhältnis G zu T liegt zugunsten des zusätzlichen Guanosins bei ca. 70 % zu 30 %.

Bei TAQW und TAQYW (vgl. Abb. 5-10) fällt auf, daß kein zusätzliches Guanosin eingebaut wird, sondern ausschließlich Thymidin. Nach 10 Zyklen ist der Primer zu 100 % durch die Sequenz GTGTT verlängert worden. Die Ursache dafür muß im Austausch von Tyrosin gegen Tryptophan liegen.

Das Paar TAQH und TAQYH weist ebenfalls eine Besonderheit auf. Beide Enzyme führen erst bei längerer Reaktionszeit Fehleinbauten durch und synthetisieren neben dem korrekten Endprodukt eine Reihe unvollständiger Zwischenprodukte. Insbesondere bei TAQYH sind deutliche Peaks bei den Massen für den um ein Guanosin verlängerten Primer und den um die Sequenz GTG verlängerten Primer detektierbar (s. Abb. 5-11). Derartige Mengen an Zwischenprodukten treten bei den übrigen Polymerasevarianten nicht auf. Das Verhältnis zwischen fehleingebautem Guanosin und Thymidin beträgt bei TAQH 80 % zu 20 %, ist also stärker zugunsten von Guanosin verschoben als bei den anderen Enzymen. Bei TAQYH beträgt es dagegen 60 % zu 40 % zugunsten von Thymidin.

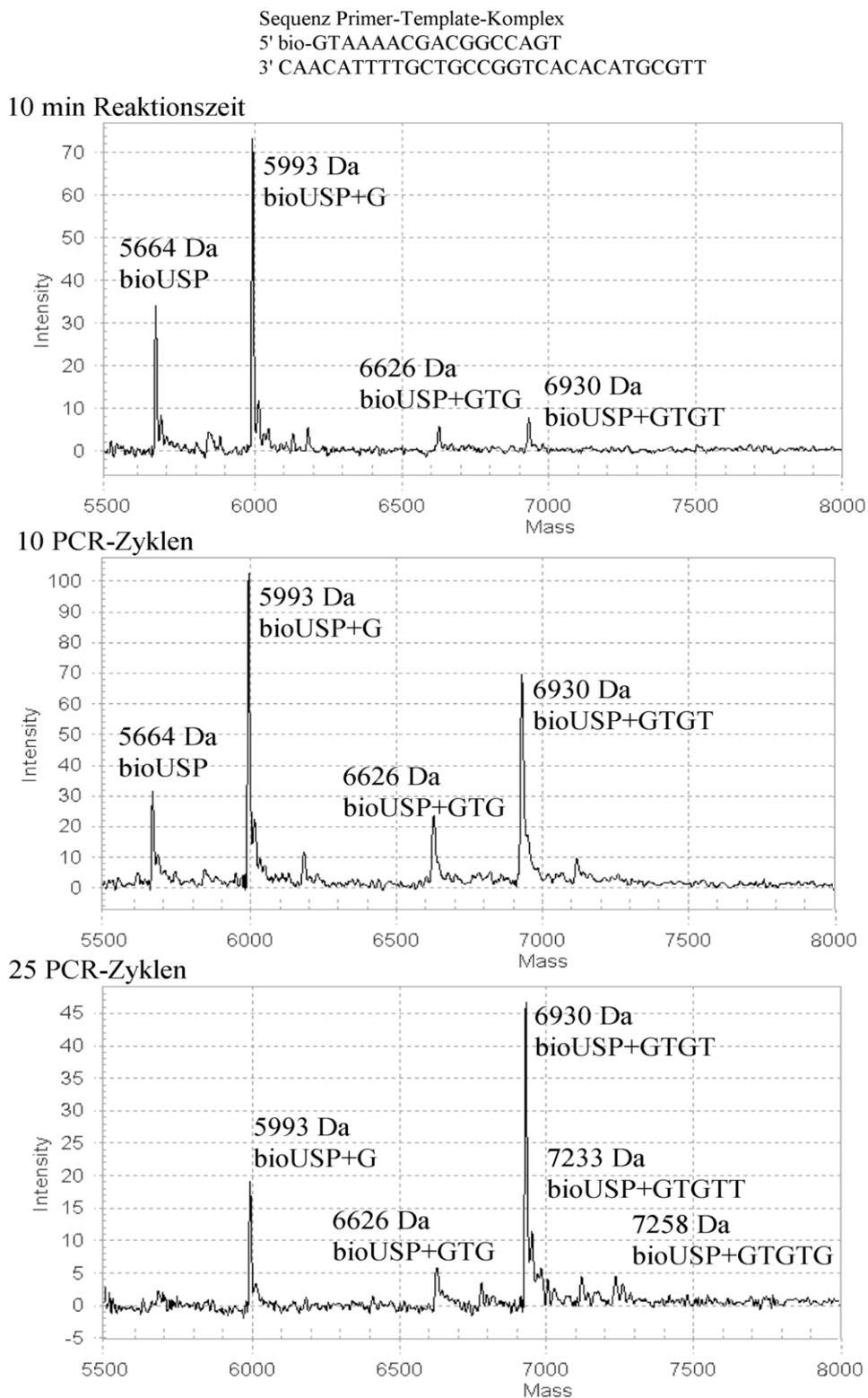


Abb. 5-11: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQYH in Anwesenheit von dGTP und dTTP. Massen der Peaks: bioUSP = 5664; bioUSP+G = 5993 Da; bioUSP+GTG = 6626; bioUSP+GTGT = 6930; bioUSP+GTGTT = 7233 Da; bioUSP+GTGTG = 7258

Bei Anwesenheit von drei Nukleotiden in der Reaktion kann wieder die Einteilung der Enzyme in Paare vorgenommen werden. Bestimmend ist auch hier die Mutation an Position 671. Im korrekten Reaktionsprodukt wird der Primer um die Sequenz GTGTA verlängert. TAQ und TAQY zeichnen sich wieder durch eine ausgeprägte Tendenz zu Fehleinbauten aus. Nach einer Reaktionszeit von 10 PCR-Zyklen werden bei TAQ anteilig zu je ca. 50 % ein zusätzliches Adenosin bzw. Guanosin inkorporiert (vgl. Tab. 5-3). Darüber hinaus entsteht ein zusätzliches Produkt, das um zwei Nukleotide über das korrekte Produkt hinaus verlängert wurde. Es trägt ein Guanosin und ein Thymin und ist nach 25 PCR-Zyklen das Hauptprodukt der Reaktion. Bei TAQY sind die Ergebnisse komplizierter, hier lassen sich diese drei Nebenprodukte der Reaktion nicht in allen Spektren gleichmäßig nachweisen (s. Abb. 5-12). Nach 10 PCR-Zyklen ist beispielsweise der zusätzliche Einbau eines Guanosins nicht nachweisbar, das Produkt mit zusätzlichem Adenosin aber zu ca. 17 %. Nach 25 Zyklen ist es umgekehrt. Für das zusätzliche Adenin kann zwar ein entsprechender Peak lokalisiert, von der Auswertesoftware wegen der geringen Größe aber nicht quantifiziert werden. Für das zusätzliche G wird dagegen ein Anteil von ca. 23 % gefunden. Der um zwei zusätzliche Basen verlängerte Primer stellt aber auch bei TAQY mit 20 % nach 10 Zyklen bzw. 37 % nach 25 Zyklen den größten Anteil der zusätzlichen Produkte dar. Die Reihenfolge des Einbaus von G und T kann durch die Masse nicht identifiziert werden. Wahrscheinlich ist aber zunächst der Einbau von T, der den thermodynamisch wahrscheinlichen Mismatch T:G erzeugt, und die anschließende komplementäre Verlängerung mit G. Größere Reaktionsprodukte konnten nicht identifiziert werden.

	bioUSP	+G	+GTG	+GTGTA	+GTGTAA	+GTGTAG	+GTGTATG	GTGTAA : GTGTAG
TAQ	10 min	23,66±2,31	--	--	71,27±2,31	--	5,07±6,13	--
	10 Zyklen	11,38±0,73	--	--	47,80±0,73	10,25±4,29	13,11±3,03	44,50 : 55,50 ±2,52
	25 Zyklen	--	--	--	27,72±1,52	17,01±2,65	20,47±3,50	34,80±1,52 48,88 : 51,12±1,38
TAQY	10 min	14,89±2,24	7,44±4,33	--	77,67±2,24	--	--	--
	10 Zyklen	--	--	--	63,13±0,81	16,60±0,81	--	20,27±1,35
	25 Zyklen	--	--	--	39,99±2,43	in Spuren	23,39±2,43	37,12±1,86
TAQF	10 min	44,82±1,35	10,45±0,91	--	39,16±1,35	in Spuren	--	5,57±1,15
	10 Zyklen	23,83±1,83	7,60±2,85	--	42,96±1,83	in Spuren	in Spuren	25,61±2,36
	25 Zyklen	--	--	--	33,22±2,40	4,22±1,65	6,96±2,40	55,59±0,94 50,68 : 49,32 ±2,36
TAQYF	10 min	45,18±1,13	11,46±0,66	--	38,02±1,13	in Spuren	in Spuren	4,71±0,42
	10 Zyklen	25,67±3,98	7,10±2,95	--	41,65±3,48	in Spuren	in Spuren	25,57±1,37
	25 Zyklen	--	--	--	17,23±6,02	2,50±1,12	3,33±2,93	76,93±6,02 52,63 : 47,57 ±3,91
TAQW	10 min	40,69±1,39	33,56±0,44	--	21,96±1,39	--	--	--
	10 Zyklen	23,08±1,78	17,68±1,49	--	59,24±1,78	--	--	--
	25 Zyklen	--	9,43±0,13	--	90,57±0,13	--	--	--
TAQYW	10 min	63,73±1,25	20,23±2,12	--	16,03±1,25	--	--	--
	10 Zyklen	29,67±2,33	13,53±2,96	--	56,80±2,33	--	--	--
	25 Zyklen	7,18±,087	6,09±2,29	--	86,13±0,87	--	--	--
TAQH	10 min	66,46±2,82	33,55±2,82	--	--	--	--	--
	10 Zyklen	26,50±1,93	33,74±1,35	11,50±1,67	28,26±1,93	--	--	--
	25 Zyklen	6,31±2,71	28,24±2,82	9,55±0,98	55,91±2,71	--	--	--
TAQYH	10 min	74,43±0,95	25,59±0,95	--	--	--	--	--
	10 Zyklen	32,92±0,96	56,60±0,76	10,48±1,35	--	--	--	--
	25 Zyklen	6,95±0,88	63,48±0,29	17,87±1,19	11,70±0,88	--	--	--
Taq Pol (WT)	10 min	77,23±3,12	6,02±0,93	--	16,75±3,12	--	--	--
	10 Zyklen	39,93±2,62	4,43±1,58	--	55,65±2,62	--	--	--
	25 Zyklen	9,67±0,69	--	--	90,34±0,69	--	--	--

Tab. 5-3: Quantitative Auswertung der Primer-Extension-Reaktion in Anwesenheit der drei Nukleotide G, T und A. Die korrekte Verlängerungssequenz ist GTGTA. Die Anteile der einzelnen Produkte sind in % angegeben.

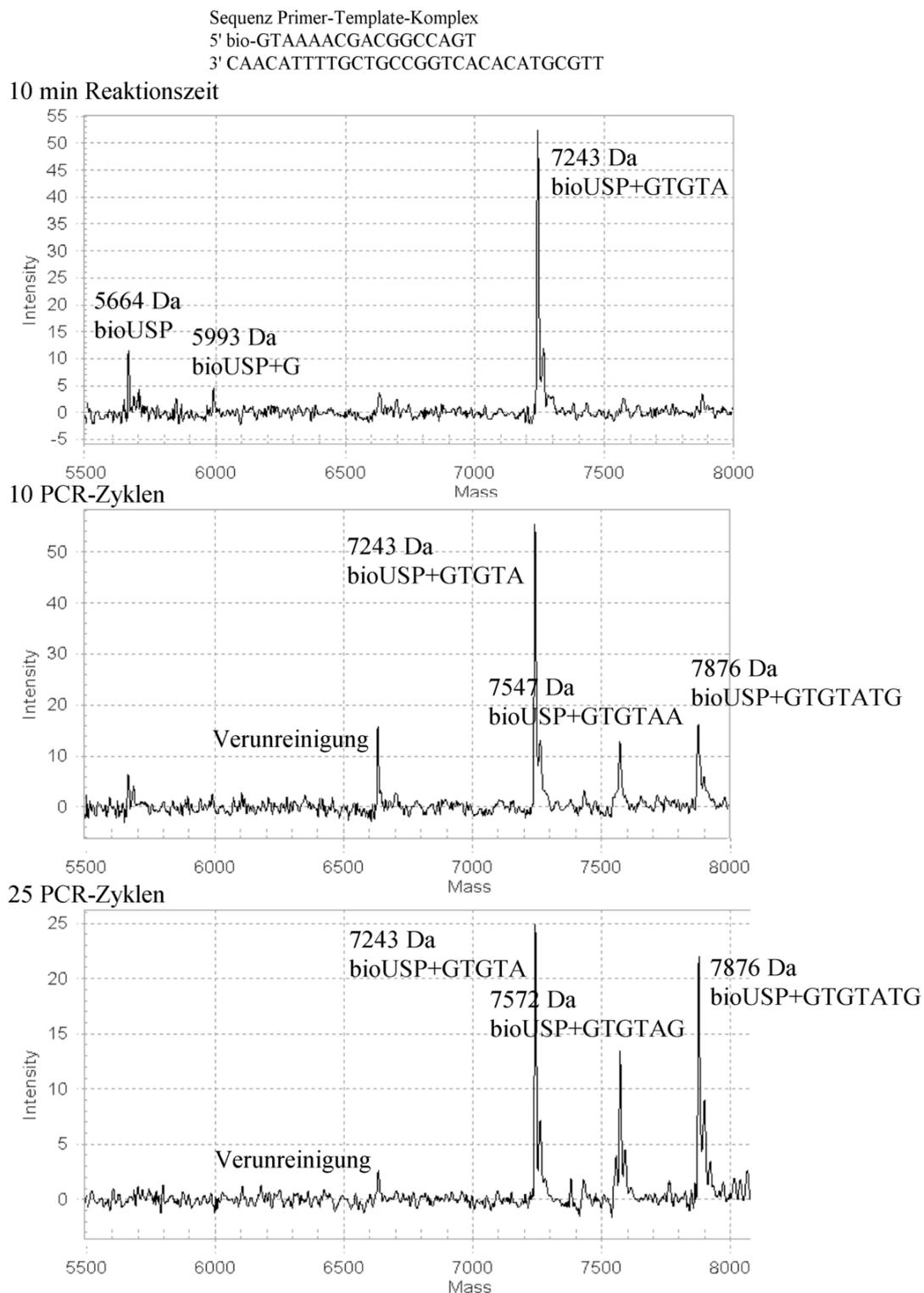


Abb. 5-12: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQY in Anwesenheit von dGTP, dTTP und dATP. Massen der Peaks: bioUSP = 5664; bioUSP+G = 5993 Da; bioUSP+GTGTA = 7243 Da; bioUSP+GTGTAA = 7547 Da; bioUSP+GTGTAG = 7572 Da; bioUSP+GTGTATG = 7876 Da.

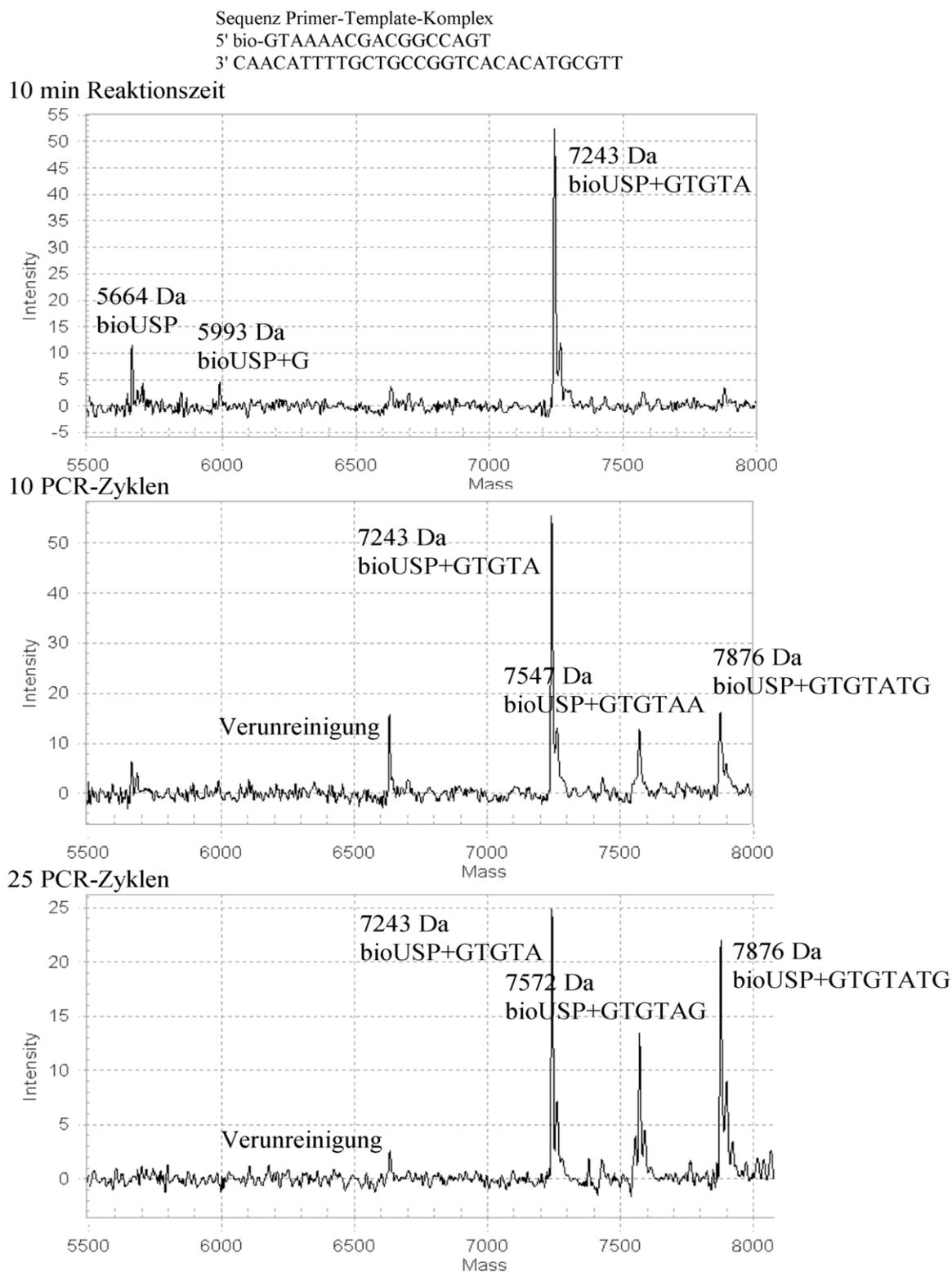


Abb. 5-13: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQW in Anwesenheit von dGTP, dTTP und dATP. Massen der Peaks: bioUSP = 5664; bioUSP+G = 5993 Da; bioUSP+GTGTA = 7243 Da

Bei einer Masse von ca. 6631 Da ist in zwei Spektren eine deutliche Verunreinigung zu erkennen (s. Abb. 5-12). Die Masse des Peaks ließ sich keiner möglichen Nukleotidkombination zuordnen, tritt auch in Negativkontrollen und in stark schwankender Ausprägung der verschiedenen Spektren einer Probe immer wieder auf. Die Herkunft dieser Verunreinigung konnte nicht endgültig geklärt werden. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um eine Kontamination der Bead-Suspension.

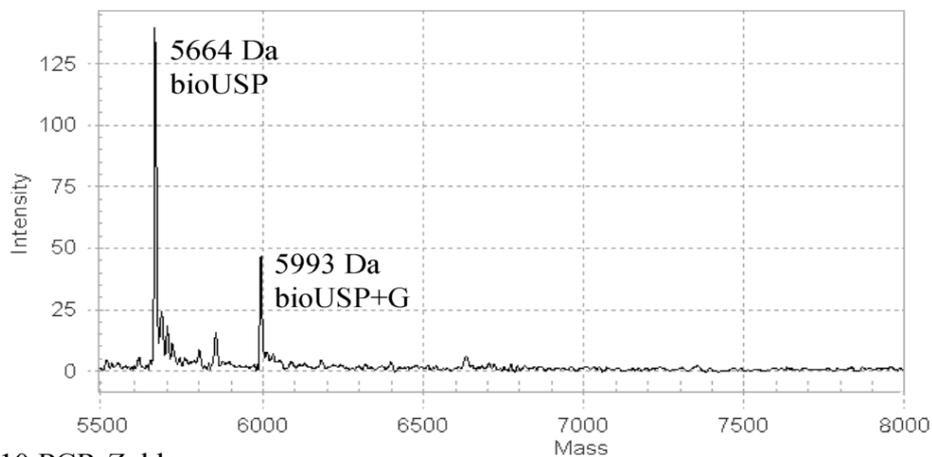
Bei TAQF und TAQYF zeigt sich im Prinzip ein ähnliches Bild. Auch hier ist nach 25 PCR-Zyklen zusätzlich zur komplementären Template-Sequenz der um G und T verlängerte Primer mit 56 % bzw. 77 % das Hauptprodukt. Allerdings ist sein Anteil am Produktgemisch hier ungefähr doppelt so hoch wie bei TAQ und TAQY. Im Gegensatz dazu ist nach einer Reaktionszeit von 10 min der Anteil an verlängertem Primer mit knapp 40 % gegenüber 70 – 77 % bei TAQ und TAQY sehr viel geringer.

Bei den übrigen Enzymen sowie bei der Wildtyp-Taq-Polymerase treten dagegen keine der genannten Fehleinbauten auf. Die Massenspektren der Produktmischungen von TAQW und TAQYW (vgl. Abb. 5-13) weisen bei einer kurzen Reaktionszeit noch 60 – 70 % an unverlängertem Primer auf. Erst ab 10 PCR-Zyklen wird der korrekt verlängerte Primer das Hauptprodukt. Außerdem fallen in allen Spektren größere Anteile des um ein Nukleotid verlängerten Primers auf, die durch die Verwendung der zyklisierten Programme aber deutlich geringer werden.

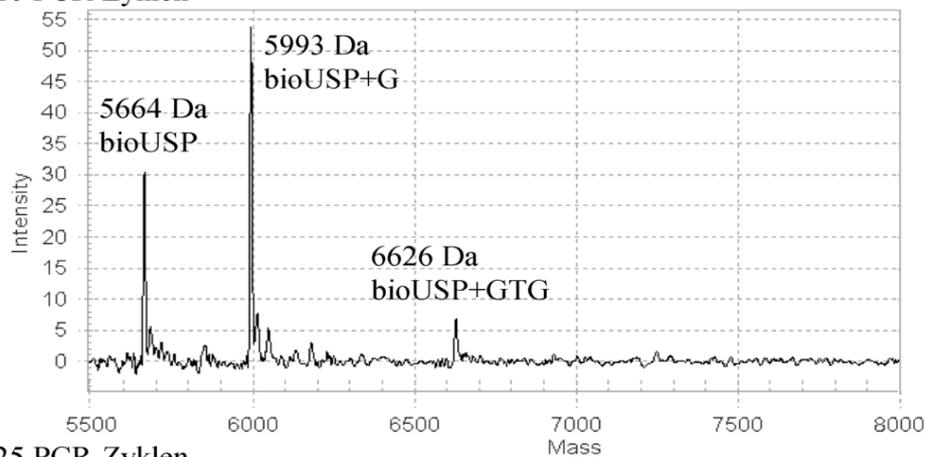
Die Spektren der Enzyme TAQH und TAQYH (vgl. Abb. 5-14) zeigen, wie auch schon mit zwei Nukleotiden, zusätzliche Zwischenprodukte. Bei 10 min Reaktionszeit können beide den Primer nur zu 25 – 30 % um ein Nukleotid verlängern. Das korrekte Produkt erscheint bei TAQH nach 10 PCR-Zyklen, bei TAQYH erst nach 25 PCR-Zyklen in geringen Anteilen. Hier bleibt der um ein Nukleotid verlängerte Primer das Hauptprodukt. Zusätzlich ist bei beiden Enzymen ein Peak für den um die Sequenz GTG verlängerten Primer detektierbar, der bei den anderen Polymerasen nicht auftaucht.

Sequenz Primer-Template-Komplex
 5' bio-GTAAAACGACGGCCAGT
 3'-CAACATTTTGCTGCCGGTCACACATGCGTT

10 min Reaktionszeit



10 PCR-Zyklen



25 PCR-Zyklen

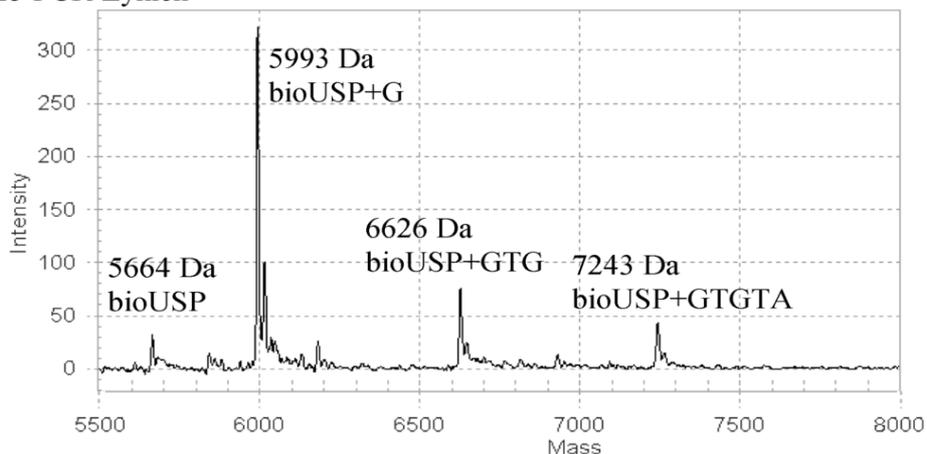


Abb. 5-14: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQYH in Anwesenheit von dGTP, dTTP und dATP. Massen der Peaks: bioUSP = 5664; bioUSP+G = 5993 Da; bioUSP+GTG = 6626 Da; bioUSP+GTGTA = 7243 Da

Bei der Zugabe aller vier Nukleotide treten deutlich weniger Fehleinbauten auf. TAQ und TAQY zeigen das für die Taq-Polymerase typische Anhängen eines zusätzlichen Adenosins an das vollständige Reaktionsprodukt¹⁰¹. Der korrekt verlängerte Primer bleibt auch nach 25 Zyklen das Hauptprodukt. Der zusätzlich um ein A verlängerte Primer hat bei beiden Polymerasevarianten einen Anteil von ca. 20 % (s. Tab. 5-4, Abb. 5-15). Auffällig ist ein deutlicher Anteil des unverlängerten Primers, der bei der einfachen Elongation bei bis zu 40 % liegt, sowie des um ein G verlängerten Primers, der bei 16 – 17 % liegt. Mit dem Durchlaufen der zyklisierten Temperaturprogramme nimmt der Anteil dieser deutlich ab. Dies tritt auch bei den Enzymen TAQF und TAQYF auf. Hier liegt der Anteil des unverlängerten Primers nach 10 min Reaktionszeit sogar noch bei ca. 60 %. Die Menge des vollständigen Produktes beträgt dann nur ca. 21 %. Nach 25 PCR-Zyklen sind es ca. 80 %.

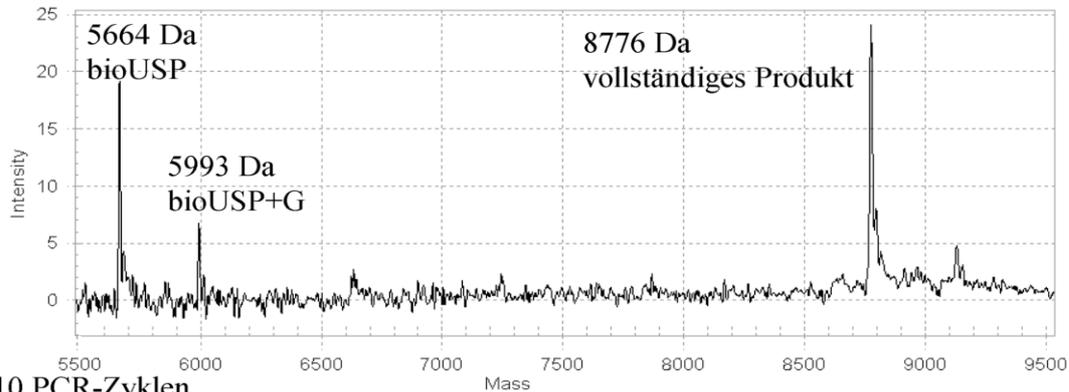
	bioUSP	+G	+GTG	komplettes Produkt -A	komplettes Produkt	komplettes Produkt +A
10 min	48,83±4,70	16,63±3,35	--	--	36,54±4,70	--
10 Zyklen	38,88±4,30	12,63±2,35	--	--	42,98±4,30	5,51±0,57
25 Zyklen	10,65±1,93	7,93±1,47	--	--	61,78±1,93	19,64±0,19
10 min	30,46±1,11	15,21±2,62	--	--	54,33±1,11	--
10 Zyklen	23,83±1,99	12,13±1,35	--	--	60,29±1,99	3,75±1,09
25 Zyklen	--	--	--	--	76,90±1,33	23,10±1,33
10 min	59,69±5,91	18,36±2,70	--	--	21,90±5,94	--
10 Zyklen	53,91±5,91	14,72±2,00	--	--	31,37±5,91	--
25 Zyklen	9,94±1,60	9,05±0,91	--	--	81,01±1,60	--
10 min	61,91±2,05	17,04±0,72	--	--	21,05±2,05	--
10 Zyklen	48,22±1,31	13,14±4,40	--	--	35,18±1,31	--
25 Zyklen	12,43±1,96	10,15±1,41	--	--	77,42±1,96	--
10 min	60,80±0,74	33,98±0,86	--	--	5,23±0,74	--
10 Zyklen	47,80±1,66	29,42±2,69	--	--	22,78±1,66	--
25 Zyklen	17,57±1,63	31,84±1,79	--	--	50,60±1,63	--
10 min	74,43±0,37	21,37±0,37	--	--	4,21±0,37	--
10 Zyklen	60,10±1,98	19,60±0,37	--	--	20,30±1,98	--
25 Zyklen	35,06±1,89	19,93±3,33	--	--	45,01±1,89	--
10 min	63,65±0,58	31,48±0,58	4,87±0,40	--	--	--
10 Zyklen	36,78±0,85	46,47±0,85	13,22±1,42	3,53±1,51	--	--
25 Zyklen	17,17±2,37	62,91±1,40	--	8,40±2,52	11,52±2,37	--
10 min	75,39±1,14	24,61±1,14	--	--	--	--
10 Zyklen	30,73±1,88	60,87±1,88	8,39±1,53	--	--	--
25 Zyklen	8,93±0,43	76,29±0,43	14,78±1,48	--	--	--
10 min	77,23±3,12	6,02±0,93	--	--	16,75±3,12	--
10 Zyklen	39,93±2,62	4,43±1,58	--	--	55,65±2,62	--
25 Zyklen	9,67±0,69	--	--	--	90,34±0,69	--

Tab. 5-4: Quantitative Auswertung der Primer-Extension-Reaktion in Anwesenheit aller vier Nukleotide. Die Anteile der einzelnen Produkte sind in % angegeben.

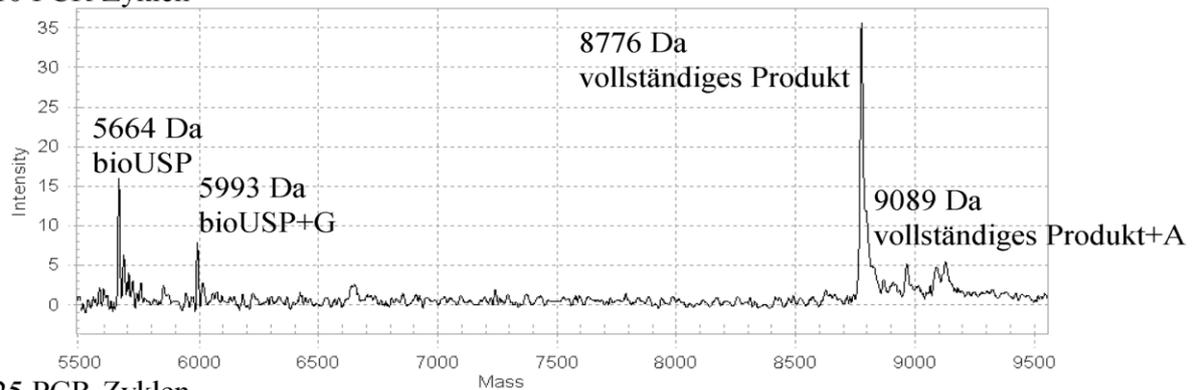
5 Hochdurchsatzanalyse modifizierter Taq-Polymerasen mittels MALDI-TOF-MS

Sequenz Primer-Template-Komplex
5' bio-GTAAAACGACGGCCAGT
3' CAACATTTTGCTGCCGGTCACACATGCGTT

10 min Reaktionszeit



10 PCR-Zyklen



25 PCR-Zyklen

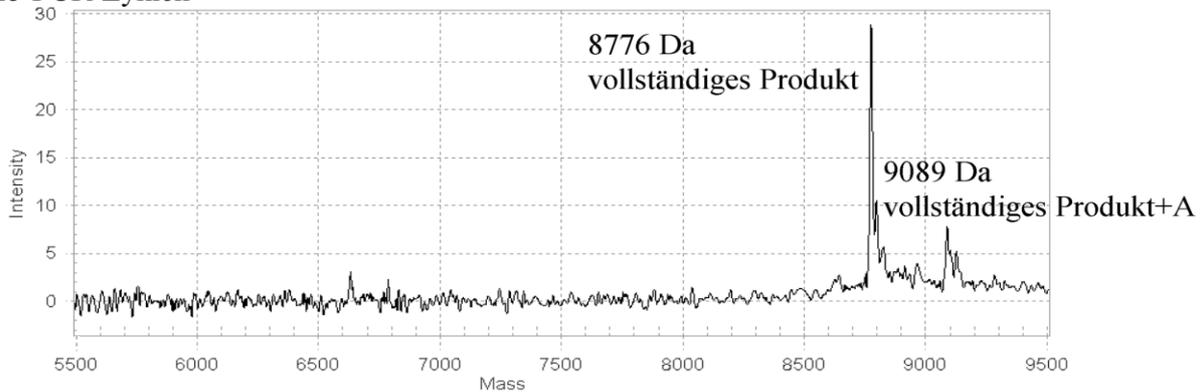


Abb. 5-15: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQY in Anwesenheit aller vier dNTPs. Massen der Peaks: bioUSP = 5664; bioUSP+G = 5993 Da; vollständiges Produkt = 8776 Da; vollständiges Produkt+A = 9089 Da

TAQW (s. Abb. 5-16) und TAQYW produzieren innerhalb von 10 min Reaktionszeit lediglich ca. 5 % des vollständig verlängerten Produktes. Der unverlängerte Primer hat mit 60 – 70 % den größten Anteil am Produktgemisch. Nach 25 Zyklen können von beiden Polymerasen immerhin ca. 50 % des Primers vollständig um 10 Nukleotide verlängert werden. In diesen Spektren tritt wieder eine Verunreinigung mit einer Masse von ca. 6631 Da auf.

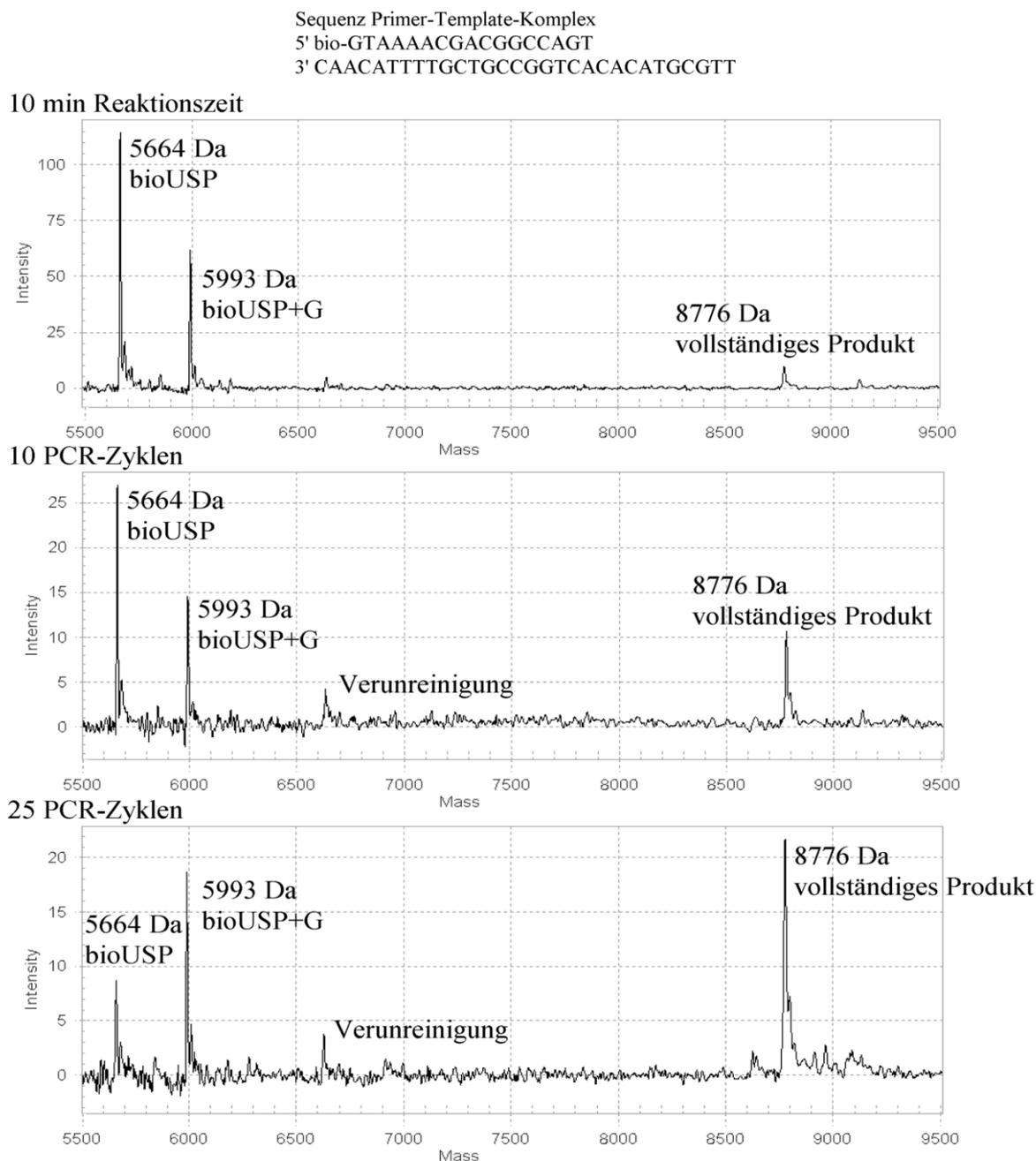


Abb. 5-16: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQW in Anwesenheit aller vier dNTPs. Massen der Peaks: bioUSP = 5664; bioUSP+G = 5993 Da; vollständiges Produkt = 8776 Da

Die Polymerasevariante TAQH erzeugt erst nach 25 Zyklen ein vollständiges Produkt. Den Hauptanteil nimmt der korrekt um ein Nukleotid verlängerte Primer mit mehr als 60 % ein. TAQYH dagegen ist auch nach 25 PCR-Zyklen nicht in der Lage ein komplettes Produkt zu erzeugen (s. Abb. 5-17). Auffällig ist ein Abbruchprodukt, bei dem der Primer um die Sequenz GTG verlängert wurde. Dieses tritt auch bei TAQH auf und konnte ebenfalls bei den vorherigen Reaktionen mit zwei bzw. drei Nukleotiden nachgewiesen werden. Offensichtlich wird durch die Mutation Y671H ein Abbrechen bzw. Pausieren an dieser Stelle verursacht. Durch das Einbringen von Histidin in das aktive Zentrum wird eine zusätzliche positive Ladung hinzugefügt, die das Ladungsgleichgewicht im Zentrum der Polymerase verschiebt. Die Reaktion wird dadurch offensichtlich behindert.

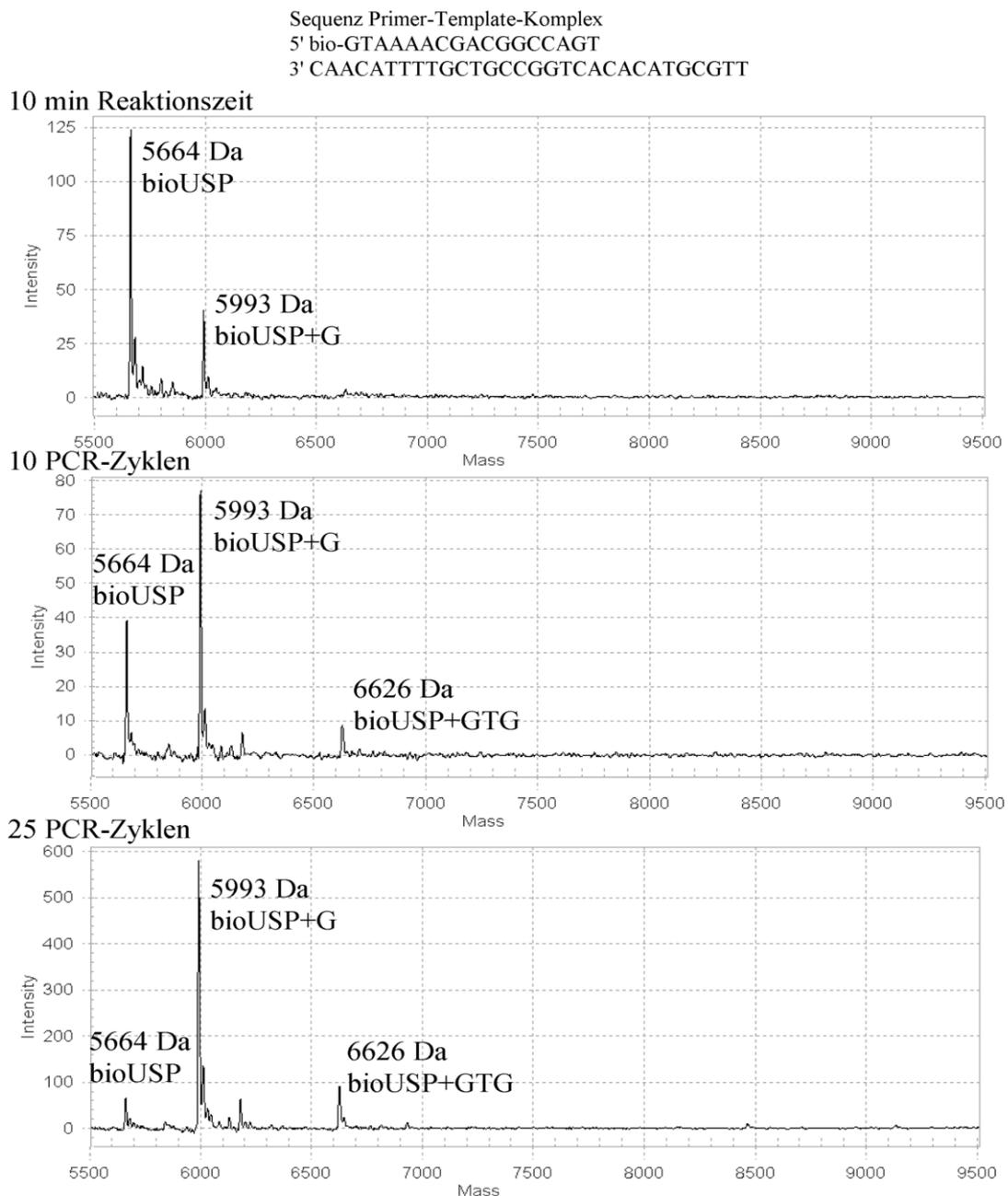


Abb. 5-17: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQYH in Anwesenheit aller vier dNTPs. Massen der Peaks: bioUSP = 5664; bioUSP+G = 5993 Da; bioUSP+GTG = 6626 Da

Insgesamt läßt sich feststellen, daß ausgeprägte Fehleinbauten nur unter bestimmten Reaktionsbedingungen, nämlich der Abwesenheit von mindestens einer Nukleotidsorte in der Reaktion, beobachtet werden können. Dieser Mangel begünstigt offenbar eine “falsche” Verlängerung des Primers.

Darüber hinaus ist zu beobachten, daß bei allen Polymerasevarianten der Anteil des unverlängerten

Primers bzw. des um ein Nukleotid verlängerten Primers mit zunehmender Nukleotidzahl steigt. Dies ist auch bei der Wildtyppolymerase der Fall. Es kann ein Hinweis auf einen Selektionsmechanismus der Taq-Polymerase sein, die nicht über eine korrigierende 3'-5'-Exonuklease-Funktion verfügt. Bei Anwesenheit nur eines Nukleotides ist unter den gewählten Versuchsbedingungen jeder gebildete Komplex aus Primer, Template, Polymerase und Nukleotid korrekt. Mit zunehmender Zahl der Nukleotidsorten konkurrieren die nicht-komplementären mit den komplementären Nukleotiden um die Beteiligung an einem Initiationskomplex, dessen Bildung dann entweder ausbleibt oder in falscher Zusammensetzung ausgeführt wird. Die Reaktion bleibt aus. Im letzteren Fall würde das Enzym erst nach dem Auseinanderfallen des Komplexes wieder für die Bildung eines neuen Reaktionskomplexes freiwerden. Der damit verbundene Zeitverbrauch bedingt, daß der unverlängerte bzw. der um ein Nukleotid verlängerte Primer in den Spektren mit den Produkten aus früheren Stadien der Reaktion detektierbar ist. Nach Bildung des korrekten Initiationskomplexes erfolgt die Auswahl der nun korrekten Nukleotide und die anschließende Reaktion offensichtlich schneller als das Auseinanderfallen der einzelnen Komponenten, so daß entsprechende Abbruchprodukte nicht auftreten. Möglicherweise wird der Reaktionskomplex durch die wachsende Primer-Template-Duplex stabilisiert. Eine Ausnahme bilden hier TAQH und TAQYH, bei denen ein weiteres Abbruchprodukt auftritt: Der um drei Nukleotide verlängerte Primer erscheint hier zusätzlich in den Spektren. Offensichtlich ist an dieser Stelle durch die Mutation Y671H die Reaktion so stark verlangsamt, daß ein Auseinanderfallen des Komplexes möglich wird und das entsprechende Reaktionsprodukt sichtbar wird.

Abschließend ermöglichen die Ergebnisse dieser Untersuchungen zusammen mit denen aus den Voruntersuchungen in Standard-PCRs (s. Kap. 4.4) eine grobe Einteilung der Mutanten in vier Kategorien:

- PCR-aktive Enzyme, vollständige Primer-Extension:
Zu dieser Gruppe gehören die Enzyme TAQ, TAQY, TAQF und TAQYF. Sie sind nicht nur in der Lage ein PCR-Produkt zu erzeugen, sondern können auch in der Primer-Extension-Reaktion den Primer vollständig um 10 Nukleotide Template-abhängig verlängern. Es treten dabei unter allen Reaktionsbedingungen ähnlich zusammengesetzte Produktgemische und die gleichen Fehleinbauten auf.
- nicht PCR-aktive Enzyme, vollständige Primer-Extension:
Hierzu zählen TAQW, TAQYW und TAQH. Sie können den Primer um 10 Nukleotide Templateabhängig verlängern, obwohl sie in der PCR kein Produkt erzeugen. In den entsprechenden Spektren sind neben dem vollständigen Produkt in größeren Anteilen Nebenprodukte und unverlängerter Primer erkennbar. Dies trifft in besonderem Maße auf TAQH zu. Diese Polymerasevariante produziert erst nach langer Reaktionszeit ein vollständiges Produkt. Fehleinbauten treten erst nach längerer Reaktionszeit und in geringerem Maße auf als in der ersten Enzymgruppe. Eine Besonderheit zeichnet dabei TAQW und TAQYW aus, die zu 100 % eine T:T-Fehlpaarung gegenüber einer G:T-Fehlpaarung bevorzugen.
- nicht PCR-aktive Enzyme, unvollständige Primer-Extension:
In dieser größten Kategorie befinden sich TAQS, TAQYS, TAQT, TAQYT und TAQYH. Von diesen Polymerasen wird der Primer nur um ein Nukleotid verlängert. Dies geschieht Templateabhängig und fast vollständig. In allen Spektren sind nur geringe Mengen des unverlängerten Primers detektierbar. Eine Ausnahme bildet TAQYH, das mit einer langen Reaktionszeit bis zu drei Nukleotide Template-abhängig einbauen kann, bei Anwesenheit von lediglich drei Nukleotiden sogar fünf Nukleotide.
- nicht PCR-aktive Enzyme, keine Primer-Extension:
Zu dieser Gruppe gehören TAQP und TAQYP. Sie zeigen weder in der PCR noch in der Primer-Extension-Reaktion Polymerase-Aktivität.

Zusammenfassend läßt sich aus den Ergebnissen schließen, daß an Position 671 der Polymerase ein Aminosäurerest mit aromatischem Charakter zwingend erforderlich ist, um zumindest eine reduzierte Reaktionsfähigkeit der Polymerase zu erhalten. Die Fähigkeit zur Ausbildung von Wasserstoff-

brückenbindungen, die durch das ursprüngliche Tyrosin gegeben ist, scheint dagegen nicht die entscheidende Funktion zu sein. Laut Röntgenstrukturanalyse liegt das Tyrosin in der offenen Form des Reaktionskomplexes auf dem ersten Basenpaar der Primer-Template-Duplex und nimmt an den *stacking*-Wechselwirkungen teil. Einem nicht-aromatischen Aminosäurerest ist diese Wechselwirkung nicht möglich. Beim Übergang in die geschlossene Form wird das Tyrosin aus seiner Lage verschoben und das hineinkommende Nukleotid wird an seiner Stelle positioniert. Diese Funktion der Positionierungshilfe für die DNA kann offensichtlich nur durch einen aromatischen Aminosäurerest erfüllt werden. Neben Tyrosin ist nur Phenylalanin in der Lage, diese Funktion komplett zu erfüllen. Tryptophan ist nur in sehr viel geringerem Ausmaß dazu fähig, wie auch Histidin, das aber durch das Einbringen einer zusätzlichen positiven Ladung in das aktive Zentrum eher hinderlich für die Reaktion wirkt.

5.4.2 Ribonukleotide

Neben dem natürlichen Substrat wurde die Akzeptanz der modifizierten Enzyme gegenüber Ribonukleotiden getestet. Dazu wurden die Desoxyribonukleotide komplett durch Ribonukleotide ersetzt. In einer ersten Versuchsreihe wurde jeweils nur ein Ribonukleotid zur Reaktion gegeben. Dabei wurden alle vier vorhandenen Templates mit dem jeweils passenden Ribonukleotid kombiniert, so daß eine Untersuchung jeder Base möglich war. Die Reaktionsprodukte wurden einmal nach zehnminütiger Reaktionszeit untersucht und einmal nach Durchlaufen eines PCR-analogen Temperaturprogramms mit 25 Zyklen (vgl. Kap. 5.2).

Innerhalb der einfachen Elongationszeit waren lediglich vier der Polymerasen (TAQ, TAQY, TAQF, TAQYF) in der Lage, den Primer um ein Ribonukleotid zu verlängern (vg. Tab. 5-5).

		<i>riboA</i>	<i>riboC</i>	<i>riboG</i>	<i>riboU</i>
TAQ	10 min	--	25,99±0,63	35,62±0,96	--
	25 Zyklen	38,18±1,17	87,02±1,21	100	20,63±2,11
TAQY	10 min	--	41,94±1,86	39,38±1,33	--
	25 Zyklen	44,04±2,46	100	100	33,88±1,91
TAQF	10 min	--	16,31±0,31	9,17±1,27	--
	25 Zyklen	44,04±2,46	72,02±1,01	57,47±1,09	17,23±0,08
TAQYF	10 min	--	16,19±1,35	10,01±0,32	--
	25 Zyklen	30,20±2,93	74,73±2,99	59,32±2,04	17,94±1,56
Taq Pol (WT)	10 min	--	11,14±1,53	7,79±0,44	--
	25 Zyklen	--	18,34±0,94	14,58±2,35	--

Tab. 5-5: Primer-Extension-mit jeweils einem Ribonukleotid; Anteil verlängerter Primer in %

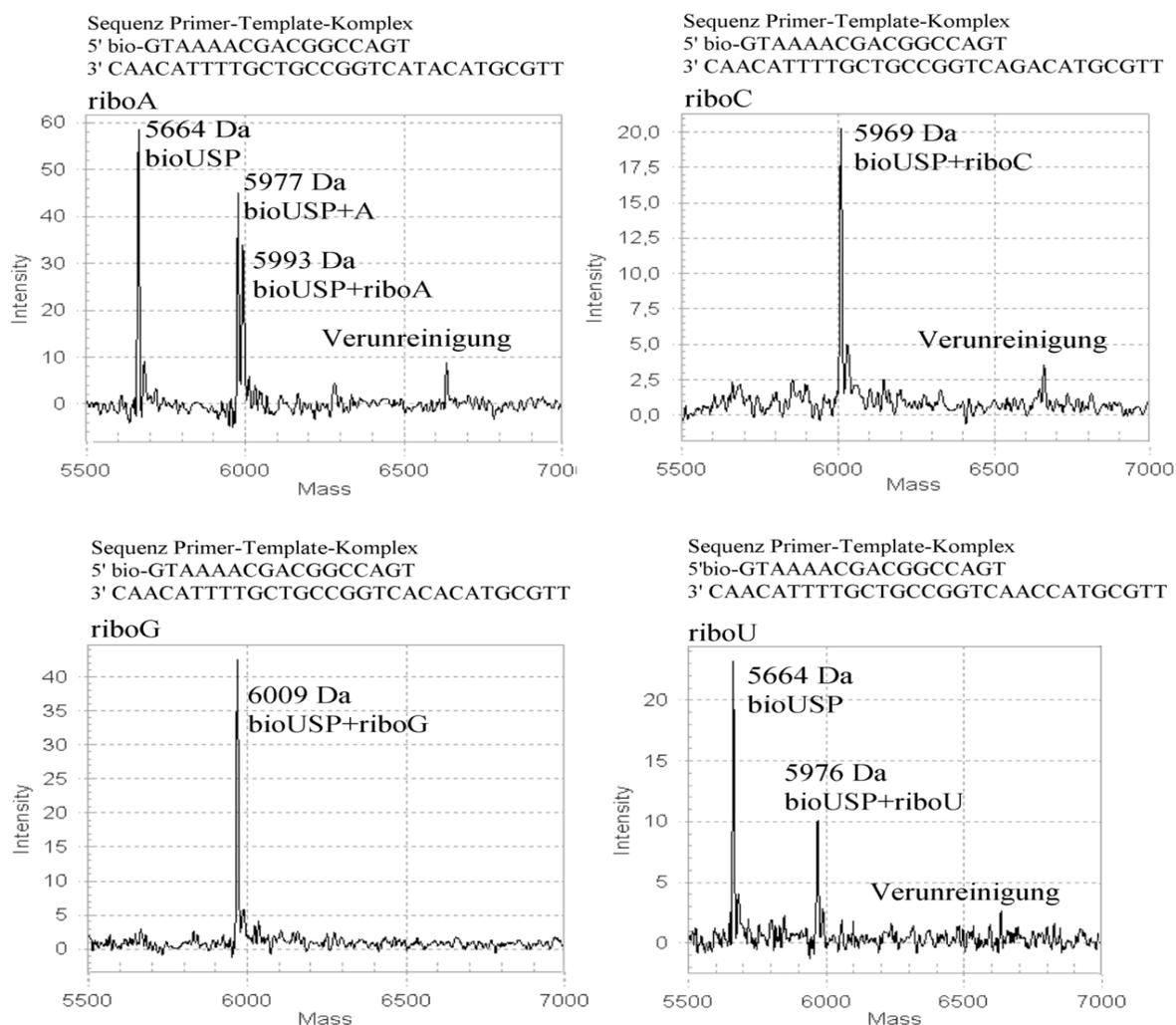


Abb. 5-18: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion mit jeweils einem Ribonukleotid für das Enzym TAQY nach 25 PCR-Zyklen. Auftretende Peaks: bioUSP = 5664 Da; bioUSP+riboA = 5993 Da; bioUSP+A = 5977 Da; bioUSP+riboC = 5969 Da; bioUSP+riboG = 6009 Da; bioUSP+riboU = 5976 Da. Die Verunreinigung bei ca. 6631 Da tritt auch in diesen Spektren wieder auf.

Die Umsetzung des Primers durch alle vier Enzyme ist sehr gering, so daß hauptsächlich unverlängerter Primer nachgewiesen werden kann. Außerdem zeigt sich eine deutliche Präferenz für den Einbau der Ribonukleotide riboG und riboC. Diese werden von allen vier Polymerasevarianten und dem Wildtypenzym deutlich effizienter eingebaut als riboA und riboU. Beide werden innerhalb der zehnminütigen, einfachen Reaktionszeit gar nicht akzeptiert. Beim PCR-analogen Temperaturprogramm mit 25 Zyklen bestätigt sich dieses Bild. Mit riboC und riboG wird der Primer von allen Polymerasevarianten und der Ursprungspolymerase um jeweils ein Nukleotid verlängert, von TAQ und TAQY wird der Primer sogar vollständig umgesetzt. RiboU und riboA werden von allen vier Mutanten nur bei einem Teil des Primers eingebaut, nicht jedoch von der Wildtyppolymerase. Auffällig ist außerdem, daß auch nach dem Durchlaufen des zyklisierten Temperaturprogramms keine Template-unabhängig verlängerten Produkte detektierbar sind, wie es beim natürlichen Substrat, den dNTPs der Fall ist. Im Fall von riboA läßt sich darüber hinaus eine Verunreinigung der Nukleotidlösung mit dATP nachweisen (s. Abb. 5-18). Diese Unterscheidung wäre mit Hilfe der Gelelektrophorese nicht möglich gewesen und hätte so die Interpretation der erhaltenen Daten verfälscht.

Zusätzlich zu den Varianten TAQ, TAQY, TAQF, TAQYF, die den Primer in zehnminütiger Extensionszeit verlängern konnten, waren noch TAQW und TAQYW in der Lage, einen Teil des Primers Template-abhängig um ein Ribonukleotid zu verlängern (vgl. Tab. 5-6). Auch hier bestätigte sich wieder die Bevorzugung von riboC und riboG.

	<i>riboA</i>	<i>riboC</i>	<i>riboG</i>	<i>riboU</i>
TAQW	--	50,82±2,60	23,40±2,70	--
TAQYW	--	10,24±0,97	8,27±1,44	--

Tab. 5-6: Ergebnisse der Primer-Extension-Reaktion nach 25 Zyklen PCR-analogen Temperaturprogramm mit jeweils einem Ribonukleotid; Anteil verlängerter Primer in %

Diese Bevorzugung läßt sich möglicherweise durch die zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung erklären, die bei der Basenpaarung C:G existiert, und so eine zusätzliche Stabilisierung des Übergangszustandes bewirken könnte, obwohl die Struktur des Komplexes für das Enzym nicht optimal ist. RiboU wird dagegen am schlechtesten eingebaut. Dies läßt sich damit begründen, daß weder der Zucker- noch der Basenanteil des Ribonukleotids ein natürliches Substrat der Taq-DNA-Polymerase ist, und so die Inkorporation dieses Nukleotids noch deutlicher erschwert wird als bei den übrigen Ribonukleotiden.

In einer zweiten Versuchsreihe mit Ribonukleotiden waren die Reaktionen so angelegt, daß die Anzahl der Nukleotide sukzessiv erhöht wurde – analog zur Vorgehensweise bei den Desoxyribonukleotiden. Als Template wurde hier wieder Templ1 ausgewählt, allerdings wurde lediglich das längere Temperaturprogramm mit 25 PCR-Zyklen angewandt. Dabei zeigte sich, daß keines der Enzyme in der Lage war, den Primer über ein Nukleotid hinaus zu verlängern. Die vier Mutanten TAQ, TAQY, TAQF und TAQYF waren in der Lage, bei Anwesenheit von bis zu drei Nukleotiden den Primer Template-abhängig um ein Nukleotid zu verlängern. Die Reaktion war aber in keinem Fall vollständig – es war immer unverlängerter Primer detektierbar. Bei Zugabe aller vier Ribonukleotide war in keinem Fall eine Reaktion nachzuweisen. Die Spektren zeigen nur unverlängerten Primer.

5.4.3 α -Thiodesoxynukleotide (α -S-dNTP)

Bei α -Thiodesoxynukleotiden ist am ersten Phosphat des Triphosphatrestes ein Sauerstoff- durch ein Schwefelatom ersetzt (s. Abb. 5-19). Diese Sorte modifizierte Nukleotide werden in der sogenannten Reversen Sanger Sequenzierung²⁰ verwendet. Dabei wird der zu sequenzierende DNA-Strang zunächst mittels PCR vollständig zum Doppelstrang aufgebaut und vervielfältigt. Während der Polymerisationsreaktion, die in vier getrennten Reaktionen für die vier Basen durchgeführt wird, erfolgt der statistische Einbau je eines α -S-dNTPs. Dieses wirkt analog zu den ddNTPs bei der Sanger Sequenzierung in der Reversen Sanger Sequenzierung als Terminator in der sich anschließenden Sequenzierreaktion, einem 3'-exonukleolytischen Abbau. Der modifizierte DNA-Doppelstrang wird mit dem Enzym Exonuklease III bis zu den Positionen mit α -Thionukleotiden abgebaut, da die Phosphothioatbindung von dem Enzym ca. 100mal langsamer gespalten wird als eine Phosphodiesterbinding. Diese Terminierung des Abbaus am Ort des ersten erreichten Thioanalogons resultiert in einer Sequenzierleiter.

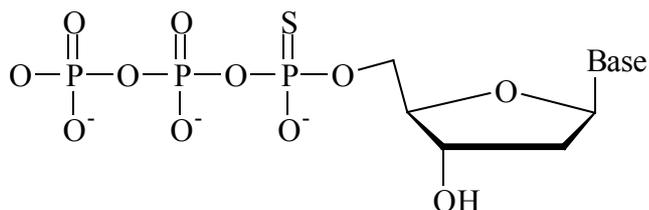


Abb. 5-19: Struktur der α -Thiodesoxynucleotide

Die modifizierten α -S-dNTPs werden von der Wildtyp-Taq-Polymerase nur schlecht eingebaut. In der PCR wird nur die Anwesenheit eines α -S-dNTPs toleriert, die Ausbeute wird aber schon dadurch stark herabgesetzt. PCR mit mehr als einem α -S-dNTP ist mit der Wildtyp-Taq-Polymerase nicht möglich. Es sollte hier mit der Primer Extension Reaktion getestet werden, ob durch die eingeführten Mutationen eine Verbesserung festzustellen war. Die Versuchsdurchführung erfolgte analog zu den Ribonucleotid-Versuchen.

Bei Anwesenheit nur eines, jeweils dem Template komplementären Nucleotides in der Reaktion sind nach 10 min Reaktionszeit keine Unterschiede in den Spektren von TAQ, TAQY, TAQF und TAQYF erkennbar. Alle Enzyme hatten den Primer zu 100 % um ein Nucleotid verlängert (s. Tab 5-7). Nach 25 Zyklen zeigt sich, daß bei den Enzymen TAQ, TAQY, TAQF und TAQYF sowie beim Kontrollenzym eine Template-unabhängige Verlängerung des Primers um ein zusätzliches α -S-dCTP stattfindet. Der Anteil dieser unspezifischen Inkorporation liegt bei TAQY mit ca. 25 % am höchsten. Bei TAQ und TAQY tritt dieser Effekt auch beim α -S-dATP auf. Bei TAQ liegt der Anteil des zusätzlich verlängerten Primers bei ca. 23 %, bei TAQY bei ca. 14 %. Beispielhaft sind in Abbildung 5-20 die Massenspektren von TAQY für die Reaktion mit α -S-dCTP dargestellt.

	+thioA	+2 thioA	+thioC	+2 thioC	+thioG	+2 thioG	+thioT
TAQ	100	--	100	--	100	--	100
	76,90±0,98	23,10±0,98	77,76±2,74	22,24±2,74	78,34±1,23	21,66±1,23	100
TAQY	100	--	100	--	100	--	100
	86,19±0,17	13,81±0,17	74,54±0,31	24,46±0,31	75,15±0,89	24,58±0,89	100
TAQF	100	--	100	--	100	--	100
	100	--	90,23±1,50	9,77±1,50	100	--	100
TAQYF	100	--	100	--	100	--	100
	100	--	87,74±0,11	12,26±0,11	100	--	100
TAQW	50,06±1,32	--	73,7±1,52	--	74,76±0,63	--	47,35±0,48
	100	--	100	--	100	--	100
TAQYW	40,06±0,50	--	69,42±0,86	--	53,82±0,75	--	48,17±1,19
	100	--	100	--	100	--	100
TAQH	--	--	44,33±1,40	--	24,34±1,35	--	--
	50,36±3,09	9,55±0,98	100	--	92,77±1,94	--	23,20±0,86
TAQYH	--	10,48±1,35	30,85±1,02	--	13,00±1,14	--	--
	33,02±3,15	17,87±1,19	100	--	85,53±1,48	--	30,01±3,64
Taq Pol (WT)	62,75±4,55	--	81,58±0,87	--	80,36±0,95	--	76,42±1,00
	100	--	89,66±2,17	10,34±2,17	100	--	100

Tab. 5-7: Ergebnisse der Primer-Extension-Reaktion mit jeweils einem α -S-dNTP; Anteil verlängerter Primer in %

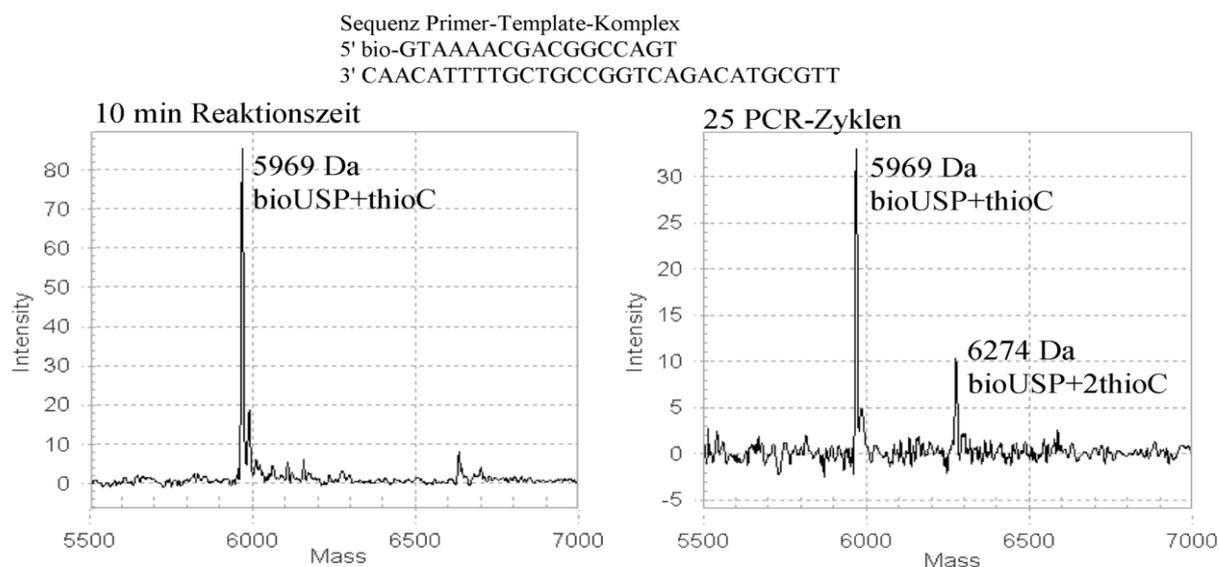


Abb. 5-20: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQY in Anwesenheit von α -S-dCTP. Massen der Peaks: bioUSP+thioC = 5969 Da; bioUSP+2 thioC = 6274 Da

Bei den Polymerasevarianten TAQW, TAQY, TAQH und TAQYH zeigte sich bei 10 min Reaktionszeit eine Bevorzugung von α -S-dGTP und α -S-dCTP. Insbesondere bei TAQH und TAQYH ist diese Bevorzugung ausgeprägt, denn α -S-dATP und α -S-dTTP werden während der einfachen, 10minütigen Reaktionszeit überhaupt nicht inkorporiert. In der PCR-analogen Reaktion sind TAQW und TAQYW in der Lage, den Primer mit jedem einzelnen der vier modifizierten Nukleotide vollständig umzusetzen. Nur bei TAQH und TAQYH ist noch unverlängerter Primer detektierbar. Hier zeigt sich wieder das Muster der Bevorzugung von C- und G-Nukleotiden, die zu je 100 % bzw. zu 85 – 90 % verlängert wurden, gegenüber A und T, bei denen der verlängerte Primer einen maximalen Anteil von 50 % am Produktgemisch hat. In Abbildung 5-21 sind die entsprechenden Spektren für die Reaktion von TAQYH mit α -S-dCTP dargestellt.

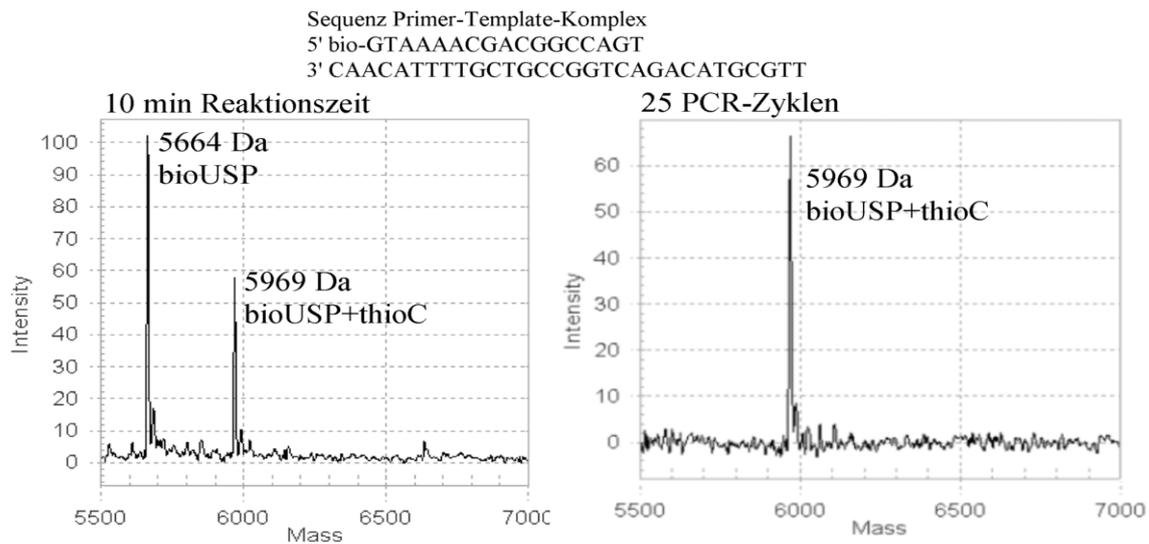


Abb. 5-21: : MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQYH in Anwesenheit von α -S-dCTP. Massen der Peaks: bioUSP+thioC = 5969 Da

Die zweite Versuchsreihe wurde analog zum Vorgehen bei den Desoxyribo- und den Ribonukleotiden konzipiert: Die Anzahl der Nukleotide wurde Template-entsprechend erhöht, bis eine vollständige Verlängerung des Primers um 10 Nukleotide möglich war.

Bei der Anwesenheit der ersten beiden Nukleotidsorten in der Reaktion können nur die Enzyme TAQ, TAQY, TAQF und TAQYF sowie die Wildtyp-Taq-Polymerase zu 100 % einen um vier Nukleotide verlängerten Primer als vollständiges Produkt erzeugen (s. Tab. 5-8, Abb. 5-22). Nach 25 Zyklen des Temperatur-Programmes ist bei diesen Enzymen nur noch der korrekt verlängerte Primer detektierbar; es treten keine zusätzlichen Verlängerungsprodukte auf. Bei 10 min Reaktionszeit kann von diesen Enzymen anteilig das vollständige Produkt erzeugt werden, allerdings sind in größeren Mengen Abbruchprodukte vorhanden, die beim vergleichbaren Experiment mit Desoxyribonukleotiden nicht auftraten (s. Kap. 5.4.1).

5 Hochdurchsatzanalyse modifizierter Taq-Polymerasen mittels MALDI-TOF-MS

		<i>bioUSP</i>	<i>+thioG</i>	<i>+thioGTG</i>	<i>+thioGTGT</i>
TAQ	10 min	--	11,08±0,79	28,94±0,79	59,99±0,60
	25 Zyklen	--	--	--	100
TAQY	10 min	--	--	15,47±0,69	84,53±0,69
	25 Zyklen	--	--	--	100
TAQF	10 min	14,41±3,13	38,45±1,79	22,56±0,34	24,58±3,13
	25 Zyklen	--	--	--	100
TAQYF	10 min	14,10±1,79	35,97±0,87	23,09±1,55	26,84±1,79
	25 Zyklen	--	--	--	100
TAQW	10 min	54,46±0,35	40,39±0,35	5,15±1,36	--
	25 Zyklen	--	26,17±2,23	40,02±2,23	33,81±0,37
TAQYW	10 min	74,39±0,34	25,61±0,34	--	--
	25 Zyklen	--	20,53±3,83	40,27±3,83	39,20±4,56
TAQH	10 min	84,24±0,58	15,73±0,58	--	--
	25 Zyklen	12,45±1,54	87,55±1,54	--	--
TAQYH	10 min	100	--	--	--
	25 Zyklen	30,92±2,74	69,08±2,74	--	--
Taq Pol (WT)	10 min	61,97±2,29	21,04±0,74	--	16,99±0,29
	25 Zyklen	--	--	--	100

Tab. 5-8: Ergebnisse der Primer-Extension-Reaktion mit α -S-dGTP und α -S-dTTP. Die korrekte Verlängerungssequenz ist GTGT. Der Anteil der einzelnen Produkte ist in % angegeben.

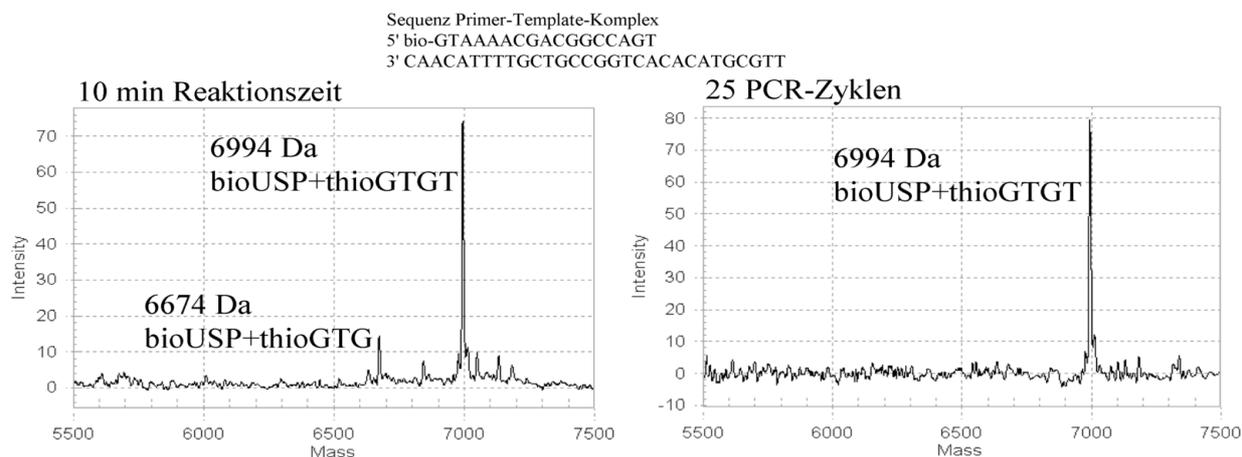


Abb. 5-22: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQY in Anwesenheit von α -S-dGTP und α -S-dTTP. Massen der Peaks: *bioUSP+thioGTG* = 6674 Da; *bioUSP+thioGTGT* = 6994 Da

Von den übrigen Enzymen waren nur TAQW und TAQYW in der Lage nach 25 PCR-Zyklen anteilig ein vollständiges Produkt zu erzeugen (s. Abb. 5-23); bei TAQH und TAQYH lief die Reaktion nicht über die Inkorporation eines α -S-dGTPs hinaus.

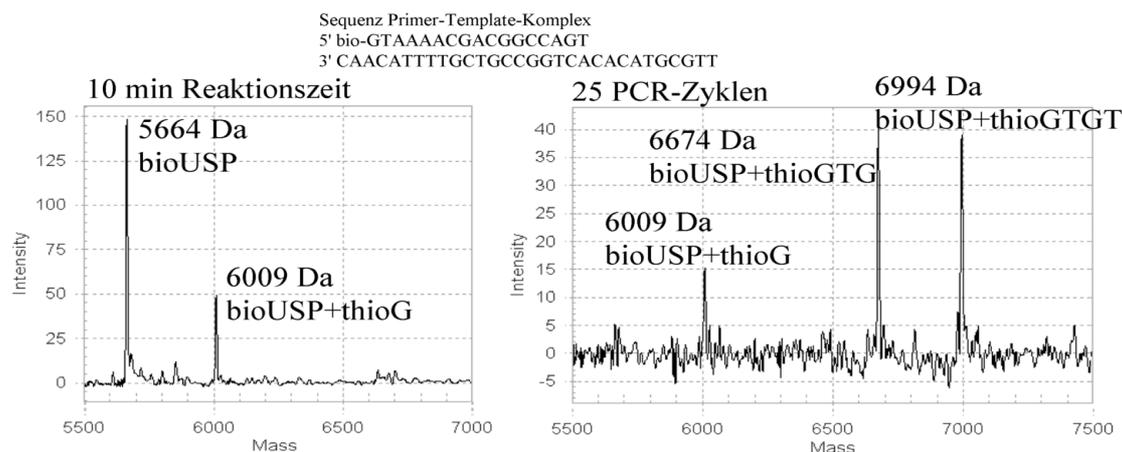


Abb. 5-23: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQYW in Anwesenheit von α -S-dGTP und α -S-dTTP. Massen der Peaks: bioUSP = 5664 Da; bioUSP+thioG = 6009 Da; bioUSP+thioGTG = 6674 Da; bioUSP+thioGTGT = 6994 Da

Bei Anwesenheit von drei Nukleotidsorten, nämlich α -S-dGTP, α -S-dTTP und α -S-dATP, bietet sich ein ähnliches Bild (s. Tab. 5-9). Auch hier sind TAQ, TAQY, TAQF und TAQYF die Wildtyp-Taq-Polymerase in der Lage den Primer quantitativ um fünf Nukleotide zu verlängern. Nach 25 PCR-Zyklen ist nur noch das korrekte Produkt detektierbar. Bei einer Reaktionszeit von 10 min dagegen nimmt das Endprodukt nur einen Anteil unter verschiedenen Nebenprodukten ein (s. Abb. 5-24).

Von den übrigen Enzymen ist lediglich TAQW (s. Abb. 5-25) in der Lage, den Primer vollständig um fünf Nukleotide zu verlängern. Dies geschieht aber erst nach 25 PCR-Zyklen und nur zu etwa 10 %. Dabei ist auffällig, daß der Peak bei 6674 Da für den um die Sequenz GTG verlängerten Primer in einen Doppelpeak aufgespalten ist. Die Massendifferenz beträgt 16 Da. Offensichtlich ist bei dieser Versuchsreihe die α -S-dTTP-Lösung mit unmodifiziertem dTTP verunreinigt gewesen, das ebenfalls von der Polymerase inkorporiert wurde. Die Peaks für den um die Sequenz GTGT und GTGTA verlängerten Primer sind jeweils in drei Peaks aufgespalten. Dies ergibt sich dadurch, daß in diesen Fällen an zwei Positionen dTTP bzw. α -S-dTTP eingebaut werden kann. So ergeben sich drei mögliche Kombinationen für die Besetzung der beiden Positionen mit jeweils unterschiedlichen Massen.

TAQH und TAQYH können wieder lediglich ein Nukleotid Template-abhängig einbauen. Innerhalb der einfachen Reaktionszeit ohne zyklischen Temperaturverlauf findet gar keine Reaktion statt. Die bei den Desoxyribonukleotiden häufig auftretenden Fehleinbauten bei Reaktion mit einem unvoll-

ständigen Satz an Nukleotiden treten hier nicht auf.

		bioUSP	+thioG	+thioGTG	+thioGTGT	+thioGTGTA
TAQ	10 min	18,22±3,32	40,02±1,37	21,73±4,49	--	20,03±3,32
	25 Zyklen	--	--	--	--	100
TAQY	10 min	10,09±1,77	27,92±3,03	30,36±2,50	4,66±0,69	26,97±1,77
	25 Zyklen	--	--	--	--	100
TAQF	10 min	46,38±2,45	34,79±2,31	6,57±1,13	--	12,26±2,45
	25 Zyklen	--	--	--	--	100
TAQYF	10 min	45,43±1,44	34,04±0,96	6,64±0,62	--	13,89±1,44
	25 Zyklen	--	--	--	--	100
TAQW	10 min	75,03±0,72	24,98±0,72	--	--	--
	25 Zyklen	--	44,00±5,32	36,22±5,32	10,09±3,54	9,70±3,90
TAQYW	10 min	85,33±0,87	14,67±0,87	--	--	--
	25 Zyklen	14,78±3,01	40,76±3,01	44,46±0,54	--	--
TAQH	10 min	100	--	--	--	--
	25 Zyklen	21,43±1,92	78,58±1,92	--	--	--
TAQYH	10 Zyklen	100	--	--	--	--
	25 Zyklen	51,35±2,50	48,65±2,56	--	--	--
Taq Pol (WT)	10 min	75,50±2,36	8,79±2,36	4,63±1,37	--	11,08±2,42
	25 Zyklen	--	--	--	--	100

Tab. 5-9: Ergebnisse der Primer-Extension-Reaktion mit α -S-dGTP, α -S-dTTP und α -S-dATP. Die korrekte Verlängerungssequenz ist GTGTA. Der Anteil der einzelnen Produkte ist in % angegeben.

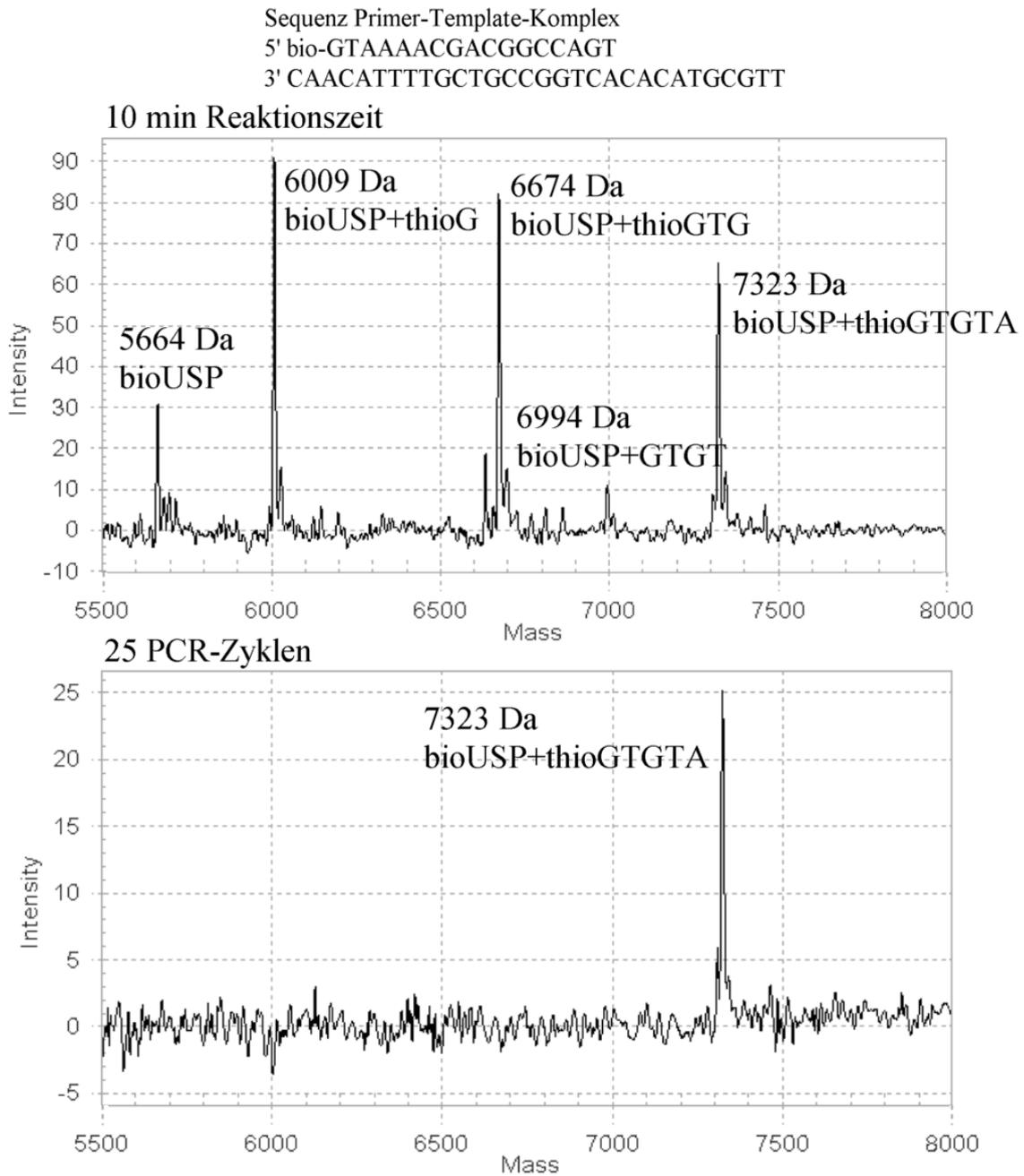


Abb. 5-24: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQY in Anwesenheit von α -S-dGTP, α -S-dTTP und α -S-dATP. Massen der Peaks: bioUSP = 5664 Da; bioUSP+thioG = 6009 Da; bioUSP+thioGTG = 6674 Da; bioUSP+thioGTGT = 6994 Da, bioUSP+thioGTGTA = 7323 Da

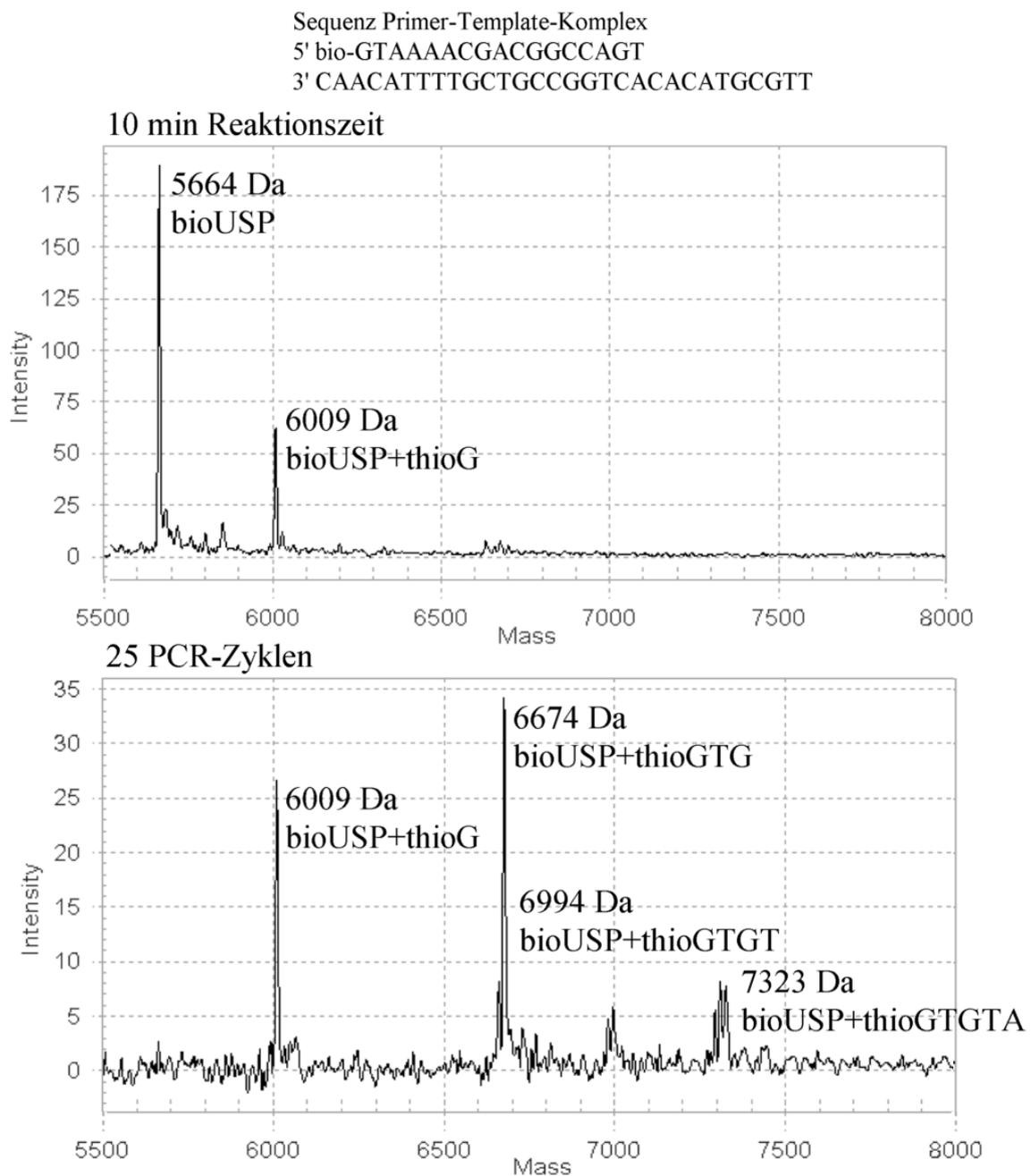


Abb. 5-25: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQW in Anwesenheit von α -S-dGTP, α -S-dTTP und α -S-dATP. Massen der Peaks: bioUSP = 5664 Da; bioUSP+thioG = 6009 Da; bioUSP+thioGTGT = 6994 Da, bioUSP+thioGTGTA = 7323 Da

Bei Anwesenheit aller vier Nukleotide können nur noch TAQ, TAQY und TAQF die Wildtyp-Taq-Polymerase den um die vollständige Sequenz verlängerten Primer als Produkt erzeugen. Bei TAQ und TAQY sind es nach 25 Temperatur-Zyklen noch ca. 70 %, bei TAQF ca. 6 % (s. Tab. 5-10). Dabei ist nur noch der um ein α -S-dGTP verlängerte Primer als Zwischenprodukt detektierbar. Nach 10 min Reaktionszeit ist dies das einzige Produkt (s. Abb. 5-26). Auffällig ist auch hier die dreifache Aufspaltung des Peaks für das vollständige Produkt, die durch die Anwesenheit von unmodifiziertem dTTP verursacht wird.

Bei TAQF und TAQYF findet innerhalb der 10 minütigen Reaktionszeit keine Verlängerung des Primers statt. In den Spektren kann lediglich unverlängerter bioUSP detektiert werden. Nach 25 Zyklen findet man bei beiden ein um ein Adenosin verkürztes Produkt, bei TAQF darüber hinaus einen geringen Anteil des vollständigen Produkts von ca. 6 % (s. Abb. 5-27).

Bei den übrigen Enzymen finden nur unvollständige Reaktionen statt. TAQW und TAQYW erzeugen nach 25 Temperatur-Zyklen einen um nur drei Nukleotide verlängerten Primer als Endprodukt mit einem Anteil von ca. 20 % des eingesetzten Primers, bei TAQH und TAQYH kann dagegen nur der mit einem Nukleotid verlängerte Primer mit einem Anteil von 50 % bzw. 22 % detektiert werden. An den Produktspektren der Wildtyp-Taq-Polymerase ist beim PCR-analogen Temperaturprogramm die große Anzahl der Zwischenprodukte auffällig (s. Abb. 5-28). Die größeren Anteile stellen der bioUSP (ca. 18 %), der bioUSP+thioGTG (ca. 21 %), der um sieben Nukleotide verlängerte bioUSP (ca. 18 %) und der um neun Nukleotide verlängerte bioUSP mit ca. 22 % dar. Das vollständige Produkt nimmt dagegen nur einen kleinen Anteil von ca. 4 % ein. Auch hier ist die schon oben angesprochene Aufspaltung der Peaks höherer Masse deutlich zu erkennen.

		bioUSP	+thioG	+thioGTG	+thioGTGT vollst. Produkt	-thioCAA vollst. Produkt	-thioA vollst. Produkt
TAQ	10 min	82,85±1,81	17,16±1,81	--	--	--	--
	25 Zyklen	12,94±3,49	16,59±2,81	--	--	--	70,48±3,49
TAQY	10 min	72,19±1,81	27,81±1,81	--	--	--	--
	25 Zyklen	--	31,23±5,54	--	--	--	68,77±5,54
TAQF	10 min	100	--	--	--	--	--
	25 Zyklen	44,90±2,87	21,64±1,18	11,13±5,23	--	15,92±3,45	6,41±2,87
TAQYF	10 min	100	--	--	--	--	--
	25 Zyklen	50,74±0,32	22,97±0,32	--	--	26,79±1,03	--
TAQW	10 min	83,68±1,42	16,33±1,42	--	--	--	--
	25 Zyklen	13,71±2,82	66,74±2,82	19,55±0,03	--	--	--
TAQYW	10 min	100	--	--	--	--	--
	25 Zyklen	22,27±1,44	58,12±1,44	19,61±2,86	--	--	--
TAQH	10 min	100	--	--	--	--	--
	25 Zyklen	49,81±2,23	50,19±2,23	--	--	--	--
TAQYH	10 Zyklen	100	--	--	--	--	--
	25 Zyklen	78,03±0,66	21,97±0,66	--	--	--	--
Taq Pol (WT)	10 min	100	--	--	--	--	--
	25 Zyklen	18,60±5,09	7,15±4,75	21,34±3,04	9,76±2,38	18,60±5,26	22,59±5,49
							4,30±3,15

Tab. 5-10: Ergebnisse der Primer-Extension-Reaktion mit allen vier α -S-dNTPs. Der Anteil der einzelnen Produkte ist in % angegeben.

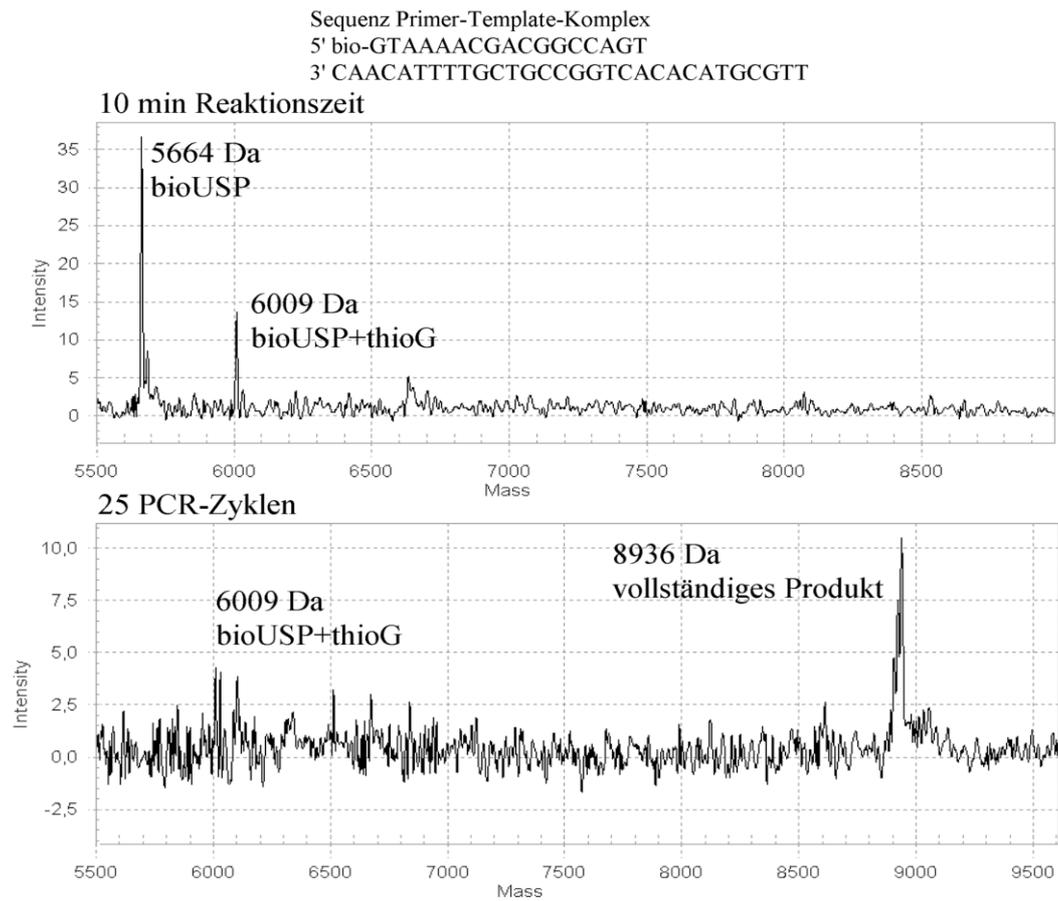


Abb. 5-26: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQY in Anwesenheit aller vier α -S-dNTPs. Massen der Peaks: bioUSP = 5664 Da; bioUSP+thioG = 6009 Da; vollständiges Produkt = 8936 Da

5 Hochdurchsatzanalyse modifizierter Taq-Polymerasen mittels MALDI-TOF-MS

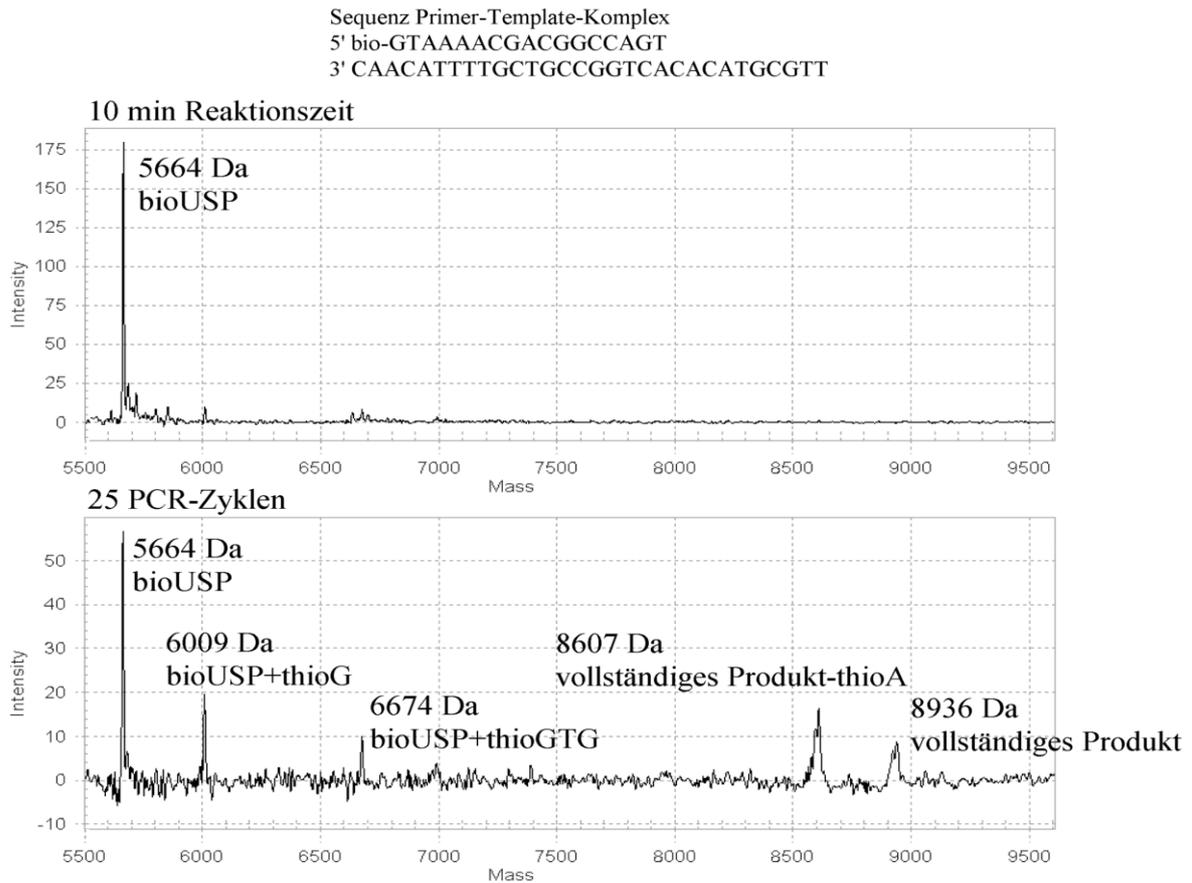


Abb. 5-27: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQF in Anwesenheit aller vier α -S-dNTPs. Massen der Peaks: bioUSP = 5664 Da; bioUSP+thioG = 6009 Da; bioUSP+thioGTG = 6674 Da; vollständiges Produkt –thioA = 8607 Da; vollständiges Produkt = 8936 Da

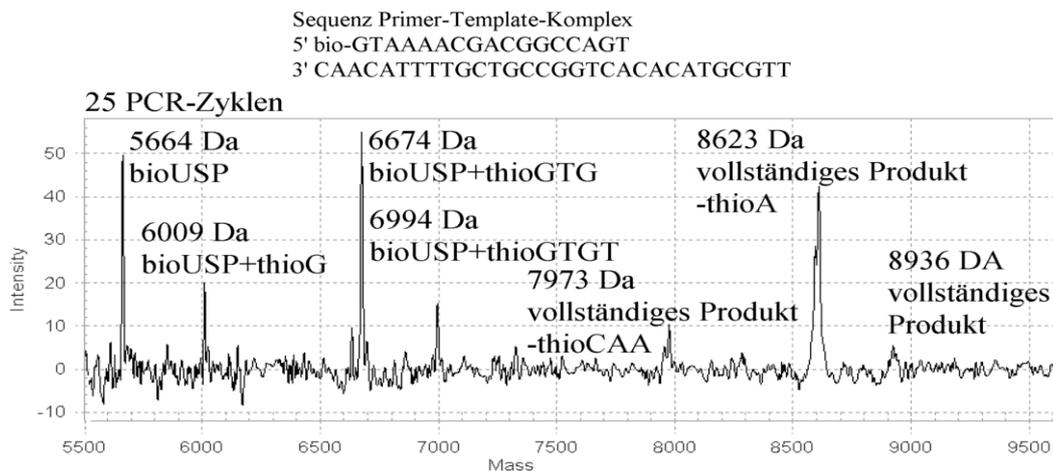


Abb. 5-28: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für Wildtyp-Taq-Polymerase in Anwesenheit aller vier α -S-dNTPs. Massen der Peaks: bioUSP = 5664 Da; bioUSP+thioG = 6009 Da; bioUSP+thioGTG = 6674 Da; bioUSP+thioGTGT = 6994 Da; vollständiges Produkt –thioCAA = 7973 Da; vollständiges Produkt-thioA = 8623 Da, vollständiges Produkt = 8936 Da

Zusammenfassend lassen sich ähnlich wie bei den nativen dNTPs die Polymerasevarianten in mehrere Gruppen einteilen:

- vollständige Primer-Extension um 10 α -S-dNTPs

Von den Polymerasevarianten sind lediglich TAQ, TAQY und TAQF in der Lage den Primer vollständig zu verlängern. Dies geschieht jedoch nur beim Durchlaufen des zyklisierten Temperaturprogrammes mit der Möglichkeit zur wiederholten Neubildung eines Reaktionskomplexes. Während der einfachen Reaktionszeit findet durch TAQ und TAQY eine anteilige Verlängerung um ein Nukleotid statt, bei TAQF ist nur unverlängerter Primer detektierbar.

- Primer-Extension um bis zu 5 α -S-dNTPs

Hierzu sind TAQYF und TAQW in der Lage. Bei TAQYF erfolgt eine 100 %ige Verlängerung des Primers um fünf α -S-dNTPs innerhalb des zyklisierten Temperaturprogrammes. TAQW erzeugt unter diesen Bedingungen lediglich ca. 10 % des korrekten Produktes.

- Primer-Extension um bis zu 4 α -S-dNTPs

TAQYW kann den Primer zu ca. 40 % um vier Nukleotide verlängern. Auch hier geschieht das nur mit Hilfe der PCR-analogen Temperaturbedingungen.

- Primer-Extension um 1 α -S-dNTP

Bei TAQH und TAQYH läuft die Reaktion unter allen verwendeten Bedingungen nicht über den Einbau des ersten α -S-dNTPs hinaus.

Auffällig ist bei allen Polymerasevarianten, daß in Reaktionen mit mehr als einer Nukleotidsorte grundsätzlich die zyklisierten Temperaturbedingungen notwendig sind, um ein vollständiges Reaktionsprodukt zu erhalten. Die Möglichkeit zur wiederholten Neubildung des Reaktionskomplexes erhöht offensichtlich die Ausbeute. Außerdem ist die hohe Anzahl und Menge unvollständiger Produkte auffällig, die in großem Ausmaß auch beim Wildtypenzym auftreten. Insbesondere sind der um ein Nukleotid und der um neun Nukleotide verlängerte Primer zu nennen. Insgesamt scheint die Reaktionsrate durch die Verwendung der α -S-dNTPs stark verlangsamt zu sein.

5.4.4 Weitere modifizierte Nukleotide

Die Primer-Extension-Reaktion diente weiterhin zur Untersuchung der Inkorporation modifizierter Nukleotide. Dabei handelt es sich um Nukleotidsorten, die innerhalb der Arbeitsgruppe im Rahmen des BMBF Projektes 0311 747 "Entwicklungen zum Einsatz der MALDI-MS in der genomischen Analyse und Diagnostik" synthetisiert wurden, und um kommerziell erhältliche. Von diesen Modifikationen wird erwartet, daß sie eine stabilisierende Wirkung auf die DNA-Analytmoleküle unter den Bedingungen der MALDI-TOF-Massenspektrometrie ausüben und ihnen daher eine Bedeutung für die Anwendbarkeit und Verbreitung der massenspektrometrischen DNA-Analyse zukommt.

Für diese Versuche wurde jeweils nur das modifizierte Nukleotid als Substrat zugegeben. Das Template wurde dabei so gewählt, daß das erste einzubauende Nukleotid das modifizierte war (vgl. Abb. 5-1). Alle Reaktionen wurden in zwei Reihen durchgeführt: einmal wurde die einfache Reaktionszeit von 10 Minuten angewandt und einmal das PCR-Programm mit 25 Zyklen.

5.4.4.1 2'-Desoxy-7,9-Dideaza-7-oxoadenosin-5'-triphosphat (dA*TP)

Diese Nukleotidmodifikation wurde innerhalb der Arbeitsgruppe synthetisiert⁷³. Sie soll in DNA-Fragmenten für die MALDI-TOF-MS-Analyse das natürliche dATP ersetzen (s. Abb. 5-29). Durch den Austausch der säurelabilen N-glykosidischen Bindung zwischen Purinbase und Zucker gegen die stabilere C-glykosidische Bindung werden Depurinierungsreaktionen während der massenspektrometrischen Untersuchung verhindert und so das Auflösungsvermögen, insbesondere bei steigender Länge der zu untersuchenden DNA-Fragmente, verbessert und der Längenbereich der analysierbaren Fragmente erweitert. Mit der Substitution des N7-Stickstoffatoms durch ein Sauerstoffatom wird im Gegensatz zu den herkömmlichen c^7 -Purinnukleotiden in dieser Position eine Wasserstoffakzeptorfunktion erhalten. Dadurch sollen spezifische Wechselwirkungen mit Restriktionsendonukleasen aufrechterhalten und die modifizierte DNA enzymatischen Reaktionen zugänglich bleiben.

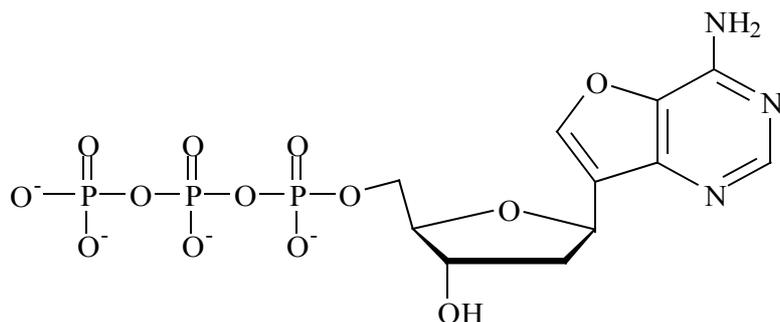


Abb. 5-29: 2'-Desoxy-7,9-Dideaza-7-oxoadenosin-5'-triphosphat (*dA*TP*)

Die Ergebnisse der Primer-Extension-Reaktion mit diesem modifizierten Nukleotid ermöglichen eine Unterteilung der Polymerasevarianten in drei Gruppen. In der ersten Gruppe verlängern TAQ und TAQY den Primer innerhalb von 10 min vollständig um ein modifiziertes Adenosin (s. Tab. 5-11). Nach 25 Temperaturzyklen tritt in Anteilen von 16 – 19 % eine unspezifische Verlängerung um ein zweites modifiziertes Adenosin auf. Diese zusätzliche Inkorporation bildet mit dem Template eine A:A-Fehlpaarung. Eine weitere Verlängerung findet nicht statt (s. Abb. 5-30).

		<i>bioUSP</i>	<i>+dA*TP</i>	<i>+2 dA*TP</i>
TAQ	10 min	--	100	--
	25 Zyklen	--	83,89±1,74	16,11±1,74
TAQY	10 min	--	100	--
	25 Zyklen	--	80,98±1,74	19,02±1,74
TAQF	10 min	14,77±1,49	85,23±1,49	--
	25 Zyklen	--	100	--
TAQYF	10 min	12,28±2,33	87,72±2,33	--
	25 Zyklen	--	100	--
TAQW	10 min	47,64±0,74	52,36±0,74	--
	25 Zyklen	--	100	--
TAQYW	10 min	53,95±1,99	46,05±1,99	--
	25 Zyklen	--	100	--
TAQH	10 min	100	--	--
	25 Zyklen	22,91±1,67	77,09±1,67	--
TAQYH	10 min	100	--	--
	25 Zyklen	43,99±2,88	56,01±2,88	--
Taq Pol (WT)	10 min	43,15±2,11	56,85±2,11	--
	25 Zyklen	--	100	--

Tab. 5-11: Ergebnisse der Primer-Extension-Reaktion mit *dA*TP*. Der Anteil der einzelnen Produkte ist in % angegeben.

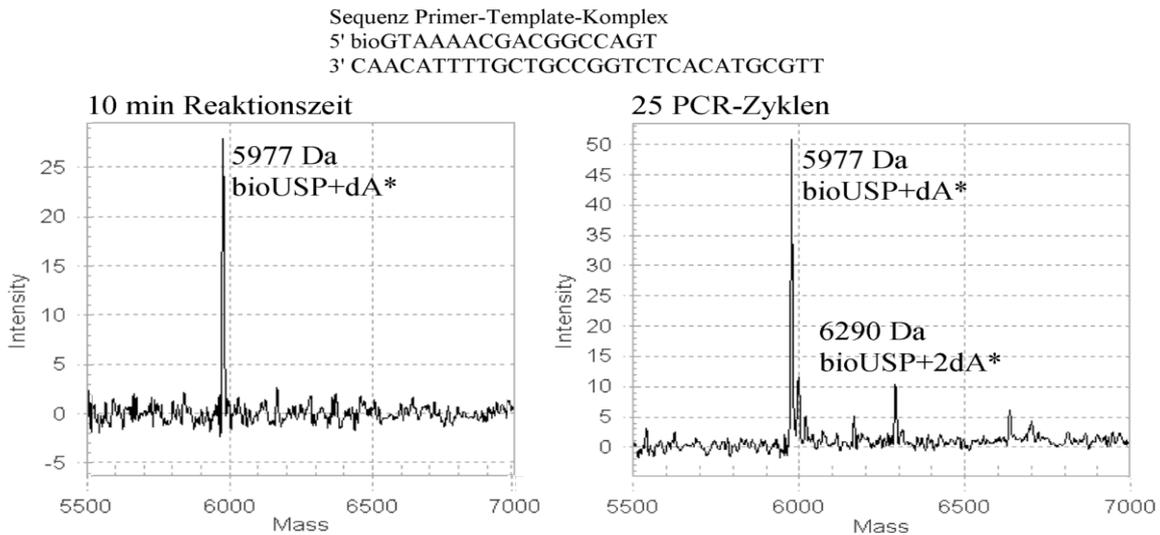


Abb. 5-30: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQY in Anwesenheit von dA^*TP . Massen der Peaks: $bioUSP+dA^* = 5977 Da$; $bioUSP+2 dA^* = 6290 Da$

Die Polymerasemutanten TAQF, TAQYF, TAQW und TAQYW bilden die zweite Gruppe und können den Primer erst nach Durchlaufen von 25 Zyklen des Temperaturprogramms vollständig um ein modifiziertes Adenosin verlängern (s. Abb. 5-31). Nach 10 min einfacher Reaktionszeit ist die Verlängerung unvollständig und liegt bei ca. 80 % für TAQF und TAQYF und bei ca. 50 % für TAQW und TAQYW. Dieser Unterschied spiegelt die abnehmende spezifische Aktivität der verschiedenen Polymerasevarianten wieder. Die Anwendung des zyklisierten Temperaturprogrammes wirkt dabei ausgleichend.

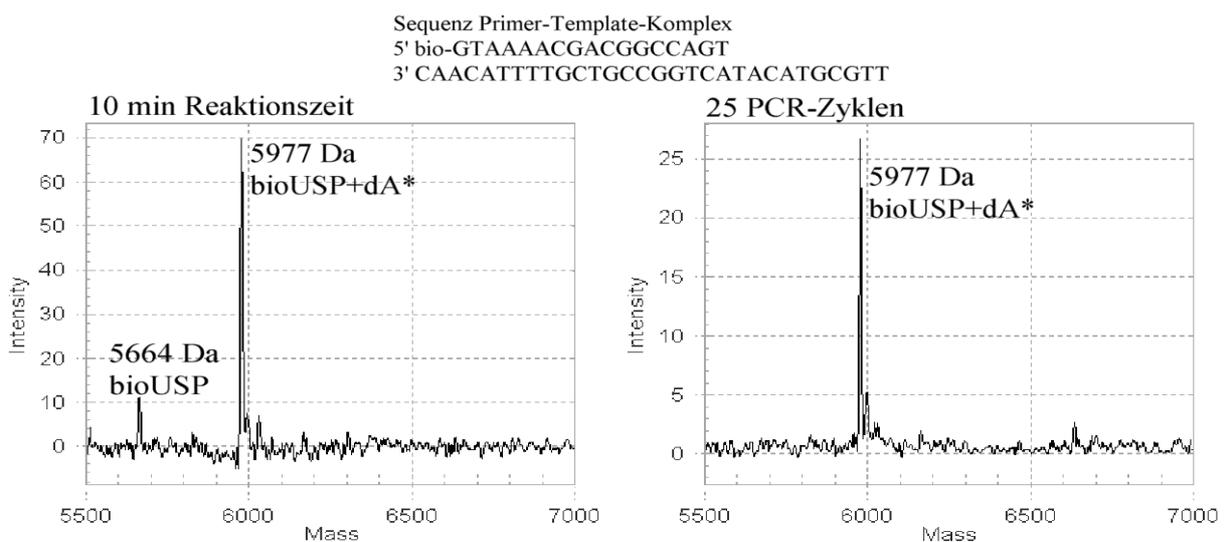


Abb. 5-31: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQYF in Anwesenheit von dA^*TP . Massen der Peaks: $bioUSP = 5664 Da$; $bioUSP+dA^* = 5977 Da$

In der dritten Gruppe, die TAQH und TAQYH enthält, ist der Primer erst nach 25 Reaktionszyklen anteilig verlängert worden, nach 10 min ohne wiederholte Möglichkeit zur Neubildung des Reaktionskomplexes ist lediglich unverlängerter bioUSP detektierbar. Die Wildtyp-Taq-Polymerase ist im Vergleich am ehesten bei TAQW und TAQYW einzuordnen. Die einzelnen Mutationen bewirken offensichtlich keine Verbesserung der Inkorporation, da auch die Variante TAQ, die in der O-Helix die Wildtypsequenz trägt, einen besseren Einbau des dA*TP zeigt.

5.4.4.2 5-Hydroxy-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat (OH-dCTP)

OH-dCTP ist eine kommerziell erhältliche Modifikation des Nucleotids dCTP (s. Abb. 5-32). Es trägt an Position 5 der Base eine zusätzliche Hydroxygruppe¹⁰². Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde dieses Molekül zusammen mit α -S-dCTP zum Massenausgleich in der Reversen Sanger Sequenzierung verwendet²⁰, um Masseninhomogenitäten bei Fragmenten mit unterschiedlicher Zahl inkorporierter α -S-Nucleotide zu vermeiden.

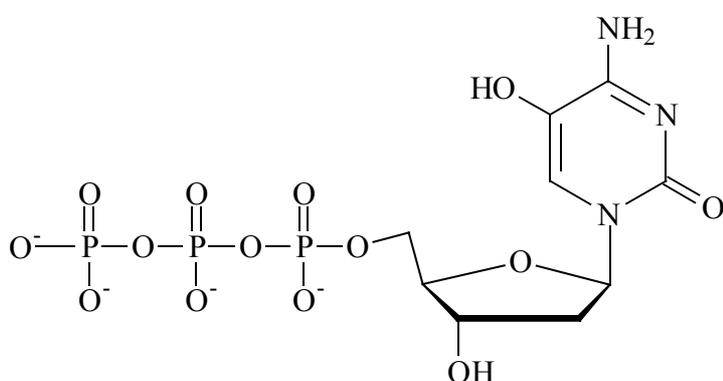


Abb. 5-32: 5-Hydroxy-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat (OH-dCTP)

Bei der Auswertung der Massenspektren konnte gezeigt werden, daß die vom Hersteller gelieferte Lösung nicht zu 100 % aus OH-dCTP bestand. In allen Spektren waren die Peaks der verlängerten Primer in zwei Peaks aufgespalten. Neben dem Peak mit der korrekten Masse war jeweils ein weiterer Peak detektierbar, dessen Masse um 32 Da größer war. Worum es sich bei dieser Verunreinigung handelt, konnte nicht ermittelt werden. Wahrscheinlich ist es ein Zwischenprodukt der Synthe-

se, das von den Polymerasen ähnlich gut eingebaut wird wie OH-dCTP. Bei der quantitativen Auswertung wurden diese Produkte vernachlässigt.

		<i>bioUSP</i>	<i>+OH-dCTP</i>	<i>+2 OH-dCTP</i>
TAQ	10 min	--	100	--
	25 Zyklen	--	55,26±2,46	44,74±2,46
TAQY	10 min	--	100	--
	25 Zyklen	--	52,03±1,49	47,97±1,49
TAQF	10 min	--	100	--
	25 Zyklen	--	60,69±1,94	39,31±1,94
TAQYF	10 min	--	100	--
	25 Zyklen	--	64,17±3,17	35,83±3,17
TAQW	10 min	10,04±4,67	89,96±4,67	--
	25 Zyklen	--	65,43±1,57	34,58±1,57
TAQYW	10 min	7,89±3,29	92,11±3,29	--
	25 Zyklen	--	59,00±2,21	41,00±2,21
TAQH	10 min	32,60±1,42	67,40±1,42	--
	25 Zyklen	--	100	--
TAQYH	10 min	60,46±1,73	39,54±1,73	--
	25 Zyklen	--	100	--
Taq Pol (WT)	10 min	12,02±2,69	87,98±2,69	--
	25 Zyklen	--	66,87±1,08	33,13±1,08

Tab. 5-12: Ergebnisse der Primer-Extension-Reaktion mit OH-dCTP. Der Anteil der einzelnen Produkte ist in % angegeben.

Das Erscheinungsbild der Produktspektren ist in diesem Fall recht einheitlich. Bei fast allen Varianten findet eine komplette Verlängerung des Primers innerhalb von 10 min einfacher Reaktionszeit statt. Bei der Anwendung des PCR-analogen Temperaturprogrammes ist sogar eine unspezifische Verlängerung um ein weiteres Nukleotid detektierbar (s. Abb. 5-33). Das Mengenverhältnis der Produkte ist dabei immer ähnlich. Eine Ausnahme bilden hier TAQH und TAQYH, bei denen nach 10 min noch größere Mengen unverlängerten Primers detektiert werden können (s. Tab. 5-12, s. Abb. 5-34). Dabei hat die Polymerase TAQH mit der einzelnen Mutation im Vergleich zu TAQYH noch eine deutlich erhöhte Aktivität, deren Auswirkung durch das zyklische Temperaturprogramm aber nivelliert wird.

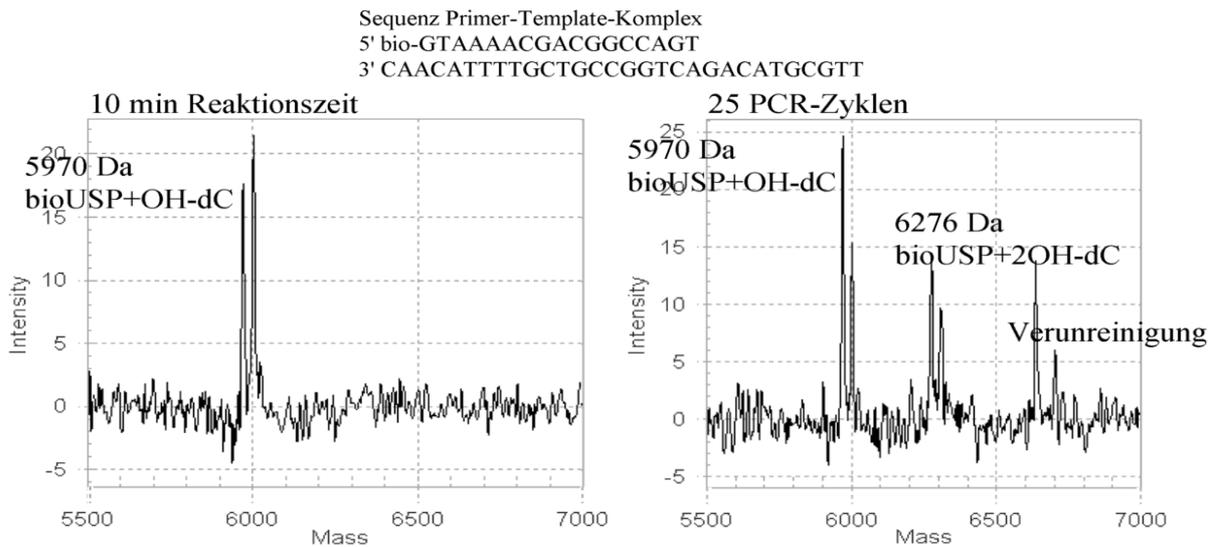


Abb. 5-33: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQYF in Anwesenheit von OH-dCTP. Massen der Peaks: bioUSP+OH-dC = 5969 Da; bioUSP+2 OH-dC = 6274 Da. Die Peaks liegen jeweils als Doppelpeaks mit einer Massendifferenz von 32 Da vor. Speziell im zweiten Spektrum sind weitere Signale enthalten, die keiner Kombination der beiden Bestandteile der Lösung zugeordnet werden können. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um eine Kontamination der Streptavidin-Beads.

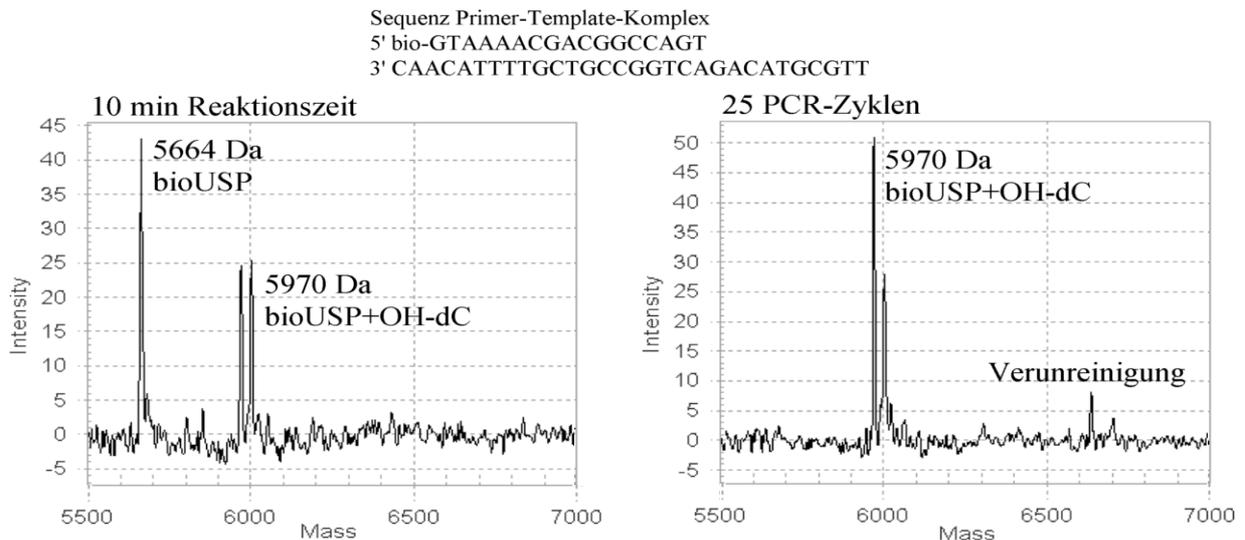


Abb. 5-34: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQYH in Anwesenheit von OH-dCTP. Massen der Peaks: bioUSP+OH-dC = 5969 Da. Die Peaks liegen jeweils als Doppelpeaks mit einer Massendifferenz von 32 Da vor.

Eine wesentliche Verbesserung der Inkorporationsrate modifizierter Nukleotide gegenüber der Wildtyppolymerase wurde durch die Mutationen nicht erreicht.

5.4.4.3 2-Thio-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat (S-dCTP)

S-dCTP¹⁰³ ist ebenfalls eine Modifikation des Nukleotids dCTP und wurde wie OH-dCTP als Massenausgleich in der Reversen Sanger Sequenzierung verwendet. Der Carbonylsauerstoff an Position 2 ist hier durch ein Schwefelatom substituiert (s. Abb. 5-35).

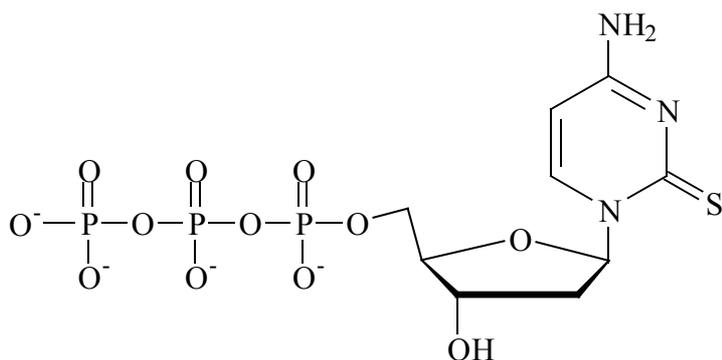


Abb. 5-35: 2-Thio-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat (S-dCTP)

Auch hier sind die Polymerasevarianten TAQ, TAQY, TAQF und TAQYF in der Lage, den Primer innerhalb von 10 min vollständig zu verlängern (s. Abb. 5-36). Nach 25 Zyklen tritt außerdem in sehr geringen Mengen der unspezifische Einbau eines zusätzlichen S-dCTPs auf (s. Tab. 5-13). Die Verteilung der Produkte ist bei allen vier Enzymen ähnlich. Die in die Polymerasen eingeführten Mutationen haben also keinen Einfluß auf die Inkorporation der Nukleotidmodifikation S-dCTP.

Bei den übrigen vier Varianten ist die Reaktionsfähigkeit geringer, es findet kein unspezifischer Einbau des S-dCTPs statt (s. Abb. 5-37). Auffällig sind hier die Spektren der Wildtyp-Taq-Polymerase: Innerhalb von 10 min Reaktionszeit wird der Primer nur zu ca. 28 % verlängert, die Reaktionsfähigkeit mit S-dCTP ist offensichtlich im Vergleich zu den verkürzten Polymerasevarianten verringert, was schon beim Einbau des modifizierten Nukleotids dA*TP beobachtet werden konnte.

5 Hochdurchsatzanalyse modifizierter Taq-Polymerasen mittels MALDI-TOF-MS

		<i>bioUSP</i>	+ <i>S-dCTP</i>	+2 <i>S-dCTP</i>
TAQ	10 min	--	100	--
	25 Zyklen	--	89,42±3,89	10,58±3,89
TAQY	10 min	--	100	--
	25 Zyklen	--	89,17±1,78	10,83±1,78
TAQF	10 min	--	100	--
	25 Zyklen	--	93,63±1,87	6,37±1,82
TAQYF	10 min	--	100	--
	25 Zyklen	--	92,17±1,76	7,29±1,76
TAQW	10 min	66,89±2,77	33,11±2,77	--
	25 Zyklen	--	100	--
TAQYW	10 min	57,20±3,32	42,80±2,32	--
	25 Zyklen	--	100	--
TAQH	10 min	67,67±3,19	32,33±3,19	--
	25 Zyklen	--	100	--
TAQYH	10 min	80,34±0,88	19,66±0,88	--
	25 Zyklen	--	100	--
Taq Pol (WT)	10 min	72,46±2,21	27,54±2,21	--
	25 Zyklen	--	93,14±1,77	6,87±1,77

Tab. 5-13: Ergebnisse der Primer-Extension-Reaktion mit *S-dCTP*. Der Anteil der einzelnen Produkte ist in % angegeben.

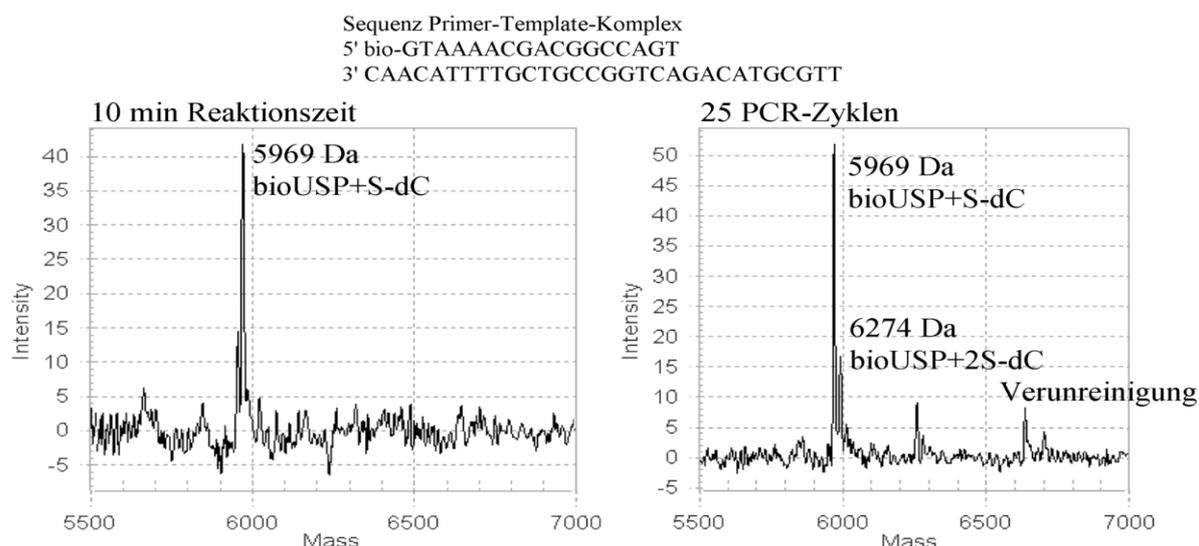


Abb. 5-36: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQYF in Anwesenheit von *S-dCTP*. Massen der Peaks: *bioUSP+S-dC* = 5969 Da; *bioUSP+ 2S-dC* = 5969 Da.

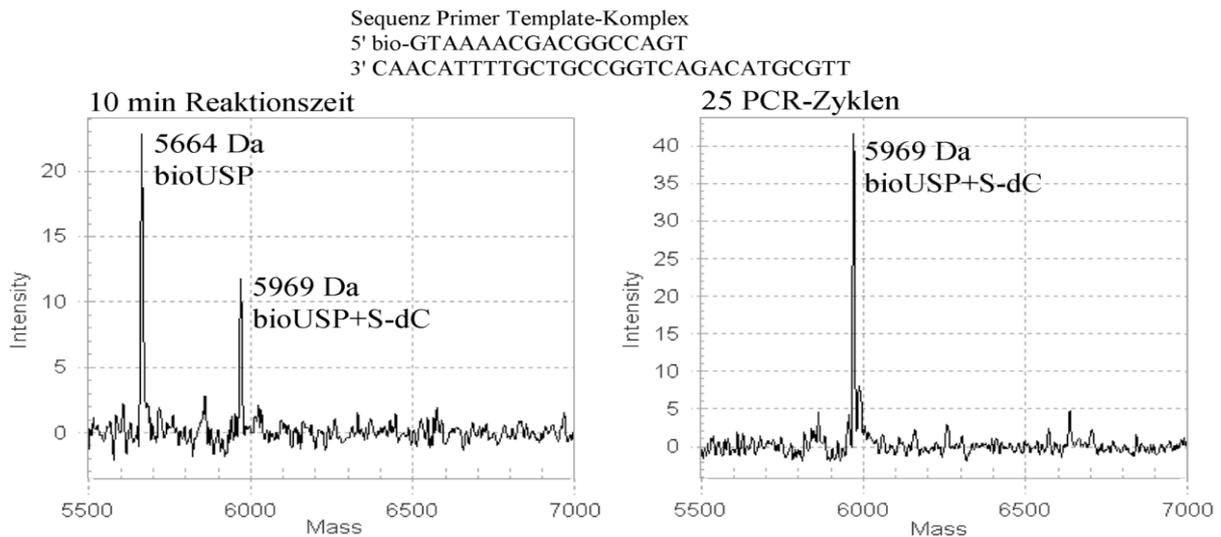


Abb. 5-37: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQW in Anwesenheit von S-dCTP. Massen der Peaks: bioUSP = 5664 Da; bioUSP+S-dC = 5969 Da

5.4.4.4 2-Thio-2'-desoxythymidin-5'-triphosphat (S-dTTP)

S-dTTP ist eine Modifikation des Nukleotids dTTP. Wie bei S-dCTP wurde der Carbonylsauerstoff an Position 2 durch ein Schwefelatom substituiert. Die Anwendung war identisch mit der für OH-dCTP und S-dCTP.

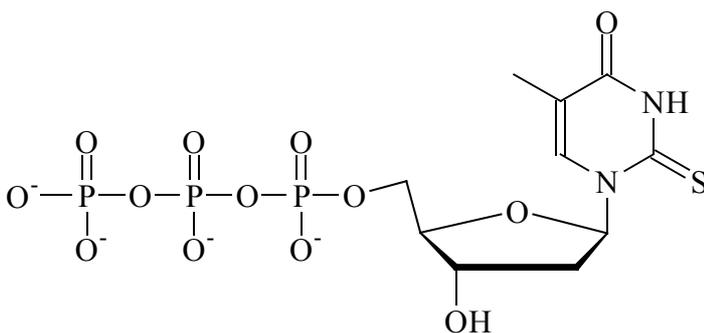


Abb. 5-38: 2-Thio-2'-desoxythymidin-5'-triphosphat (S-dTTP)

Für die Reaktion mit S-dTTP zeigen sich so gut wie keine Unterschiede zwischen den einzelnen Polymerasen. Bis auf TAQH und TAQYH sind alle in der Lage, innerhalb von 10 min den Primer zu 100 % um das modifizierte Nukleotid zu verlängern (s. Tab. 5-14, s. Abb. 5-39). Nach 25 Zyklen

tritt bei keinem der Enzyme eine unspezifische Verlängerung über das erste angefügte Nukleotid hinaus auf.

		<i>bioUSP</i>	+ <i>S-dTTP</i>
TAQ	10 min	--	100
	25 Zyklen	--	100
TAQY	10 min	--	100
	25 Zyklen	--	100
TAQF	10 min	--	100
	25 Zyklen	--	100
TAQYF	10 min	--	100
	25 Zyklen	--	100
TAQW	10 min	--	100
	25 Zyklen	--	100
TAQYW	10 min	--	100
	25 Zyklen	--	100
TAQH	10 min	16,71±0,85	83,29±0,85
	25 Zyklen	--	100
TAQYH	10 min	46,36±1,44	53,64±1,44
	25 Zyklen	--	100
Taq Pol (WT)	10 min	--	100
	25 Zyklen	--	100

Tab. 5-14: Ergebnisse der Primer-Extension-Reaktion mit *S-dTTP*. Der Anteil der einzelnen Produkte ist in % angegeben.

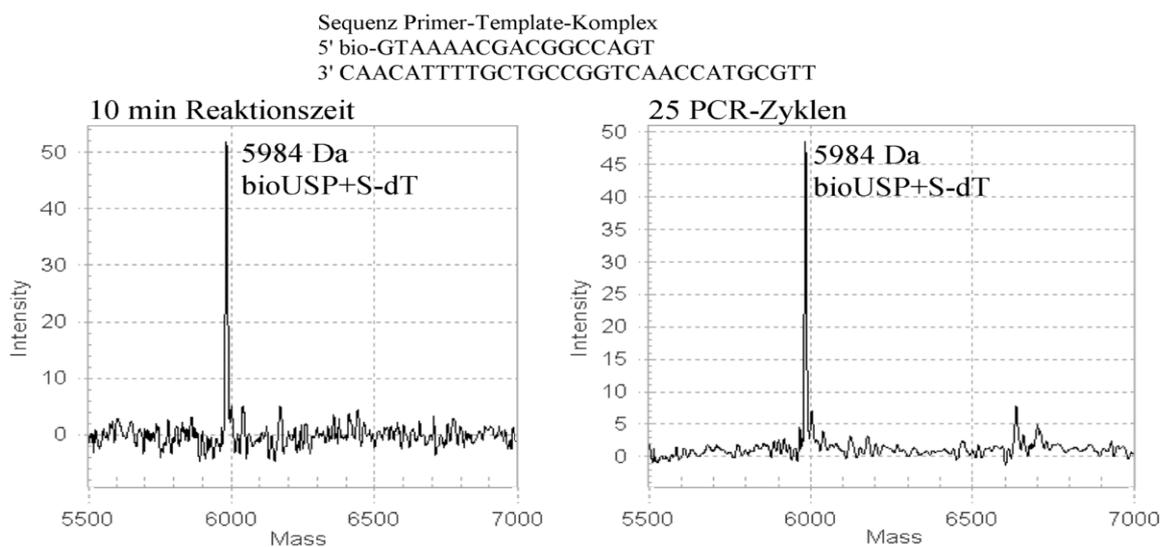


Abb. 5-39: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQYF in Anwesenheit von *S-dTTP*. Massen der Peaks: *bioUSP+S-dT* = 5984 Da

5.4.4.5 5'-Thio-5'-desoxythymidin-5'-S-triphosphat (5'-S-dTTP)

Diese Nukleotidmodifikation trägt an der 5'-Position der Riboseeinheit ein Schwefel- statt eines Sauerstoffatoms (s. Abb. 5-40). Die Synthese dieser Nukleotidsorte fand innerhalb der Arbeitsgruppe¹⁵⁴ statt und sollte wie die schon vorher angesprochenen modifizierten Nukleotide S-dTTP und S-dCTP dem Massenausgleich zu den thiomodifizierten Nukleotiden in der Reversen Sanger Sequenzierung dienen.

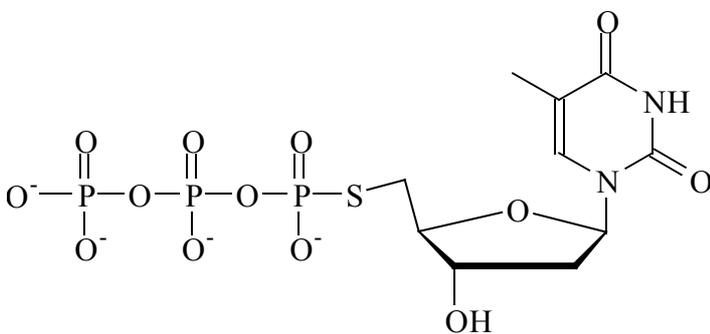


Abb. 5-40: 5'-Thio-5'-desoxythymidin-5'-S-triphosphat (5'-dTTP)

Diese Nukleotidsorte wird offensichtlich weder von den Polymerasemutanten noch von der Wildtyp-Taq-Polymerase akzeptiert (s. Tab. 5-15). Auch nach 25 Temperaturzyklen sind keine entsprechenden Peaks in den Spektren detektierbar. Offensichtlich war aber in der verwendeten Lösung neben dem modifizierten Nukleotid noch unmodifiziertes dTTP als Nebenprodukt enthalten. Bei den Spektren für TAQ, TAQY, TAQF und TAQYF der Wildtyp-Taq-Polymerase ist nach 25 PCR-Zyklen zu jeweils ca. 30 % der um ein Thymin verlängerte bioUSP zu erkennen. Beispielhaft ist dies in Abbildung 5-41 für TAQYF dargestellt. Dies zeigt einmal mehr die Überlegenheit der Massenspektrometrie gegenüber der Gelelektrophorese. Die eindeutige Identifikation des nicht erwarteten Reaktionsproduktes ist in diesem Fall nur mit Hilfe des Massenspektrums möglich. Die Auflösung der Gelelektrophorese reicht nicht aus, um den geringen Massenunterschied zwischen modifiziertem und nativem Nukleotid als Verunreinigung der Nukleotidlösung zu erfassen. Dies hätte unausweichlich zu einer falschen Bewertung der Kompatibilität dieser Nukleotidmodifikation mit den untersuchten Polymerasen geführt.

5 Hochdurchsatzanalyse modifizierter Taq-Polymerasen mittels MALDI-TOF-MS

		<i>bioUSP</i>	+5'- <i>S-dTTP</i>	+ <i>dTTP</i>
TAQ	10 min	100	--	--
	25 Zyklen	69,90±1,94	--	30,10±1,94
TAQY	10 min	100	--	--
	25 Zyklen	62,48±1,94	--	37,52±3,31
TAQF	10 min	100	--	--
	25 Zyklen	71,17±1,67	--	28,83±1,67
TAQYF	10 min	100	--	--
	25 Zyklen	73,73±2,59	--	27,27±2,59
TAQW	10 min	100	--	--
	25 Zyklen	100	--	--
TAQYW	10 min	100	--	--
	25 Zyklen	100	--	--
TAQH	10 min	100	--	--
	25 Zyklen	100	--	--
TAQYH	10 min	100	--	--
	25 Zyklen	100	--	--
Taq Pol (WT)	10 min	100	--	--
	25 Zyklen	64,53±2,10	--	35,47±2,10

Tab. 5-15: Ergebnisse der Primer-Extension-Reaktion mit 5'-*S-dTTP*. Der Anteil der einzelnen Produkte ist in % angegeben.

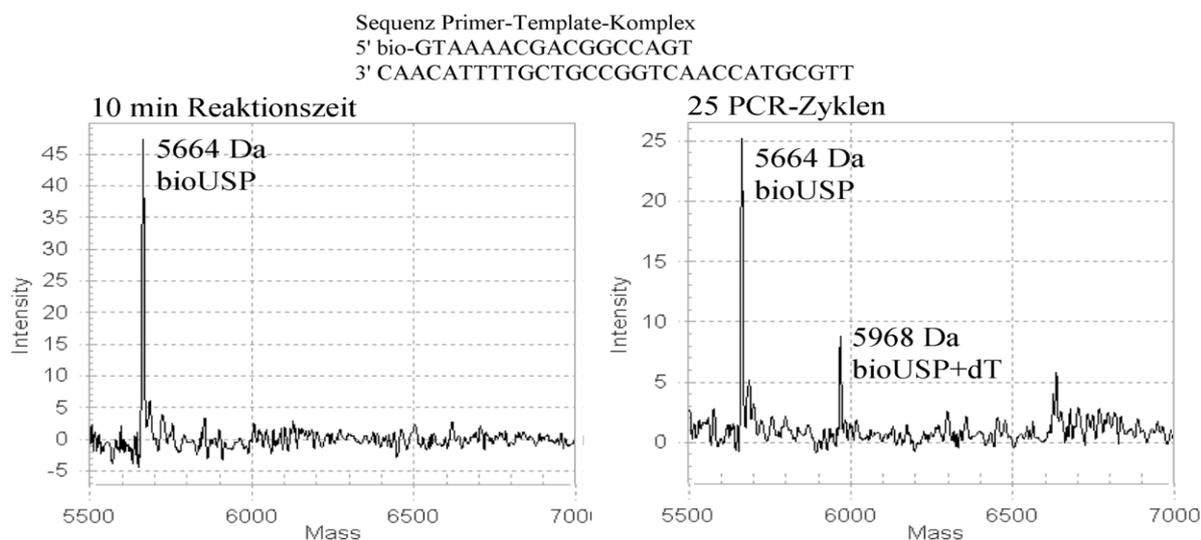


Abb. 5-41: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQYF in Anwesenheit von 5'-*S-dTTP*. Massen der Peaks: *bioUSP* = 5664 Da; *bioUSP+dT* = 5968 Da

Abschließend sind noch einmal in Tabelle 5-16 die Untersuchungsergebnisse der Primer-Extension-Reaktion für die verschiedenen modifizierten Nukleotide wiedergegeben.

	<i>dA*TP</i>	<i>OH-dCTP</i>	<i>S-dCTP</i>	<i>S-dTTP</i>	<i>5'-S-dTTP</i>
TAQ	+ ¹ / _{+++²}	+ ¹ / _{+++²}	+ ¹ / _{+++²}	+ ¹ / _{+²}	- ¹ / _{-²}
TAQY	+ ¹ / _{+++²}	+ ¹ / _{+++²}	+ ¹ / _{+++²}	+ ¹ / _{+²}	- ¹ / _{-²}
TAQF	(+) ¹ / _{+²}	+ ¹ / _{+++²}	+ ¹ / _{+++²}	+ ¹ / _{+²}	- ¹ / _{-²}
TAQYF	(+) ¹ / _{+++²}	+ ¹ / _{+++²}	+ ¹ / _{+++²}	+ ¹ / _{+²}	- ¹ / _{-²}
TAQW	(+) ¹ / _{+++²}	(+) ¹ / _{+++²}	(+) ¹ / _{+²}	+ ¹ / _{+²}	- ¹ / _{-²}
TAQYW	(+) ¹ / _{+++²}	(+) ¹ / _{+++²}	(+) ¹ / _{+²}	+ ¹ / _{+²}	- ¹ / _{-²}
TAQH	- ¹ / _{(+)²}	(+) ¹ / _{+²}	(+) ¹ / _{+²}	(+) ¹ / _{+²}	- ¹ / _{-²}
TAQYH	- ¹ / _{(+)²}	(+) ¹ / _{+²}	(+) ¹ / _{+²}	(+) ¹ / _{+²}	- ¹ / _{-²}
Taq Pol (WT)	(+) ¹ / _{+²}	(+) ¹ / _{+++²}	(+) ¹ / _{+++²}	+ ¹ / _{+²}	- ¹ / _{-²}

Tab. 5-16: Ergebnisse mit den modifizierten Nukleotiden in der Primer-Extension-Reaktion. Das Template wurde so gewählt, daß das erste einzubauende Nukleotid das modifizierte war.

- = keine Inkorporation

(+) = teilweise Inkorporation

+ = einfache Inkorporation

++ = unspezifische Inkorporation

¹ Temperaturprogramm analog einem PCR-Programm mit 25 Zyklen

² Temperaturprogramm ohne Zyklisierung, Extensionszeit 10 min

5.4.5 PCR-Untersuchungen mit modifizierten Nukleotiden

Um zu überprüfen inwieweit sich die Ergebnisse der Primer-Extension-Reaktion mit den modifizierten Nukleotiden auf die PCR übertragen lassen, wurden die vier PCR-fähigen Polymerase-Varianten in entsprechenden Standard-PCRs mit modifizierten Nukleotiden untersucht (s. Kap. 4.4). Die Enzyme wurden in aufgereinigter Form eingesetzt, wobei aus parallel bearbeiteten Proteinaufreinigungen jeweils das gleiche Volumen eingesetzt wurde (2,5 µl). Ein Desoxyribonukleotid wurde jeweils zu 100 % durch das entsprechende modifizierte ersetzt. Nach der Reaktion wurden 10 % des Gesamtansatzes auf einem 1 %igen Agarose-Gel analysiert. Als Positivkontrollen dienten Reaktionen mit allen vier unmodifizierten Desoxyribonukleotiden, als Negativkontrollen Ansätze ohne Template.

Unter Verwendung eines Standardpuffers ergab sich, daß neben der Wildtyp-Taq-Polymerase nur TAQ und TAQY unter Zugabe von dA*TP bzw. OH-dCTP ein PCR-Produkt erzeugen konnten (s. Tab. 5-17). Die Ausbeute dieser Reaktionen war allerdings gering (s. Abb. 5-42). Der Einsatz größerer Mengen Polymerase erbrachte keine Veränderung des Ergebnisses.

	<i>dA*TP</i>	<i>OH-dCTP</i>	<i>S-dCTP</i>	<i>S-dTTP</i>
TAQ	(+)	(+)	-	-
TAQY	(+)	(+)	-	-
TAQF	-	-	-	-
TAQYF	-	-	-	-
Taq Pol (WT)	+	(+)	-	-

Tab. 5-17: Ergebnisse mit den modifizierten Nukleotiden in der PCR für die vier PCR-fähigen Enzyme. Es wurde eine Standard-PCR in einem Standard-PCR-Puffer durchgeführt.

+ = PCR-Produkt detektierbar

(+) = geringe Menge PCR-Produkt detektierbar

- = kein PCR-Produkt

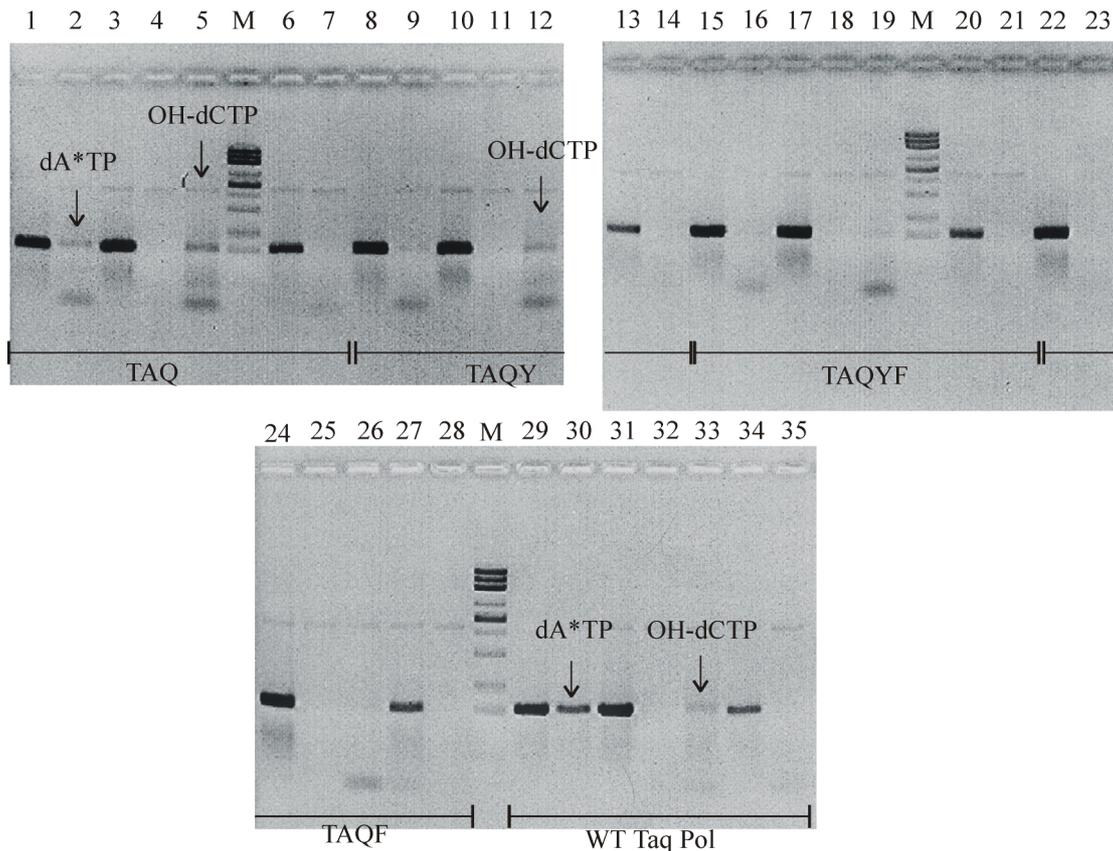


Abb. 5-42: Agarosegel (1 %ig, invertiert abgebildet) zur Überprüfung der Inkorporation der modifizierten Nukleotide in ein PCR-Produkt. Die Reaktion wurde in einem Standardpuffer durchgeführt, und jeweils 10 % des Gesamtansatzes aufgetragen.

Bahnen 1,3, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 20, 22, 24, 27, 29, 31, 34: Positivkontrollen

Bahnen 2, 9, 16, 23, 30: Reaktion mit dA*TP

Bahnen 4, 11, 18, 25, 32: Reaktion mit S-dCTP

Bahnen 5, 12, 19, 26, 33: Reaktion mit OH-dCTP

Bahnen 7, 14, 21, 28, 35: Reaktion mit S-dTTP

Bahnen M: Längenmarker

Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Primer-Extension-Reaktion. Die vollständige Amplifizierung eines doppelsträngigen PCR-Produktes stellt höhere Anforderungen an die Polymerase als eine einfache Primer-Extension-Reaktion, bei der dem Enzym lediglich ein Nukleotidanalogen als Substrat angeboten wird. Die Polymerase muß in der PCR dazu fähig sein, neben drei natürlichen dNTPs mindestens ein modifiziertes Nucleosidtriphosphat als Substrat zu akzeptieren. Außerdem werden während der PCR beide DNA-Stränge durch den Einbau der Nucleotidanaloga modifiziert, die in den Folgezyklen wiederum als Template fungieren und korrekt abgelesen werden

müssen. Insgesamt muß die Ausbeute an PCR-Produkt hoch genug sein, um den Erfolg der Reaktion mit entsprechenden Methoden detektieren zu können. Für die beiden in Position 2 des Pyrimidinringes thiomodifizierten Nukleotidanaloga trifft das offensichtlich nicht zu.

Die Modifikation an Position 5 des Pyrimidinringes bei OH-dCTP scheint dagegen nur einen geringen negativen Einfluß zu haben. Die Ausbeute ist zwar herabgesetzt, es kann aber noch ein Produkt detektiert werden.

Um die Ausbeute an PCR-Produkt für die Nukleotidanaloga zu erhöhen, wurde die Pufferzusammensetzung variiert. Dabei wurden einem Standardpuffer, der neben 40 mM Puffersubstanz Tris 1 mM MgCl₂ enthielt, verschiedene Detergenzien zugesetzt. Darüber hinaus wurden die Auswirkungen der Zugabe von Mangan(II)ionen und der Aminosäure Prolin untersucht (s. Tab. 5-18). Die Zugabe von 2 mM Mangan(II)ionen bewirkt eine Reverse Transkriptase Aktivität der Taq-Polymerase und ermöglicht so die Verwendung eines RNA-Stranges als Template^{104,105,106}. Unter den hier verwendeten Bedingungen wurde allerdings die Polymeraseaktivität so stark herabgesetzt, daß auch in der Positivkontrolle keinerlei PCR-Produkt mehr detektierbar war. Eine Verbesserung des Einbaus der modifizierten Nukleotide konnte daher nicht beobachtet werden. Prolin erhöht bis zu einer Konzentration von 5,5 M die Thermostabilität des Klenow-Fragments¹⁰⁷ und verringert gleichzeitig die Schmelztemperatur von DNA¹⁰⁸. Gegenüber dem Standardpuffer war allerdings keine Veränderung in den erzielten PCR-Produkten festzustellen.

Zusatz	Konzentration	ermöglicht Einbau von				
		dNTPs	dA*TP	OH-dCTP	S-dCTP	S-dTTP
MnCl ₂	1 mM	-	-	-	-	-
Tween 20	0,2 %	+	+	(+)	-	-
Nonidet P40	0,2 %	+	+	(+)	-	-
Triton X-100	0,2 %	+	+	-	-	-
CHAPS	0,2 %	+	+	(+)	-	-
SDS	0,2 %	-	-	-	-	-
CTAB	0,2 %	-	-	-	-	-

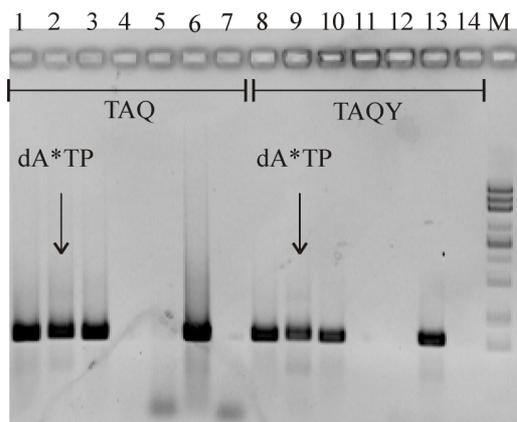
Tab. 5-18: Auflistung der verwendeten Pufferzusätze

SDS, ein anionisches Detergenz, und CTAB, ein kationisches Detergenz, führten zu einer komplet-

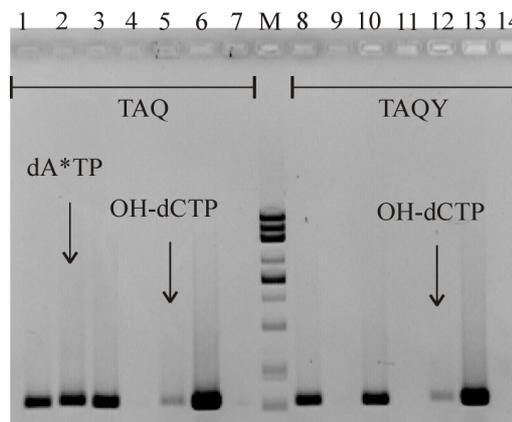
ten Inhibition der Reaktion (s. Tab. 5-18). Sie inaktivieren wahrscheinlich die Polymerase durch Denaturierung. Die nichtionischen Detergenzien Tween 20, Nonidet P-40 und Triton X-100 sowie das amphotere CHAPS hatten dagegen einen positiven Effekt auf den Einbau der modifizierten Nukleotide. Insbesondere die Anwesenheit von Triton X-100 in einer Konzentration von 0,2 % verbessert den Einbau von dA*TP durch die Enzyme TAQ und TAQY erheblich (s. Abb. 5-43), während OH-dCTP in diesem Puffer von beiden Enzymen gar nicht eingebaut wird. Die Zugabe von CHAPS ermöglichte die Inkorporation von OH-dCTP durch diese Enzyme. dA*TP wird unter diesen Bedingungen nur von TAQ, nicht aber von TAQY inkorporiert. Die Anwesenheit von 0,2 % Nonidet P40 in der Reaktion setzt zwar insgesamt die Ausbeute herab, ermöglicht aber einen Einbau von OH-dCTP durch TAQF und TAQYF. Auf den Einbau von dA*TP hat Nonidet P40 dagegen bei TAQF und TAQYF keinen Einfluß. Durch TAQ und TAQY wird dA*TP in diesem Puffer erfolgreich in das PCR-Produkt inkorporiert.

Die genaue Wirkungsweise der Detergenzien innerhalb der Reaktion ist nicht bekannt und, wie anhand der Experimente zu sehen ist, nicht vorhersagbar. Pufferzusammensetzungen werden daher stets empirisch optimiert¹⁰⁹. Möglicherweise wird die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen, die in der Substraterkennung der Polymerasen eine entscheidende Rolle spielen, verringert und so die Inkorporation modifizierter Nukleotide erleichtert. Auf den Einbau von S-dTTP und S-dCTP hatten die hier verwendeten Pufferzusätze keinen detektierbaren Einfluß.

A Reaktion in Anwesenheit von Triton X-100



B Reaktion in Anwesenheit von CHAPS



C Reaktion in Anwesenheit von Nonidet P40

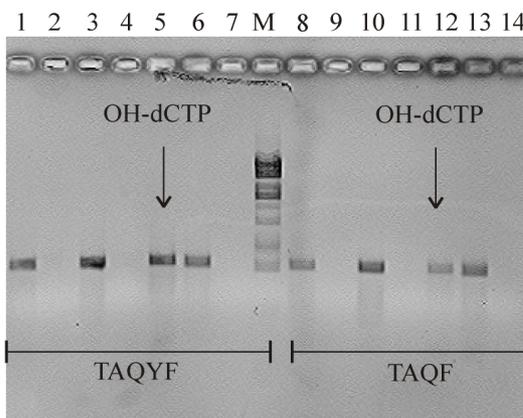


Abb. 5-43: Ergebnisse der PCR mit unterschiedlichen Pufferzusätzen. Es sind jeweils 10% des Gesamtansatzes aufgetragen worden. Negativkontrollen wurden für alle Reaktionen durchgeführt, sind aber nicht auf diesen Gelen aufgeführt.

A PCR in Anwesenheit von 0,2% Triton X-100 für die Enzyme TAQ und TAQY. Auf Bahn 1 – 7 sind die PCR-Produkte für TAQ aufgetragen auf Bahn 8 – 14 die für TAQY. Die modifizierten Nukleotide sind in folgender Reihenfolge eingesetzt worden:

Positivkontrollen, Bahn 1, 3, 6, 8, 10 und 13)

dA*TP (Bahn 2 und 9)

S-dCTP (Bahn 4 und 11)

OH-dCTP (Bahn 5 und 12)

S-dTTP (Bahn 7 und 14)

B PCR in Anwesenheit von 0,2% CHAPS für die Enzyme TAQ und TAQY. Auf Bahn 1 – 7 sind die PCR-Produkte für TAQ aufgetragen auf Bahn 8 – 14 die für TAQY. Die modifizierten Nukleotide sind entsprechend der Reihenfolge in Abbildungsteil A eingesetzt worden.

C PCR in Anwesenheit von 0,2% Nonidet P40 für die Enzyme TAQF und TAQYF. Auf Bahn 1 – 7 sind die PCR-Produkte für TAQYF aufgetragen auf Bahn 8 – 14 die für TAQF. Die modifizierten Nukleotide sind entsprechend der Reihenfolge in Abbildungsteil A eingesetzt worden.

5.4.6 Untersuchung von Fehleinbauten

Die in den vorangegangenen Untersuchungen z.T. auffälligen Fehleinbauten (vgl. Kap. 5.4.1) sollten mit Hilfe der Primer-Extension-Reaktion noch einmal systematisch untersucht werden. Die Versuchsbedingungen hierfür wurden aus den vorhergehenden Experimenten übernommen. Allerdings wurde pro Reaktion nur ein Nukleotid zugegeben. Die vier Templates (s. Abb. 5-1) wurden so mit den Nukleotiden kombiniert, daß jede mögliche Zusammenstellung für jedes Enzym untersucht werden konnte. Zusätzlich wurden die Temperaturprogramme variiert wie in Kapitel 5.2 beschrieben. In die Untersuchung wurden die vier PCR-fähigen Enzyme TAQ, TAQY, TAQF und TAQYF sowie TAQW und TAQYW einbezogen. Als Kontrolle diente die Wildtyp-Taq-Polymerase.

Grundsätzlich lassen sich Basenfehlpaarungen in zwei Klassen einteilen. Bei der Transition wird ein Purin durch ein Purin, bzw. ein Pyrimidin durch ein Pyrimidin ersetzt. Dagegen ist eine Transversion der Ersatz eines Purins durch ein Pyrimidin oder umgekehrt¹¹⁰.

Bei der Transition entstehen Paarungen von Guanosin und Thyminid bzw. Adenosin und Cytidin. Beide erfordern kaum eine Änderung der Base-Stacking-Energie und bringen durch die Erhaltung der Kombination von Purin mit Pyrimidin nur eine geringe Störung der Helix-Konformation mit sich. Die Paarung von Adenosin und Cytidin erfordert allerdings, daß Adenosin in Form des seltenen Iminotautomers vorliegt und am N¹ protoniert ist¹¹¹.

In Tabelle 5-19 sind die Ergebnisse der Variante TAQY repräsentativ für die vier PCR-fähigen Taq-Polymerasevarianten dargestellt. Sie unterschieden sich nicht wesentlich voneinander und von den Ergebnissen der Wildtyp-Taq-Polymerase. Eine Veränderung durch die vorgenommenen Mutationen hat also nicht stattgefunden. Generell ist auffällig, daß alle theoretisch möglichen Transitionsfehlpaarungen gefunden wurden. Innerhalb der einfachen Elongationszeit wird der Primer in den Fällen C:dATP, A:dCTP und T:dGTP zumindest anteilig um ein fehleingebautes Nukleotid verlängert. Nach einer Reaktionszeit von 25 PCR-Zyklen ist der Primer jeweils zu 100 % verlängert. Über diese Fehlpaarungen hinaus findet allerdings keine weitere Nukleotidinkorporation statt, die in den entsprechenden Sequenzzusammenhängen der Templates eine weitere Fehlpaarung nach sich ziehen würde. Die literaturdokumentierte Bevorzugung von T→C-Transversionen^{112,113} der Taq-Polymerase

konnte hier nicht bestätigt werden. Das Auftreten von Fehleinbauten und ihre weitere Verlängerung ist jedoch sequenzabhängig und kann um das 5 – 100fache variieren¹¹⁴. Daher ist ein endgültiger Rückschluß aufgrund dieser Ergebnisse nicht möglich.

	<i>bioUSP</i>	+ <i>dN</i>	+2 <i>dN</i>	+3 <i>dN</i>	+4 <i>dN</i>
T:dATP 10 min	--	44,60±0,73	55,41±0,73	--	--
25 Zyklen	--	--	100	--	--
C:dATP 10 min	36,57±1,88	63,43±1,88	--	--	--
25 Zyklen	--	100	--	--	--
G:dCTP 10 min	--	100	--	--	--
25 Zyklen	--	--	85,38±0,79	14,62±0,79	--
A:dCTP 10 min	34,64±2,36	65,37±2,36	--	--	--
25 Zyklen	--	100	--	--	--
C:dGTP 10 min	--	59,72±0,86	33,34±0,86	6,94±0,89	--
25 Zyklen	--	4,97±1,30	53,12±1,30	41,91±1,94	--
T:dGTP 10 min	10,31±0,48	89,69±0,98	--	--	--
25 Zyklen	--	100	--	--	--
A:dTTP 10 min	--	69,36±3,79	--	30,65±3,79	--
25 Zyklen	--	--	--	64,63±1,94	35,37±1,94
G:dTTP 10 min	--	--	--	100	--
25 Zyklen	--	--	--	79,53±1,19	20,47±1,19

Tab. 5-19: Ergebnisse der Primer-Extension-Reaktion des Enzyms TAQY für Transitionsfehlpaarungen und korrekte Basenpaarungen. Der Anteil der einzelnen Produkte ist in % angegeben.

Bei der Fehlpaarung G:dTTP zeigt sich dagegen ein anderes Bild (s. Abb. 5-44): Schon nach 10 min Reaktionszeit wird der Primer zu 100 % um drei Thymidine verlängert. Dem GT-Mismatch folgt in diesem Fall eine korrekte AT-Paarung und dann eine zusätzliche CT-Fehlpaarung. Nach 25 Zyklen werden ca. 20 % des Primers um ein weiteres Thymidin in einer korrekten AT-Basenpaarung verlängert. Die Anfälligkeit der Taq-Polymerase für CT-Mismatches, die durch die vorangegangenen Versuche nicht bestätigt werden konnte, tritt hier in hohem Maße auf und ist mit Sicherheit auf den vorliegenden Sequenzzusammenhang zurückzuführen.

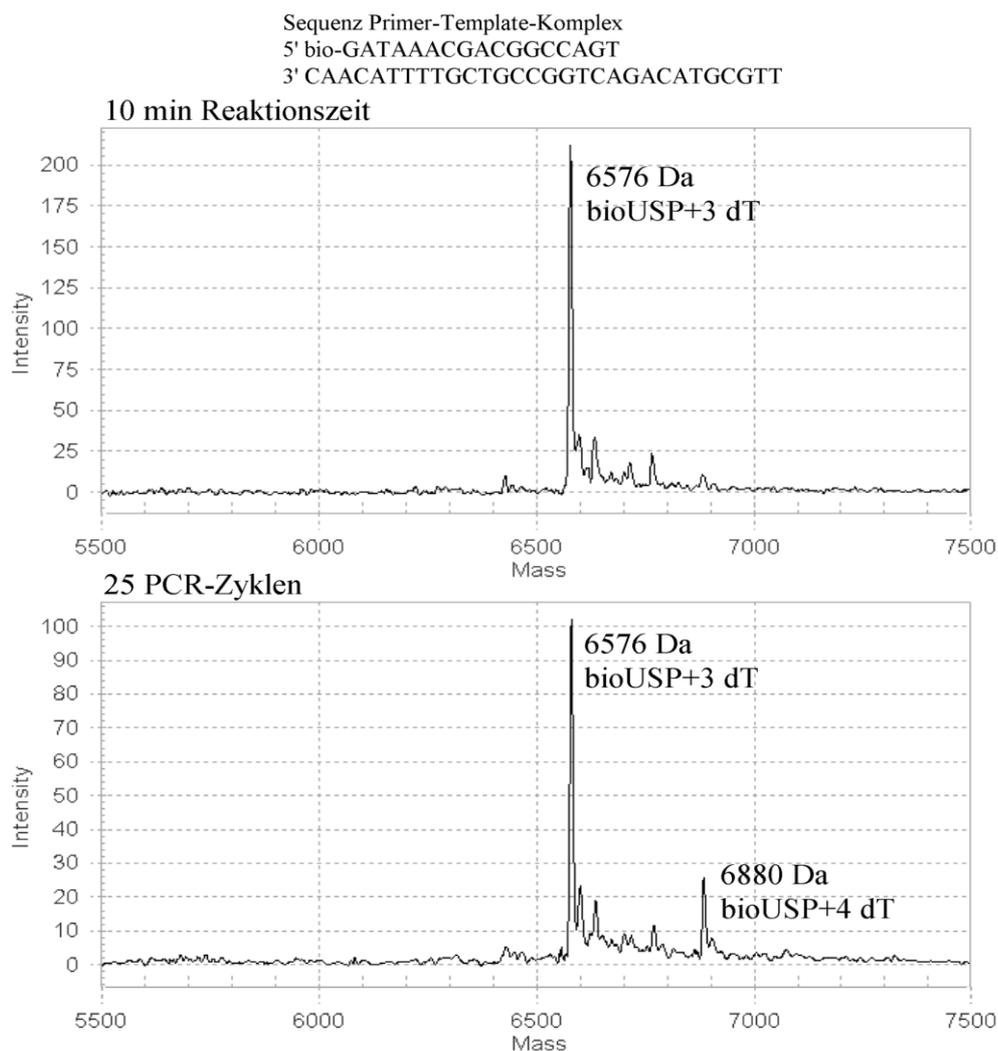


Abb. 5-44: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQY für die Basenfehlpaarung G:dTTP. Massen der Peaks: bioUSP+3 dT = 6576 Da; bioUSP+ 4 dT = 6880 Da.

In den entsprechenden Versuchen mit dem jeweils korrekten Nukleotid wird ebenfalls die grundsätzliche Möglichkeit zum Einbau eines falschen Nukleotides dokumentiert. Der Primer wird in allen vier Fällen schon nach 10 min der einfachen Elongationszeit über das korrekte erste Nukleotid hinaus verlängert (s. Tab. 5-19). Folgt auf den Mismatch wieder eine mögliche korrekte Basenpaarung, so wird diese Inkorporation ebenfalls durchgeführt. Dies ist zum Beispiel bei der Kombination C:dGTP der Fall: Dort wird nach dem korrekt erfolgten Einbau ein folgender A:dGTP-Mismatch zu ca. 42 % um eine weitere, korrekte C:dGTP-Paarung verlängert (s. Abb. 5-45).

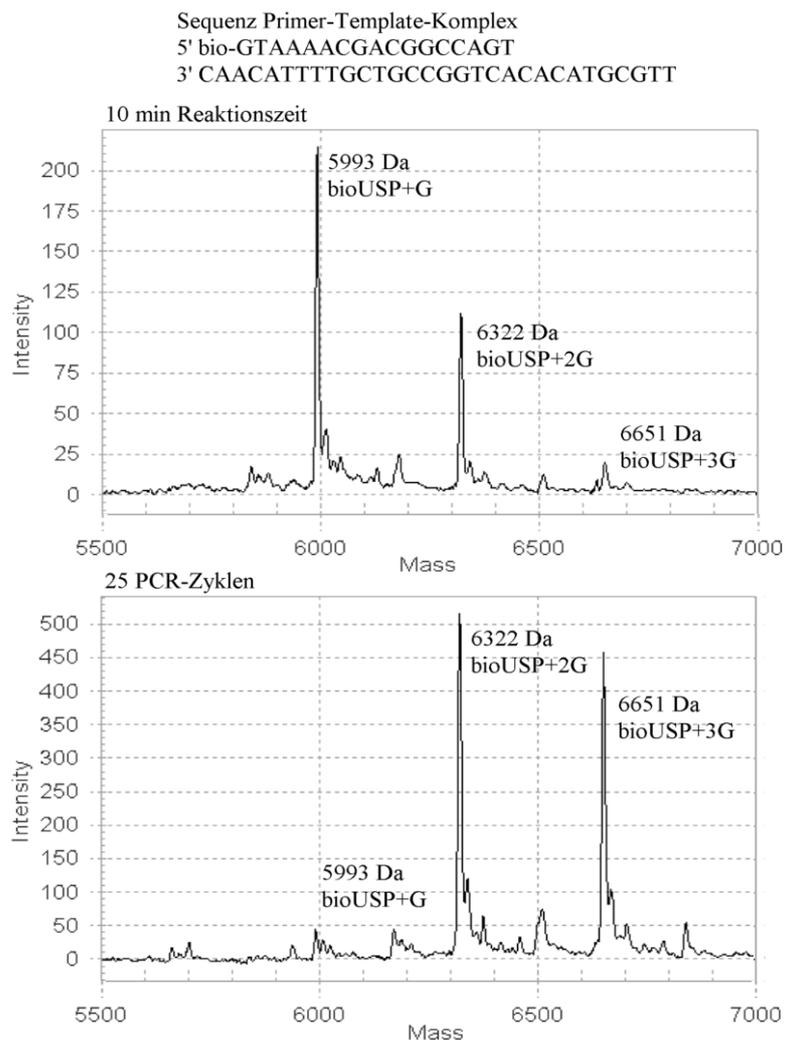


Abb. 5-45: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension- Reaktion für TAQY für die Basenpaarung C:dGTP. Massen der Peaks: bioUSP+ dG = 5993 Da; bioUSP+ 2 dG = 6322 Da; bioUSP+ 3 dG = 6651 Da.

Eine Besonderheit zeigt sich wieder beim Einbau von dTTP (s. Abb. 5-46). Innerhalb von 10 min Reaktionszeit wird der Primer über das korrekte Produkt hinaus zu ca. 30 % um zwei zusätzliche dTTPs verlängert. Dabei handelt es sich um zwei aufeinanderfolgende C:dTTP-Mismatches. Es tritt kein Peak für eine Verlängerung des Primers um zwei Nukleotide auf, sondern der erste Mismatch wird offensichtlich komplett um eine weitere Fehlpaarung verlängert. Nach 25 Zyklen sind dann ca. 80 % des Primers um drei Thymidine verlängert worden, bei den übrigen 20 % wurde unter Einbau eines weiteren dTTPs eine korrekte AT-Basenpaarung erzeugt. Die relative Akzeptanz für CT-Fehlpaarungen kann auch hier wieder gezeigt werden. Offensichtlich ist sie in dem verwendeten Sequenzsystem und unter den verwendeten Reaktionsbedingungen besonders ausgeprägt.

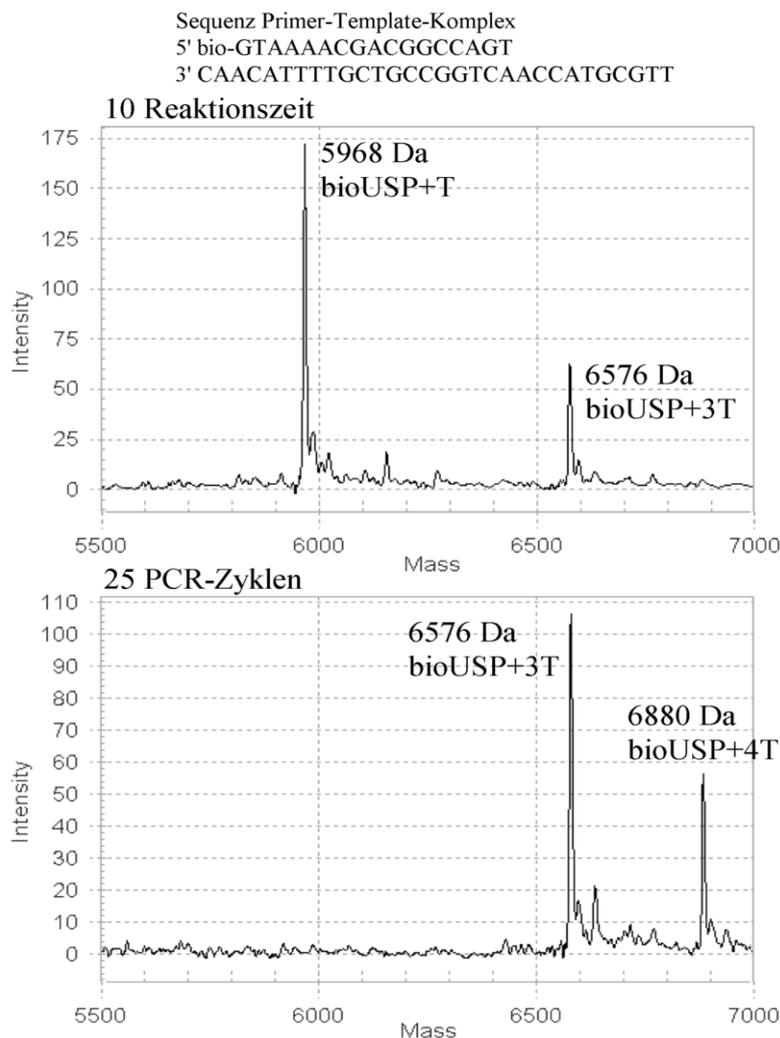


Abb. 5-46: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQY für die Basenpaarung A:dTTP. Massen der Peaks: $\text{bioUSP} + dT = 5968 \text{ Da}$; $\text{bioUSP} + 3 dT = 6576 \text{ Da}$; $\text{bioUSP} + 4 dT = 6880 \text{ Da}$.

Auch für TAQW, dessen Ergebnisse sich nur marginal von denen für TAQYW unterscheiden, kann bei den Transitionsfehlpaarungen gezeigt werden, daß die entsprechenden Nukleotide zwar inkorporiert werden, die Mismatches aber in Abhängigkeit vom Sequenzzusammenhang nicht weiter verlängert werden (s. Tab. 5-20). TAQW weist darüber hinaus dieselbe Toleranz für CT-Mismatches wie die übrigen Polymerasevarianten und das Wildtypenzym auf. Unterschiede zeigen sich aber in der Untersuchung der Kombination A:dCTP. Nach 10 min Reaktionszeit ist der Primer schon zu 100 % verlängert worden (s. Abb. 5-47). Bei den übrigen Enzymen ist der Primer dagegen nur anteilig verlängert worden. Ein ähnlicher Fall liegt bei der korrekten Inkorporation von Cytidin gegenüber von Guanosin im Template vor: Die nachfolgende Fehlpaarung A:dCTP ist schon nach 10 min zu 100 % erfolgt. Der Austausch von Tyrosin an Position 671 des Enzyms gegen Tryptophan führt

also zu einer höheren Toleranz dieser speziellen Fehlpaarung. Möglicherweise geschieht dies durch eine leichte Verzerrung des aktiven Zentrums durch den sterisch anspruchsvolleren Aminosäurerest. Möglich ist aber auch die Ausbildung alternativer Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Tryptophan und der Base des einzubauenden dCTP.

	<i>bioUSP</i>	+ <i>dN</i>	+2 <i>dN</i>	+3 <i>dN</i>	+4 <i>dN</i>
T:dATP 10 min	--	85,51±3,38	14,49±3,38	--	--
25 Zyklen	--	39,92±1,37	60,08±1,37	--	--
C:dATP 10 min	84,01±0,22	15,99±0,22	--	--	--
25 Zyklen	11,21±1,99	88,79±1,99	--	--	--
G:dCTP 10 min	--	--	100	--	--
25 Zyklen	--	--	100	--	--
A:dCTP 10 min	--	100	--	--	--
25 Zyklen	--	100	--	--	--
C:dGTP 10 min	--	100	--	--	--
25 Zyklen	--	71,36±2,34	28,64±3,34	--	--
T:dGTP 10 min	84,55±0,51	15,45±0,51	--	--	--
25 Zyklen	18,61±1,26	81,39±1,26	--	--	--
A:dTTP 10 min	--	49,81±1,52	25,09±1,52	25,09±1,52	--
25 Zyklen	--	--	--	22,03±3,22	77,97±3,22
G:dTTP 10 min	19,45±0,99	80,56±0,99	--	--	--
25 Zyklen	--	68,08±0,86	17,57±0,86	14,39±2,55	--

Tab. 5-20: Ergebnisse der Primer-Extension-Reaktion des Enzyms TAQW für Transitionsfehlpaarungen und korrekte Basenpaarungen. Der Anteil der einzelnen Produkte ist in % angegeben.

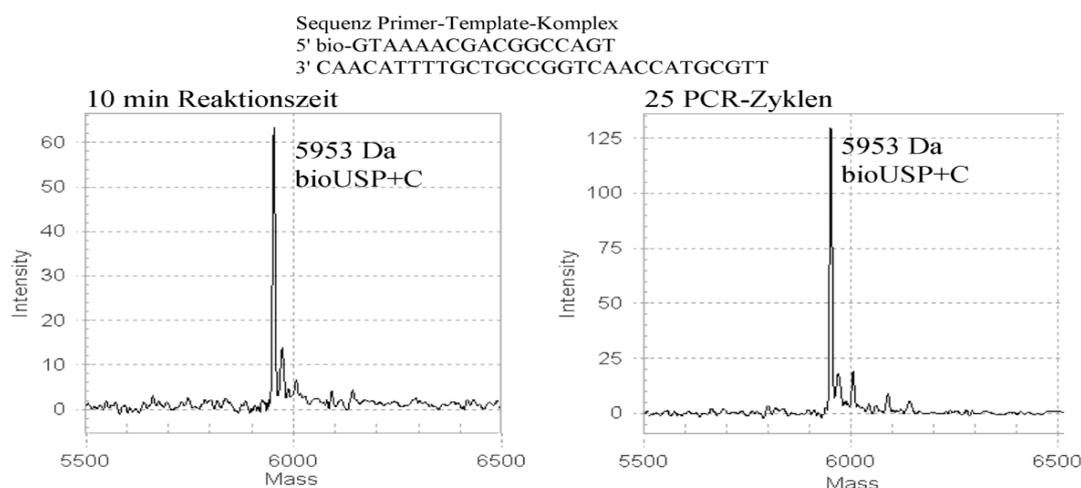


Abb. 5-47: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQW für die Basenfehlpaarung A:dCTP. Massen der Peaks: *bioUSP*+ dC = 5953 Da.

Beim Transversionsmismatch entstehen Paarungen zweier Purine, d.h. A:A, A:G, G:G, bzw. Paa-

rungen zweier Pyrimidine, d.h. C:C, C:T und T:T. Naturgemäß wird dabei die Helixkonformation stärker gestört als bei der Transition. Die Basenpaarung von Guanosin und Adenosin z.B. kann allerdings durch den Wechsel aus der anti- in die syn-Konformation eines der beiden Purine mit minimaler Störung in die Helixkonformation eingebettet werden¹³⁴. Zudem ist die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen A(N⁷) und G(N¹) sowie A(N⁶) und G(O⁶) erforderlich.

Auch für die Transversionsfehlpaarungen sind die Ergebnisse der Polymerasevariante TAQY repräsentativ für alle vier PCR-fähigen Enzyme und die Wildtyp-Taq-Polymerase. Es werden alle theoretisch möglichen Fehlpaarungen realisiert, es tritt aber bei der Mehrzahl auch nach 25 Zyklen PCR-Temperaturprogramm keine Verlängerung über den Mismatch hinaus auf (s. Tab. 5-21).

		<i>bioUSP</i>	+ <i>dN</i>	+2 <i>dN</i>	+3 <i>dN</i>	+4 <i>dN</i>
A:dATP	10 min	19,59±3,12	80,41±3,12	--	--	--
	25 Zyklen	--	100	--	--	--
G:dATP	10 min	--	100	--	--	--
	25 Zyklen	--	100	--	--	--
C:dCTP	10 min	87,10±2,01	12,90±2,01	--	--	--
	25 Zyklen	65,76±0,97	34,24±0,97	--	--	--
T:dCTP	10 min	52,00±0,59	48,00±0,59	--	--	--
	25 Zyklen	--	100	--	--	--
G:dGTP	10 min	--	100	--	--	--
	25 Zyklen	--	100	--	--	--
A:dGTP	10 min	56,32±3,47	24,75±3,47	11,08±3,09	7,86±2,92	--
	25 Zyklen	3,60±1,73	21,51±1,73	8,36±2,00	66,53±1,57	--
T:dTTP	10 min	9,42±3,47	71,51±3,47	--	19,07±1,88	--
	25 Zyklen	--	9,16±2,12	--	62,55±2,12	28,26±0,62
C:dTTP	10 min	44,08±0,74	44,02±0,74	--	11,90±0,82	--
	25 Zyklen	--	--	--	66,01±1,93	33,99±1,93

Tab. 5-17: Ergebnisse der Primer-Extension-Reaktion des Enzyms TAQY für Transversionsfehlpaarungen. Der Anteil der einzelnen Produkte ist in % angegeben.

Bei der Fehlpaarung A:dGTP tritt in der Produktmischung zu ca. 11 % bzw. 8 % der um zwei respektive drei Nukleotide verlängerte Primer auf. Dabei handelt es sich um zwei korrekte Basenpaarungen. Nach 25 Temperaturzyklen ist der um drei Nukleotide verlängerte Primer das Hauptprodukt (s. Abb. 5-48). Genau wie bei den Fehlpaarungen TT und CT, die ebenfalls um korrekte Basenpaarungen und zusätzlich um CT-Mismatches verlängert werden, ist das Auftreten von Fehlpaarungen

ausgesprochen sequenzabhängig. Steht hinter dem erfolgten Fehleinbau im Template die korrekte Base für das im Reaktionsansatz vorhandene Nukleotid zur Verfügung, so erfolgt eine weitere Inkorporation durch die Polymerase über den Mismatch hinaus.

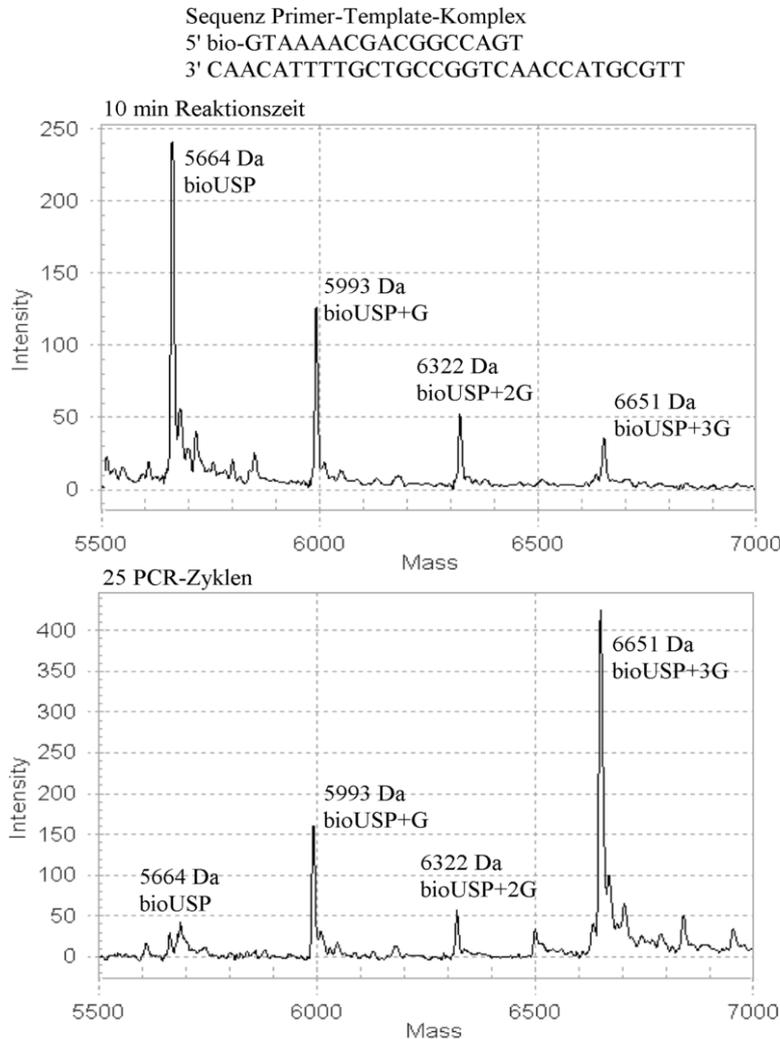


Abb. 5-48: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQY für die Basenfehlpaarung A:dGTP. Massen der Peaks: bioUSP = 5664 Da; bioUSP+ dG = 5993 Da; bioUSP+ 2 dG = 6322 Da; bioUSP+ 3 dG = 6651 Da.

Für die Polymerasevariante TAQW gelten im Prinzip ähnliche Schlußfolgerungen (s. Tab. 5-22). Abweichend davon wird die Fehlpaarung T:dCTP schneller gebildet als bei den übrigen untersuchten Polymerasen, die Fehlpaarung G:dGTP dagegen sehr viel langsamer.

5 Hochdurchsatzanalyse modifizierter Taq-Polymerasen mittels MALDI-TOF-MS

		<i>bioUSP</i>	+ <i>dN</i>	+2 <i>dN</i>	+3 <i>dN</i>	+4 <i>dN</i>
A:dATP	10 min	58,41±0,72	41,59±0,72	--	--	--
	25 Zyklen	--	100	--	--	--
G:dATP	10 min	83,80±1,18	5,76±1,18	10,44±0,61	--	--
	25 Zyklen	57,15±0,66	19,33±0,66	26,53±1,55	--	--
C:dCTP	10 min	67,03±3,32	32,97±3,32	--	--	--
	25 Zyklen	--	100	--	--	--
T:dCTP	10 min	28,08±1,87	71,92±1,87	--	--	--
	25 Zyklen	--	100	--	--	--
G:dGTP	10 min	100	--	--	--	--
	25 Zyklen	74,49±0,96	29,52±0,96	--	--	--
A:dGTP	10 min	60,96±1,54	39,04±1,54	--	--	--
	25 Zyklen	--	100	--	--	--
T:dTTP	10 min	--	100	--	--	--
	25 Zyklen	--	100	--	--	--
C:dTTP	10 min	--	100	--	--	--
	25 Zyklen	--	100	--	--	--

Tab. 5-22: Ergebnisse der Primer-Extension-Reaktion des Enzyms TAQW für Transversionsfehlpaaungen. Der Anteil der einzelnen Produkte ist in % angegeben.

Bei den Mismatches T:dTTP und C:dCTP wird der Primer schon innerhalb von 10 min zu 100 % um ein Nukleotid verlängert, eine weitere Verlängerung ist auch nach 25 Reaktionszyklen nicht feststellbar (s. Abb. 5-49). Lediglich die Fehlpaaung A:dGTP wird anteilig um ein weiteres Guanodin, das eine korrekte CG-Basenpaarung ergibt, verlängert. Von der Polymerase TAQW werden offensichtlich bestimmte Fehlpaaungen zwar schneller akzeptiert, aber dann mit geringerer Effektivität verlängert. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine geringere Stabilität des Enzymsubstratkomplexes durch die Mutation, die dann bei einer Basenfehlpaaung weiter verstärkt wird.

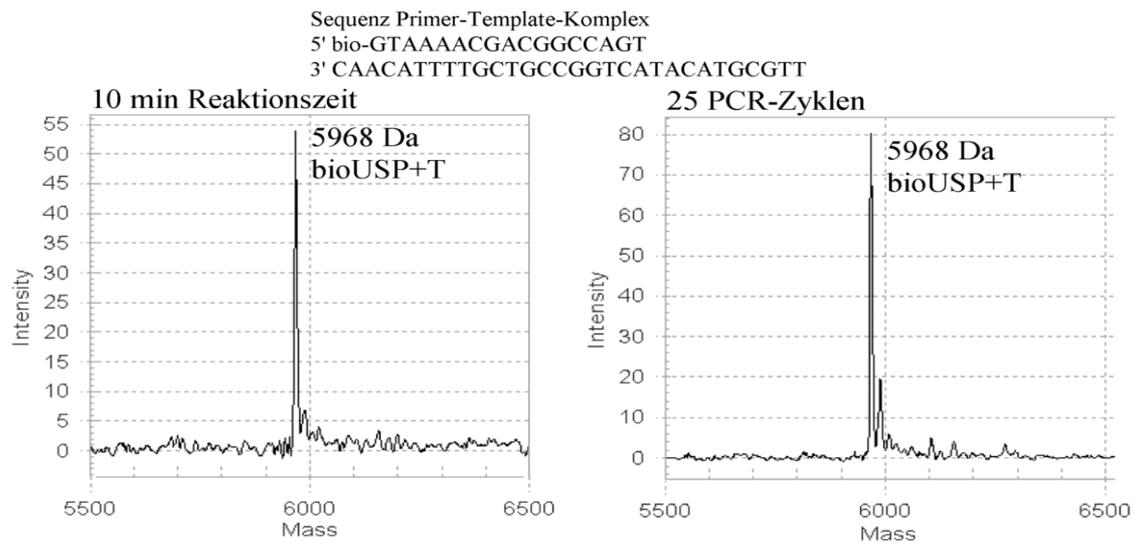


Abb. 5-49: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktion für TAQW für die Basenfehlpaarung T:dTTP. Massen der Peaks: bioUSP+ dT = 5968 Da.

6 Versuche zur Immobilisierung der Taq-Polymerase

Die Immobilisierung von Enzymen gehört zu den Schlüsseltechniken in der Enzymtechnologie¹¹⁵ und steht für die Fixierung oder Bindung von Enzymen¹¹⁶ an eine feste Phase, die eine physikalische Trennung von Substrat und Produkt erlaubt. Dafür steht sowohl die Möglichkeit der physikalischen als auch die der chemischen Bindung an einen Träger zur Verfügung. Alternativ dazu kann der Einschluß in eine Matrix oder semipermeable Membran erfolgen.

Immobilisierte Enzyme bringen in der Biotechnologie mehrere entscheidende Vorteile mit sich. So können sie mehrfach verwendet werden und die Umsetzung kann kontinuierlich in Reaktionsrührgefäßen oder Säulen erfolgen. Die erhaltenen Produkte sind enzymfrei, und die Kontrolle der Produktbildung wird verbessert. Außerdem können immobilisierte Enzyme als Modellsysteme für die Untersuchung der Verknüpfung von Enzymen mit der Zellmembran in ihrer natürlichen Umgebung dienen. Insbesondere am Beispiel verschiedener RNA-Polymerasen ist die Funktionsfähigkeit von Template-abhängig polymerisierenden Enzymen untersucht worden. Bei der RNA-Polymerase aus *E. coli* konnten alle Untereinheiten des Enzyms reversibel über einen Hexahistidin-Tag an Ni-NTA-Agarose gebunden werden und behielten dabei ihre komplette Reaktionsfähigkeit^{117,118}. Auf diese Weise konnten die einzelnen Schritte der Transkription gezielt untersucht werden. Für die T7 RNA-Polymerase, bei der es sich um ein Monomer handelt, konnte nachgewiesen werden, daß eine Immobilisierung des Enzyms zwar die Initiationsrate verringert, die Elongationsrate aber unverändert bleibt¹¹⁹. Dies gilt zusammen mit topologischen Überlegungen als Hinweis darauf, daß bei der Transkription *in vivo* das Template an immobilisierten Transkriptionskomplexen bzw. an der immobilisierten Polymerase entlanggleitet und nicht umgekehrt¹²⁰.

Trägergebundene Enzyme werden vornehmlich in der industriellen Verfahrenstechnik, insbesondere in der Nahrungsmittel- und Getränkeindustrie¹²¹, verwendet. Die wichtigsten Anwendungsgebiete sind die Hydrolyse von Proteinen, die Herstellung von Käse, die Umwandlung von Maisstärke in Glucose und von Glucose in Fructose, die Klärung von Weinen und Obstsaften sowie z. B. die Synthese von Penicillinen. Sie sind aber auch von grundlegender Bedeutung in verschieden bioanalytischen Anwendungen. Dazu gehören z.B. die Entwicklung von Biosensoren, Bioreaktoren, Immunoassays und biochemischen Trennverfahren^{122,123,124,125}.

Die Verfahren zur Immobilisierung von Enzymen sind sehr unterschiedlich. Die einfachste und zugleich älteste Immobilisierungstechnik ist die Adsorption an oberflächenaktive Trägermaterialien wie Kohlenstoff, Aluminiumoxid, Ionenaustauscherharze oder Glas. Die Gewinnung der Präparate ist sehr einfach, die Stabilität jedoch stark von den äußeren Bedingungen wie Temperatur, pH-Wert und Ionenstärke abhängig. Intramolekulare Verknüpfungen können mit Hilfe bifunktioneller Reagenzien erreicht werden. Durch die Ausbildung von Quervernetzungen kommt es zur Aggregation der Enzyme und somit zur Wasserunlöslichkeit. Eine neuere Technik ist die Einkapselung¹²⁶ von Enzymen in Membranen, die für niedermolekulare Substanzen, d.h. die Substrate, permeabel sind. Diese Mikrokapseln können aus Cellulosenitrat, synthetischen Polymeren, Phospholipiden oder Collagen gebildet werden. Bei der Polymerisation von Kieselgel, Stärke oder Polyacrylamiden anwesende Enzyme werden durch diesen Prozeß in die Polymermatrix eingehüllt. Bei diesem Verfahren muß allerdings sichergestellt werden, daß das Enzym durch die zugegebenen Reagenzien nicht modifiziert wird und daß das Netzwerk keine Barriere für die Substrat- und Produktdiffusion darstellt.

Die gebräuchlichste Technik ist die kovalente Verknüpfung der Enzyme an aktivierte, makromolekulare, wasserunlösliche Trägermaterialien. Dafür kommen synthetische Polymere^{127,128,129,130}, Cellulosederivate¹³¹ und Glas¹³² in Frage. Die Enzymimmobilisierung erfolgt über nukleophile Gruppen der Aminosäureseitenketten. Sie kann im Allgemeinen über die Thiol^{133,134}-, Amino¹³⁵- oder Carboxylfunktionen der Aminosäureseitenketten sowie über die Termini an eine entsprechend aktivierte Oberfläche erfolgen.

Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der kovalenten Immobilisierung der Taq-Polymerase an Silizium-Wafer. Silizium besitzt als Oberflächenmaterial für die Molekularbiologie bedeutsame Eigenschaften: Es ist vergleichsweise inert gegenüber organischen Lösungsmitteln und zeigt eine hohe biologische Verträglichkeit. Die Siliziumoberfläche kann auf vielfältige Weise modifiziert werden, um so den jeweiligen Anforderungen Rechnung zu tragen. Nicht zuletzt können die Verfahren und Erkenntnisse aus der hochentwickelten Mikroelektronik- und Mikrosystem-Technologie genutzt werden. All diese Vorteile lassen Silizium als geeigneten Kandidaten zur Entwicklung hoch integrierter Arrays aus Reaktionskompartimenten erscheinen, der den wachsenden Ansprüchen der Biochemie und Molekularbiologie an Miniaturisierung, Parallelisierung und Automatisierung angepaßt werden kann. Gegenüber porösen Silizium-Partikeln bieten die planaren Wafer den Vorteil der guten räumlichen Zugänglichkeit aller funktioneller Gruppen. Die Planarität der

Oberfläche ist zudem die Voraussetzung für den direkten Einsatz der Wafer als Target in der MALDI-TOF-MS.

Zur Anbindung der Taq-Polymerase wurde ein Verfahren benutzt, mit dem die Alkalische Phosphatase aus *E. coli* bereits erfolgreich an aminofunktionalisierte Silizium-Wafer gebunden werden konnte¹³⁶ (s. Abb. **6-1**). Dabei wurde eine der Sequenzierung mit Hilfe des automatisierten Festphasen-Edman-Abbaus^{137,138,139,140,141,142} entlehnte Immobilisierungstechnik benutzt: Über die Kopplung des homobifunktionellen Linkers 1,4-Phenylendiisothiocyanat (DITC) können in diesem Verfahren Aminofunktionen der Proteine kovalent an Polystyrol-Träger, mikroporöse Membranen¹⁴³, Glas-Fiber-Sheets¹⁴⁴ oder aminopropyliertes poröses Glas^{145,146} immobilisiert werden. Der eigentlichen Kopplung geht dabei eine Aktivierungsreaktion der festen Phase voraus, um inter- und intramolekulare Vernetzungen als Nebenreaktionen auszuschließen.

6 Versuche zur Immobilisierung der Taq-Polymerase

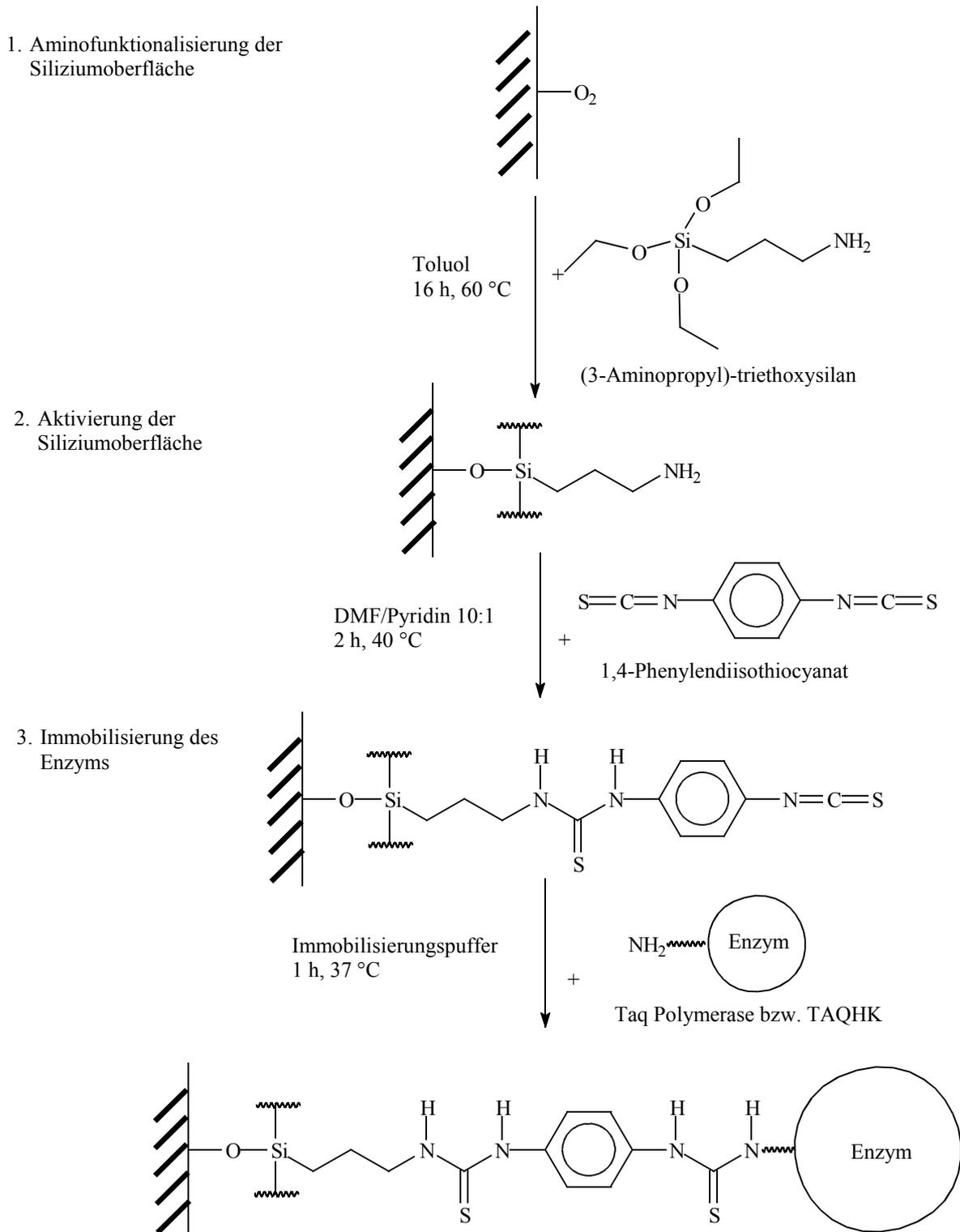


Abb. 6-1: Reaktionsschema zur Immobilisierung der Taq-Polymerase an Silizium-Wafer

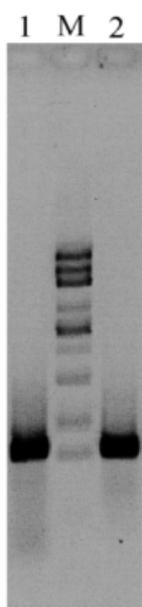
6.1 Klonierung, Expression und Isolierung einer Taq-Polymerase-Variante mit carboxyterminalen Lysinresten

Für die Immobilisierung der Taq-Polymerase mit dem oben beschriebenen Verfahren muß an der Oberfläche des Enzyms ein aminogruppen-tragender Aminosäurerest liegen, dessen exponierte Lage den Immobilisierungsreagenzien freien Zugang gewähren kann. Als Grundlage für dieses Konstrukt diente das Plasmid pTAP7. In Vorversuchen zur Immobilisierung der Polymerase TAQ, die von pTAP7 codiert wird, konnte keine erfolgreiche Anbindung des Enzyms auf der Siliziumoberfläche erreicht werden, was darauf hinweist, daß keine den obigen Kriterien entsprechenden Aminosäurereste auf der Oberfläche der Taq-Polymerase zugänglich sind. Daher sollte das Leseraster des Gens am Carboxyterminus hinter der Sequenz für das Hexahistidin-Tag um zwei zusätzliche für die Aminosäure Lysin kodierende Codons erweitert werden. Da der Hexahistidin-Tag erfolgreich zur Aufreinigung der Polymerasevarianten eingesetzt wurde (vgl. Kap. 4.2), kann davon ausgegangen werden, daß seine Stellung für den Zugriff von festphasengebundenen Reagenzien zugänglich ist.

Zur Klonierung der entsprechenden Insertionen wurde wie schon für die Punktmutationen die Vektor-PCR eingesetzt (vgl. Kap. 3.3). Es wurde zunächst ein Basisvektor mit dem carboxyterminalen Abschnitt aus der Gensequenz kloniert. Dafür wurde aus dem Expressionsplasmid pTAP7 (vgl. Abb. 3.1) mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Pst*I ein 852 bp langes Fragment herausgeschnitten und in den ebenfalls mit *Bam*HI und *Pst*I linearisierten Klonierungsvektor pOM8 ligiert. Das resultierende Plasmid p8taq1 diente als Template für die Vektor-PCR. Die Insertionen zur Erzeugung der zusätzlichen, carboxyterminalen Lysin-Codons wurden mit Hilfe von nicht komplementären 5'-Überhängen in den PCR-Primern erhalten. Die Konzeption erfolgte analog zu den Punktmutationen (s. Kap. 3.3). Die erhaltenen Klone wurden nach der Transformation in *E. coli*-Zellen des Stammes DH10B zunächst durch Restriktionsanalyse überprüft. Vor der Rückklonierung des mutagenisierten DNA-Abschnitts erfolgte zusätzlich eine Verifizierung der erzeugten Sequenz durch eine Sanger Sequenzierung.

Zur Rückführung wurde der veränderte Genabschnitt mit *Bam*HI und *Pst*I ausgeschnitten und das resultierende 855 bp Fragment in den mit *Pst*I und *Bam*HI linearisierten Expressionsvektor pTAQ einligiert. Das resultierende Expressionsplasmid pTAQHK wurde zunächst wieder in *E. coli*-Zellen

des Stammes DH10B transformiert und durch Restriktionskartierung analysiert. Die Expression der rekombinanten Proteine erfolgte nach Transformation eines verifizierten Plasmidklons in Zellen des Stammes JM83.



Die Expression, Isolierung und Voruntersuchungen der entsprechenden Taq-Polymerasevariante TAQHK erfolgte analog zu den übrigen Polymerasevarianten. Es wurde in 1 μ l einer nach Kapitel 4.2 isolierten Proteinlösung eine Ausbeute von 2 – 3 μ g, d.h. 2 mg/l Kulturmedium, erhalten. Dies entspricht den Ergebnissen mit den übrigen Polymerasemutanten (s. Kap. 4.3). Eine Verschlechterung der Expressionsrate durch die Einführung der zusätzlichen Codons wurde nicht beobachtet. Eine Störung der Interaktion des His-Tags mit der Ni-NTA-Agarose findet offensichtlich während der Aufreinigung nicht statt. Beim Einsatz von TAQHK in Standard-PCRs konnte keine Verschlechterung der Polymerase-Aktivität gegenüber TAQ festgestellt werden (s. Abb. 6-2).

Abb. 6-2: Agarosegel (1 %ig (w/v), invertiert abgebildet) einer Standard-PCR mit TAQHK (Bahn 1) und TAQ (Bahn 2). Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen in der Reaktion eingesetzt und 10 % des Gesamtansatzes aufgetragen. Bahn M = Längenmarker

6.2 Funktionalisierung und Aktivierung der Silizium Chips

In dieser Arbeit wurden Experimente an quadratischen Silizium-Wafern mit 4 mm Kantenlänge und einer Dicke von 0,4 mm durchgeführt. Die Wafer wurden zunächst mit Ethanol gewaschen und dann in einem Muffelofen ausgeglüht. Die so vorbehandelten Wafer wurden anschließend einzeln mit einer (3-Aminopropyl)triethoxysilan-Lösung in Toluol bei 60 °C für 16 Stunden inkubiert. Nach dem Waschen mit unterschiedlichen Lösungsmitteln wurden die auf diese Weise erhaltenen aminofunktionalisierten Silizium-Wafer für die Aktivierung durch den homobifunktionellen Linker eingesetzt. Die Aktivierung der aminomodifizierten Oberfläche erfolgte durch Umsetzung mit 1,4-Phenylendiisothiocyanat (DITC). Die Reaktion der Aminogruppen mit dem Linker wurde in DMF/Pyridin unter Schütteln bei 40 °C durchgeführt. Die aktivierten Silizium-Wafer wurden zügig mit DMF, Ethanol und Wasser gewaschen und sofort in der Immobilisierungsreaktion eingesetzt. Auf ein Capping nicht umgesetzter Aminogruppen wurde verzichtet. Als Kontrolle wurden unmodifizierte Wa-

fer eingesetzt.

6.3 Immobilisierungsreaktion der Taq-Polymerase

Den eigentlichen Versuchen zur Immobilisierungsreaktion gingen Untersuchungen des Einflusses der Immobilisierungsbedingungen auf die enzymatische Aktivität der Polymerase voraus. Dabei wurde in erster Linie der Einfluß des Anbindungspuffers untersucht. Die sogenannte "Wetting-Solution" (50 % 2-Propanol, 2 % Tween 20, 1 % N-Methylmorpholin), die üblicherweise zur Immobilisierung von Proteinen für den Festphasen-Edman-Abbau genutzt wird, wurde zu verschiedenen Anteilen mit Taq-Polymerase-Reaktionspuffer (10 mM Tris, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, pH 8,3) gemischt und mit einem Aliquot Enzym versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C unter kräftigem Schütteln wurden die Lösungen über Microcon-Konzentratoren zentrifugiert, die Membranen mit Wasser gewaschen und das Enzym abschließend mit Wasser eluiert. Die resultierende Polymerase-Lösung wurde dann in Standard-PCRs eingesetzt. Es zeigte sich, daß nach der Behandlung mit reiner Wetting-Solution kein PCR-Produkt mehr erzeugt werden konnte, die Polymerase wurde also durch diese Behandlung inaktiviert. Die größte Menge PCR-Produkt wurde bei einem Mischungsverhältnis 5:1 Polymerase-Puffer zu Wetting-Solution erhalten.

Für die Immobilisierungsreaktion wurden daher die aktivierten Silizium-Wafer mit dieser Reaktionslösung aus Wetting-Solution und Polymerase-Puffer sowie der Polymeraselösung überschichtet und eine Stunde bei 37 °C unter kräftigem Schütteln inkubiert. Abschließend wurden die Wafer mehrfach mit Puffer und Wasser gewaschen und möglichst schnell in anschließende Aktivitätsuntersuchungen und Proteinmengenbestimmungen eingesetzt. Wenn eine zwischenzeitliche Lagerung erforderlich war, geschah dies bei 4 °C. Zur Kontrolle wurden in der Immobilisierungsreaktion parallel unmodifizierte und aminomodifizierte Wafer in analogen Reaktionen eingesetzt.

6.4 Untersuchungen der immobilisierten Taq-Polymerase

6.4.1 Quantifizierung der immobilisierten Taq-Polymerase

Die Proteinmengenbestimmung von an Silizium-Wafer immobilisierter Taq-Polymerase erfolgte mit Hilfe des bereits beschriebenen BCA-Assays (s. Kap. 4.3). Die Funktionsfähigkeit des Assays auch in Gegenwart der Chips ist bereits nachgewiesen worden¹³⁶. Die Enzym-Wafer wurden in Einküvetten überführt und mit Assay-Reagenzlösung versetzt. Um auch sehr geringe Proteinmengen detektieren zu können, wurde die Inkubationszeit auf zwei Stunden bei 60 °C verlängert. Allerdings konnte weder auf den zur Kontrolle ebenfalls in der Reaktion verwendeten unmodifizierten und aminomodifizierten noch auf den aktivierten Wafern Proteinmengen innerhalb der Nachweisgrenze des Assays nachgewiesen werden.

6.4.2 Untersuchungen zur Aktivität der immobilisierten Taq-Polymerase

Da bei DNA-Polymerasen aufgrund ihrer hohen spezifischen Aktivität schon geringe Mengen Enzym für eine Reaktion ausreichen, wurden trotz des negativen Befundes aus der Proteinmengenbestimmung Aktivitätsuntersuchungen mit den hergestellten Chips durchgeführt.

6.4.2.1 PCR mit Enzym-Chips

In einer ersten Untersuchung zur Aktivität der immobilisierten Polymerase wurden die mit Enzym behandelten Chips unter Standard-PCR-Bedingungen eingesetzt. Dazu wurden die Polymerase-Chips mit Reaktionslösung überschichtet, die Template, Primer, Nukleotide und Puffersubstanzen enthielt. Nach Durchlaufen eines PCR-Programmes mit 25 Zyklen, wurde der Überstand entnom-

men und 10 % des Gesamtvolumen auf einem Agarosegel analysiert. Zusätzlich wurden die verwendeten Chips mit Argininpuffer versetzt und eine Stunde bei 55 °C inkubiert. Mit der erhaltenen Lösung wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt und ein entsprechendes Aliquot ebenfalls auf ein Agarosegel aufgetragen. In beiden Fällen konnte kein Reaktionsprodukt detektiert werden. Dies galt sowohl für die aktiviert in die Immobilisierungsreaktion eingesetzten Chips als auch für die unbehandelten und lediglich aminofunktionalisierten Chips. Zusätzlich wurde das Temperaturprogramm variiert und die Inkubationszeiten für die verschiedenen Schritte der Reaktion auf bis zu 2 min verlängert. Auch nach Durchlaufen der längeren Reaktionszeiten war kein PCR-Produkt feststellbar.

6.4.2.2 Primer-Extension-Reaktion mit Enzym-Chips

Zusätzlich zur PCR wurden auch Primer-Extension-Reaktionen durchgeführt, um der immobilisierten Polymerase ein vereinfachtes Reaktionsumfeld mit einem kleinen synthetischen Template statt eines Plasmides zu bieten. Dabei wurde das gleiche Primer-Template-System wie in den vorangegangenen Untersuchungen mit den Polymerasevarianten in Lösung verwendet (s. Kap. 5.1). Aufgrund der Größe der Chips mußte das Reaktionsvolumen auf 100 µl erhöht werden und die Reaktionen in Mikrotiterplatten mit flachem Boden durchgeführt werden, damit die Chips komplett mit Reaktionslösung bedeckt waren. Es wurde Templ1 verwendet und als einziges Nukleotid dGTP zugegeben. Als Positivkontrolle wurde Enzym in Lösung eingesetzt.

Neben der kovalenten Anbindung des Enzyms an die Wafer bestand grundsätzlich die Möglichkeit der unspezifischen Adsorption an der Siliziumoberfläche. Um auszuschließen, daß nicht kovalent gebundenes Enzym sich unter den Reaktionsbedingungen von der Oberfläche löst und dann durch eine Polymerisationsreaktion in Lösung ein falsch positives Signal ergibt, wurden die Wafer zunächst einer Vorbehandlung unterzogen. Dazu wurden die Enzym-Chips zunächst mit einer Reaktionslösung überschichtet, die bis auf das dGTP komplett war (s. Kap. 10.4.7.5), und einem verkürzten PCR-Programm mit drei Temperaturzyklen ausgesetzt. Parallel wurden in derselben Mikrotiterplatte die gleiche Anzahl Reaktionslösungen, die bis auf das Enzym komplett waren, derselben Prozedur unterzogen. Nach Abschluß dieser Vorinkubation wurden die Wafer aus der ersten Lösung entnommen und in die zweiten Lösungen ohne Enzym überführt. Der erste Satz an Reaktionslösun-

gen wurde durch die Zugabe von dGTP komplettiert und die gesamte Mikrotiterplatte einem zweiten, längeren Temperaturprogramm unterworfen. Nach Ablauf der Reaktion wurden die Reaktionsansätze wie in Kapitel 5.2 beschrieben für die massenspektrometrische Analyse konditioniert. Die Chips verblieben dabei während der Inkubation mit den Streptavidin-Beads in der Lösung und die Inkubationszeit wurde auf 1 h verlängert. Nach der ersten magnetischen Separation wurden die Chips entfernt, da sie in den nächsten Schritten die Abtrennung der Beads vom jeweiligen Überstand störten. Die Probenkonditionierung erfolgte hier manuell, da die Probenanzahl relativ gering war. Die Auftragung auf den SpectroChipTM erfolgte automatisiert und vierfach je Probe mit einem Nanoplotter. Die massenspektrometrischen Messungen wurden automatisiert durchgeführt.

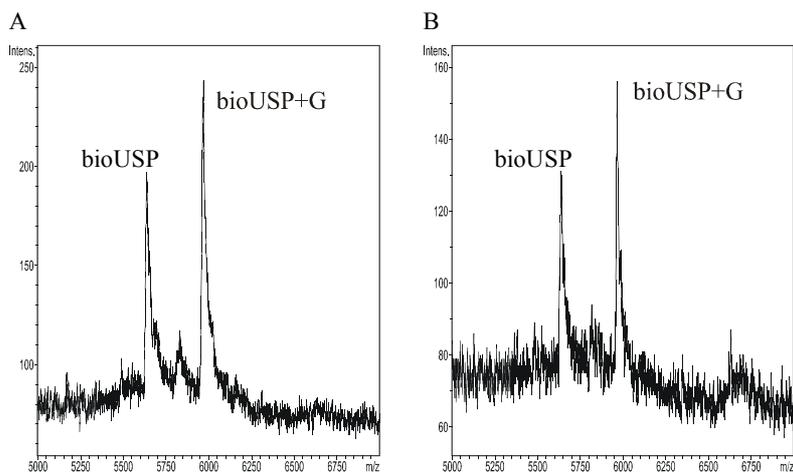
Neben den "Enzym-Wafern" wurden in der Immobilisierungsreaktion parallel unmodifizierte und aminomodifizierte Chips denselben Bedingungen ausgesetzt. Diese wurden ebenfalls in Primer-Extension-Reaktionen untersucht. Die Auswertung der erhaltenen Spektren ergab für die drei Chip-Typen ein sehr unterschiedliches Bild (s. Abb. 6-3). Im Beisein der unmodifizierten Chips wurde der Primer anteilig um ein dGTP verlängert. Dies geschah auch in dem Reaktionsansatz, bei dem nach dem Durchlaufen des Temperaturvorprogramms der Chip entfernt wurde und die Reaktion erst in Abwesenheit des Chips gestartet wurde. Unter den Bedingungen der Immobilisierungsreaktion wurde unspezifisch Polymerase adsorbiert und während des Durchlaufens des Vorprogramms wieder in die Lösung abgegeben. Dabei ist offensichtlich auch die Aktivität der Polymerase erhalten geblieben. Nach dem Überführen in die zweite Reaktionslösung wird erneut Polymerase in die Lösung abgegeben und führt erneut zu einer anteiligen Reaktion, obwohl vorher in der Proteinmengenbestimmung kein Protein auf den Chips nachgewiesen werden konnte. Beim aminomodifizierten Wafer ergibt sich ein ähnliches Bild, mit dem Unterschied, daß der Primer um einen geringeren Anteil verlängert wurde. Die Beschaffenheit der Oberfläche hat demnach einen deutlichen Einfluß auf die Menge des unspezifisch adsorbierten Proteins. Das hydrophobe, unmodifizierte Silizium bindet deutlich mehr Enzym als die aminomodifizierte, hydrophile Oberfläche, so daß mehr verlängerter Primer gebildet werden kann. Die Vorinkubationszeit ist in beiden Fällen nicht lang genug, um die adsorbierte Polymerase komplett von der Oberfläche zu lösen. Die Mengenverhältnisse zwischen Primer und Produkt sind bei beiden Chipsorten für die Reaktion mit vorinkubiertem Chip und ohne Chip in etwa gleich.

Für die aktivierten Wafer, die das gebundene Enzym tragen sollten, war dagegen in beiden Ansätzen

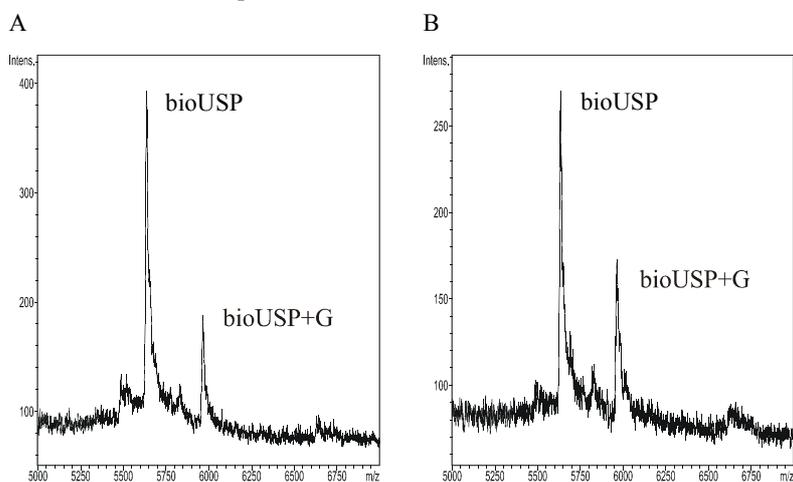
keine Reaktion festzustellen. Es befindet sich also kein polymerase-aktives Enzym auf dem Chip. Daraus kann man mehrere Schlußfolgerungen ziehen: Es findet an dieser Oberfläche keine unspezifische Adsorption statt bzw. das Enzym wird zwar adsorbiert, kann aber nicht mehr renaturiert werden. Alternativ ist denkbar, daß das Enzym zwar gebunden wird, dabei aber seine Aktivität verliert. Das Problem der Inaktivierung durch Immobilisierung ist in der Literatur bekannt^{147,133,134}. Liegt die funktionelle Gruppe des Enzyms, über die die Anbindung erfolgt, zu nahe am aktiven Zentrum, kann das die Aktivität aus sterischen Gründen verringern oder sogar zur kompletten Inaktivierung führen. Da die Polymerase sterisch sehr anspruchsvolle Substrate verwendet, ist das auch in diesem Fall denkbar.

6 Versuche zur Immobilisierung der Taq-Polymerase

unmodifizierter Chip



aminomodifizierter Chip



aktivierter Chip

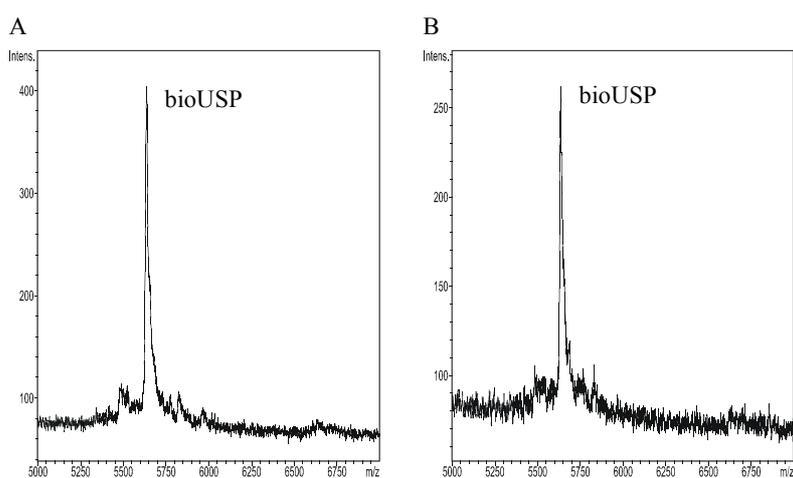


Abb. 6-3: MALDI-TOF-Massenspektren der Primer-Extension-Reaktionen mit vorbehandelten Chips

A: Vorinkubation mit Chip, Reaktion ohne Chip

B: Vorinkubation ohne Chip, Reaktion mit Chip

7 Diskussion

Für die Umsetzung moderner biotechnologischer Konzepte werden in zunehmendem Maße Enzyme mit außergewöhnlichen Substrateigenschaften benötigt. Insbesondere neu entwickelte Sequenzierungstechniken, aber auch die Synthese von DNA- und RNA-Molekülen aus chemisch modifizierten Bausteinen, um sie z.B. als Katalysatoren einzusetzen, beruhen auf der Verfügbarkeit von DNA- und RNA-Polymerasen, die ein breites Spektrum modifizierter DNA bzw. RNA synthetisieren können. Dazu müssen entweder Polymerasen identifiziert werden, die sich durch Kompatibilität mit modifizierten Nukleotiden und modifizierter DNA auszeichnen, oder bereits bekannte Polymerasen so modifiziert werden, daß sie auch nicht native Substrate akzeptieren. Dies geschieht entweder durch einen rationalen Ansatz, indem durch Sequenzvergleiche⁴⁹ homologer Enzyme und Röntgenstrukturanalyse^{47,48} essentielle Aminosäurereste identifiziert und gezielt ausgetauscht werden, oder durch Zufallsmutagenese, bei der eine Vielzahl von Enzymvariationen erzeugt und untersucht werden müssen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden gezielt zwei Aminosäurereste der DNA-Polymerase I aus *Thermus aquaticus* ausgewählt, von denen aus vorangegangenen Untersuchungen eine entscheidende Rolle bei der Substraterkennung bekannt war. Der Austausch der Aminosäure Phenylalanin an Position 667 gegen Tyrosin ermöglicht den ddNTP-Einbau^{66,97}. Zusätzlich spielt der Aminosäurerest Tyrosin an Position 671 eine wichtige Rolle bei der Erkennung der korrekten Geometrie der Substrat/Template/Produkt-Struktur⁸⁴. Die Auswirkung einer Mutation an dieser Position auf die dNTP/rNTP-Diskriminierung ist auch am Beispiel der homologen T7 RNA Polymerase belegt⁸⁵. Bei der Reversen Transkriptase aus *MoMLV* führt eine Veränderung an dieser Position zu einer RNA-Polymeraseaktivität⁹⁸.

Auf der Grundlage eines bereits bestehenden Expressionssystems^{76,148} für eine um die aminoterminalen 5'-3'-Exonukleasedomäne verkürzte Taq-Polymerase (TAQ) konnten erfolgreich 13 Varianten kloniert und exprimiert werden. Dabei wurde Tyrosin an Position 671 gegen Phenylalanin (TAQF, TAQF) unter Verlust der Funktion der Wasserstoffbrückenbindung eingetauscht. Die räumliche Struktur und die aromatischen Eigenschaften blieben erhalten. Der aromatische Charakter wurde auch durch die Einführung von Tryptophan und Histidin (TAQW, TAQH) beibehalten, durch die

Verwendung von Threonin und Serin (TAQT, TAQS) aber aufgehoben. Bei den beiden letzteren Aminosäuren bleibt dafür die Möglichkeit zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen erhalten. Die Einführung von Prolin (TAQP) bewirkt eine signifikante strukturelle Veränderung des aktiven Zentrums. Alle Varianten an Position 671 wurden jeweils als Einzelmutationen und in Kombination mit F667Y kloniert (TAQY, TAQYW, TAQYP, TAQYH, TAQYT und TAQYS, vgl. Tab. 3-1). Durch den carboxyterminalen His-Tag und ein vereinfachtes Zellaufschlußverfahren war eine schnelle und einfache Aufreinigung der Varianten durch Metallchelate-Affinitätschromatographie¹⁴⁹ möglich. Dabei bringt die Affinitätschromatographie alle Vorteile eines Festphasenverfahrens mit sich: Die Agarose-Matrix mit dem gebundenen Protein kann durch einfaches Waschen und Filtration leicht von Verunreinigungen getrennt werden. Die sonst üblichen, aufwendigen Reinigungsverfahren, wie z.B. HPLC, entfallen daher. Die Quantifizierung der erhaltenen Proteinmengen ergab einen einheitlichen Wert für alle Varianten von ca. 2 mg/l Kulturmedium. Dies liegt deutlich über den literaturbekannten Werten für die Expression der Taq-Polymerase in voller Länge^{46,148} und etwas unter dem Wert für das Stoffel-Fragment, einem vergleichbaren Taq-Polymerase-Fragment⁸⁴.

Die Expressionsrate fremder Gene im Wirtsorganismus *E. coli* kann u.a. durch die spezielle Codon-Auswahl der verschiedenen Lebewesen beeinflusst werden¹⁵⁰. Da der genetische Code degeneriert ist, es für die meisten Aminosäuren also mehr als ein Codon gibt, kann sich die Häufigkeit der Verwendung synonymen Codons von Organismus zu Organismus verschieben. Es besteht dabei ein Zusammenhang zwischen den in der Zelle vorhandenen relativen tRNA-Mengen und der Codonauswahl. Gene, die in *E. coli* am stärksten exprimiert werden, enthalten meist die Codons, die der am häufigsten vorhandenen tRNA entsprechen^{151,152}. Im Gen der Taq-Polymerase sind Codons, die auf ein G oder C enden, jedoch deutlich überrepräsentiert; sie werden zu 92 % benutzt⁵¹. Diese Codon-Auswahl unterscheidet sich von der für *E. coli*-Gene und könnte die Translationsrate und somit auch die Akkumulierung der fremden Genprodukte potentiell vermindern. Die zusätzliche Veränderung der Taq-Polymerase-Gensequenz zur Einführung der genannten Mutationen hat offensichtlich keinen weiteren Einfluß auf die Translationsrate und damit auf die Menge an gebildetem Enzym, da die Ausbeute für alle Varianten und die Wildtypsequenz gleich ist. Ein weiteres Problem für die Wirtszelle bei der Akkumulation eines fremden Genprodukts kann dessen biologische Aktivität darstellen. Obwohl die spezifische Aktivität der thermophilen Polymerase bei der Wachstumstemperatur der mesophilen *E. coli* nur wenige Prozent der Aktivität beim Temperaturoptimum beträgt, be-

steht die Möglichkeit, daß die Polymerase durch ihre Fähigkeiten zur DNA-Bindung die Transkription der Wirtszellen, deren Genexpression und damit den Zellstoffwechsel stören kann. Die später nachgewiesenen Unterschiede in der biologischen Aktivität der Polymerasevarianten hatten auf die Translationsrate aber offensichtlich keinen Einfluß.

Zur Charakterisierung der Taq-Polymerasevarianten wurden verschiedene Methoden eingesetzt. In ersten Untersuchungen wurde zunächst die PCR verwendet, um eine erste grobe Abschätzung des Einflusses der Mutationen auf die Enzymaktivität zu erhalten. Dabei ergab sich, daß neben dem Wildtypenzym TAQ nur die Varianten TAQY, TAQF und TAQYF eine durch die PCR nachweisbare Polymeraseaktivität zeigten. An Position 671 wird unter den in dieser Arbeit untersuchten Modifikationen nur der konservative Austausch von Tyrosin gegen Phenylalanin ohne Aktivitätsverlust toleriert. Die genauere Bestimmung der spezifischen Aktivität der Polymerasevarianten wurde daher auf eine Auswahl aktiver Modifikationen beschränkt. Der klassische radioaktive Assay zur Aktivitätsquantifizierung wurde lediglich für TAQ, dem Enzym mit der Wildtypsequenz, verwendet. Die ermittelte spezifische Aktivität von 22540 U/mg stimmt gut mit dem Literaturwert für die Wildtyp-Taq-Polymerase überein. Alternativ dazu wurde ein Assay verwendet, der ohne den Einsatz von Radioaktivität auskommt. Dabei werden während der Reaktion gleichzeitig Digoxigenin- und Biotinmarkiertes dUTP in das Produkt inkorporiert. Die Biotin-Markierung dient der Abtrennung des Produktes von den überschüssigen, unverbrauchten Nukleotiden, während die Digoxigenin-Markierung der Quantifizierung dient. Der mit diesem Nachweis für TAQ erhaltene Wert lag nur etwa halb so hoch wie das Ergebnis des radioaktiven Tests. Da Digoxigenin-markiertes dUTP mit geringerer Effizienz als die natürlichen Substrate inkorporiert wird, ist dieses Ergebnis nicht überraschend. Die höchste Aktivität in diesem Nachweisverfahren konnte für das modifizierte Enzym TAQY ermittelt werden. Mit 23357 U/mg lag die Aktivität des Enzyms 246 % über dem Ergebnis für TAQ beim nicht-radioaktiven Nachweis. Die markierten Nukleotide werden, bedingt durch den Austausch F667Y bei der mutagenisierten Polymerase, offensichtlich leichter akzeptiert und effizienter eingebaut. TAQF und TAQYF zeigen in diesem Assay, obwohl sie in der Lage sind, in der PCR ein Produkt zu erzeugen, eine deutliche niedrigere spezifische Aktivität, die bei 14 % respektive 18 % des Wertes für TAQ liegen. Die zusätzliche Mutation F667Y hat keinen entscheidenden Einfluß mehr auf die spezifische Aktivität. Der Einfluß der Aminosäure an Position 671 auf die Polymeraseaktivität ist hier offensichtlich entscheidend.

Für die Untersuchung der Substratspezifität sollte ein leistungsfähiges System etabliert werden, um auf einfache Weise eine Vielzahl von Polymerasen untersuchen zu können. Üblicherweise wird für derartige Untersuchungen an modifizierten Enzymen eine einfache Primer-Extension-Reaktion verwendet, bei der ein synthetischer Primer Template-abhängig um eine geringe Anzahl Basen von der zu untersuchenden Polymerase verlängert werden kann. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgt in der Regel gelelektrophoretisch. Der Einsatz der Gelelektrophorese hat aber mehrere Nachteile: Bei diesem Verfahren wird die Mobilität des Moleküls in der Gelmatrix gemessen, die jedoch nicht immer direkt mit dem Molekulargewicht korreliert. Durch eine Vielzahl sequenzspezifischer Effekte, Sekundärstrukturen und anderer Interaktionen mit der Gelmatrix wird das Laufverhalten der DNA-Fragmente beeinflusst und eine korrekte Auswertung erschwert.

Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie hat sich in den vergangenen Jahren als leistungsfähige Untersuchungsmethode für Biomoleküle etabliert und insbesondere auf dem Gebiet der Nukleinsäureanalyse große Fortschritte gemacht. Als schnelle, kostengünstige und exakte Methode bietet sie sich daher in diesem Fall als Ersatz für die Gelelektrophorese an. Mit dem Molekulargewicht wird hier eine definierte physikalische Größe bestimmt, die von einer indirekten Reporterfunktion unabhängig ist. Die Weiterentwicklung der Technik des Probenauftrags ermöglicht eine halbquantitative Auswertung der Massenspektren. Die Verwendung von piezoelektrischen Pipetten zur Probenpräparation im Nanolitermaßstab vermindert die Heterogenität der Analytkristalle, die Qualität und Reproduzierbarkeit der Spektren wurde dadurch stark verbessert⁹⁹. Die uniforme Matrix-Analyt-Zusammensetzung auf den Chips ermöglicht die quantitative Auswertung der massenspektrometrischen Daten als Berechnung der Fläche unter den Peaks. Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand von verschiedenen Gemischen aus synthetischen Oligonukleotiden bekannter Zusammensetzung gezeigt werden, daß innerhalb eines Bereiches von 10 % - 90 % die Standardabweichung der ermittelten Werte bei maximal 3 % lag. Der Vergleich zwischen theoretischen und aus den Massenspektren ermittelten Werten ergab Abweichungen von maximal 5 %. In den Randbereichen unter 10 % und über 90 % wurden die Daten unzuverlässig und wenig reproduzierbar. Die entsprechenden Spektren konnten daher nicht quantitativ ausgewertet werden.

Die Kombination aus Primer-Extension-Reaktion und massenspektrometrischer, semiquantitativer Analyse wurde zunächst auf die Inkorporation von Desoxyribonukleotiden, dem natürlichen Substrat der Taq-Polymerase, angewandt. Die Ergebnisse konnten die Befunde aus der einfachen

PCR-basierten Untersuchung deutlich differenzieren. Neben den vier PCR-fähigen Enzymen TAQ, TAQY, TAQF und TAQYF waren auch die Varianten TAQW, TAQYW und TAQH in der Lage, den Primer Template-abhängig um 10 Nukleotide zu verlängern. Es treten dabei aber in den entsprechenden Spektren größere Anteile von teilweise verlängertem und unverlängertem Primer auf. Die Variante TAQH konnte den Primer durch die Anwendung der zyklisierten Temperaturbedingungen um bis zu fünf Nukleotide verlängern. TAQS, TAQYS, TAQT und TAQYT waren lediglich zum Einbau eines Nukleotids in der Lage, bei TAQP und TAQYP war gar keine Polymeraseaktivität mehr detektierbar. Die Einführung von Prolin in das aktive Zentrum führt wahrscheinlich zu einer lokalen Verzerrung, die eine komplette Inaktivierung des Enzyms bewirkt. Der Verlust einer Aminosäure mit aromatischem Charakter führt ebenfalls zu einer weitgehenden Inaktivierung. Der Einbau eines Nukleotides ist grundsätzlich noch möglich, eine Verlängerung darüber hinaus erfolgt aber nicht. Offensichtlich wird der aromatische Anteil des Aminosäurerestes benötigt, um mit dem ersten Basenpaar der Primer-Template-Duplex in Wechselwirkung zu treten und so eine Stabilisierung des Reaktionskomplexes zu bewirken. Die Aminosäuren Tryptophan und Histidin scheinen zumindest bedingt dazu befähigt zu sein. Das Auftreten von unverlängertem und teilweise verlängertem Primer in den Produktmischungen kann als Hinweis auf eine verlangsamte Reaktion, aber auch auf eine verringerte Stabilität des Reaktionskomplexes gewertet werden. Die Aminosäureposition Y671 ist homolog mit Y766 in der DNA-Polymerase I aus *E. coli*. Ein Austausch des Tyrosins an Position 766 gegen Serin führt zu einer verringerten DNA-Bindungsstärke⁶¹ und einem damit einhergehenden verstärkten Vorkommen von Insertionsmutationen⁶². Es scheint, als würde der Einfluß von Y766 auf die dNTP-Diskriminierung über eine Wechselwirkung mit dem Template erfolgen. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Röntgenstrukturanalysen der Taq-Polymerase im ternären Komplex mit Primer-Template-Duplex und ddCTP⁸² ist dieser Einfluß auch für den homologen Tyrosinrest Y671 wahrscheinlich. Die geringere Aktivität der in dieser Arbeit erzeugten Mutanten würde sich dann durch eine geringere Stabilität des Enzym-Substrat-Komplexes erklären lassen, der durch mangelnde Interaktion mit dem Template verursacht wird. Dies ist besonders ausgeprägt, wenn der Aminosäurerest in dieser Position keinerlei aromatischen Charakter mehr besitzt. Diese Taq-Polymerasevarianten verlieren dann ihre Aktivität. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden nur die aktiven Varianten TAQ, TAQY, TAQF, TAQYF, TAQW, TAQYW, TAQH und TAQYH für weiterführende Untersuchungen ausgewählt.

Beim Einsatz von Ribonukleotiden in die Primer-Extension-Reaktion konnte keine Verlängerung des Primers über das erste Nukleotid hinaus detektiert werden. Die Reaktion ist also prinzipiell noch möglich, wird aber nach einmaliger Inkorporation nicht weitergeführt. Diese Resultate sind in guter Übereinstimmung mit entsprechenden Befunden bei der DNA-Polymerase I aus *E. coli*. Offensichtlich differenziert das Enzym zwischen den unterschiedlichen Triphosphat-Klassen nicht so stark wie zwischen DNA und RNA 3'-Ende als Substrat der Polymersisationsreaktion. Diese Ergebnisse sind nicht überraschend, da eine strenge Diskriminierung zwischen Desoxyribonukleotiden und Ribonukleotiden *in vivo* aufgrund der unterschiedlichen Funktionen in der Zelle sinnvoll ist. Die vorgenommenen Mutationen scheinen keine Aufweichung dieser Präferenz bewirkt zu haben. Die Inhibierung der Verlängerungsreaktion kann durch zwei mögliche Mechanismen erklärt werden: Der Initiationskomplex ist nach Einfügen des ersten Ribonukleotids wegen der veränderten Geometrie der Wasserstoffbrücken arretiert und fängt die Polymerase in unproduktiven Komplexen. Zum anderen könnten Primer, die einmal am 3'-Ende um ein Ribonukleotid verlängert wurden, nicht mehr zum Aufbau eines produktiven Komplexes beitragen. Während der Abschlußphase dieser Arbeit ist es *G. Xia et al.*¹⁵³ gelungen, durch einen Prozess der *in vitro*-Evolution Taq-Polymerase-Varianten mit der Fähigkeit zur RNA-Synthese zu entwickeln. Diese Varianten inkorporieren rNTPs mit der gleichen Effizienz wie das Wildtypenzym die nativen dNTP-Substrate. Diese Enzyme tragen jeweils mehrere Mutationen an Positionen, die über die O-Helix des Enzyms hinausgehen. Offensichtlich sind weitreichendere Veränderungen der Struktur des aktiven Zentrums notwendig, um eine prozessive Inkorporation von rNTPs zu erreichen.

Neben natürlich vorkommenden Nukleotiden wurden in dieser Arbeit auch eine ganze Reihe modifizierter, synthetischer Nukleotidsorten untersucht. α -S-dNTPs werden durch alle untersuchten Polymerasevarianten zwar inkorporiert, jedoch geschieht dies mit geringerer Effizienz als bei den nativen dNTPs. TAQ, TAQY, und TAQF können den Primer vollständig um bis zu 10 α -S-dNTPs verlängern, es treten aber in erhöhtem Maße Kettenabbruchprodukte auf. Eine verlangsamte Reaktion bei der Inkorporation der α -S-dNTPs, die in den Spektren deutlich wird, erklärt auch die Abwesenheit von PCR-Produkten in entsprechenden Versuchen, bei denen die Desoxyribonukleotide komplett durch die Thioanaloga ersetzt worden sind. Tauscht man nur eine Nukleotidsorte gegen ihr Thioanalogon aus, ist es dagegen möglich, detektierbares PCR-Produkt zu erzeugen. Auch beim anteiligen Ersatz eines Nukleotides wird stochastisch das α -dNTP inkorporiert und nicht zugunsten des natürlichen Substrates komplett verdrängt¹⁵⁴. Das Schwefelatom ist im Vergleich zum Sauer-

stoffatom größer und weniger elektronegativer, was zu einer geringeren Affinität zum Magnesium(II)-Ion führt, das für die Reaktion essentiell ist¹⁵⁵. Die Geschwindigkeit der Bildung der Phosphodiesterbindung sollte daher gegenüber der Reaktion mit dem unmodifizierten Nukleotid geringer sein. Außerdem ist zur Erzeugung eines vollständigen Primer-Extension-Produkts ein zyklisiertes Temperaturprogramm nötig, das die Möglichkeit zur wiederholten Neubildung des Reaktionskomplexes bietet. Diese Möglichkeit zur Neubildung könnte eine Arretierung des Reaktionskomplexes nach der ersten Inkorporation verhindern und so eine weiterlaufende Reaktion ermöglichen. Die modifizierten 5'-Enden stünden dann offensichtlich als nutzbare Primer zur Verfügung. Die unterschiedlich stark ausgeprägte Fähigkeit zur Inkorporation dieser Nukleotidmodifikationen durch die Polymerasevarianten stimmt mit der spezifischen Aktivität der Enzyme überein. Durch die vorgenommenen Mutationen ist hier keine Verbesserung erzielt worden.

Die übrigen modifizierten Nukleotide lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen. Bei einer Gruppe wurde die Modifikation an der Base vorgenommen, bei der anderen an der Riboseeinheit. Die Modifikationen an der Base wurden mit unterschiedlicher Effizienz von den Polymerasevarianten akzeptiert. Bei 2'-Desoxy-7,9-Dideaza-7-oxoadenosin-5'-triphosphat (dA*TP) ist die N-glykosidische Bindung durch eine C-glykosidische Bindung ersetzt worden und an Position 7 der Purinbase befindet sich statt des Stickstoffs ein Sauerstoffatom. Diese Modifikationen werden in der Primer-Extension-Reaktion von allen Polymerasevarianten akzeptiert und inkorporiert. Von den PCR-fähigen Enzymen sind TAQ und TAQY sowie das Wildtypenzym in der Lage aus dieser Nukleotidsorte ein detektierbares PCR-Produkt zu erzeugen, was durch die Anwesenheit der Detergenzien Triton X-100 und CHAPS erheblich verbessert wird. Die vorgenommenen Veränderungen an der Base werden also problemlos akzeptiert. Die Mutationen der Polymerasevarianten haben darauf keinen detektierbaren Einfluß.

Das an Position 5 der Base modifizierte OH-dCTP wird ebenfalls problemlos in der Primer-Extension-Reaktion und nach Pufferoptimierung auch in der PCR von den PCR-fähigen Varianten akzeptiert. Dieses Ergebnis überrascht nicht, da sich die Fluoreszenzmarkierung der Pyrimidindidesoxynukleotide für die Sanger Sequenzierung an eben dieser Position befindet^{156,157}. Diese im Vergleich zur Hydroxylgruppe sterisch und elektronisch sehr viel aufwendigeren Modifikationen werden jedoch von Taq-Polymerase-Varianten problemlos akzeptiert. Auch weitere Untersuchungen zeigen die Flexibilität der Polymerase an dieser Position⁶⁷. Auffällig ist sowohl bei OH-dCTP als auch bei

dA*TP, daß die modifizierten Nukleotide durch die verkürzten Polymerasevarianten besser inkorporiert werden als durch das Wildtypenzym. Möglicherweise spielt dabei die Abwesenheit der deletierten Exonukleasedomäne eine Rolle. Es wurde beschrieben, daß durch die aminoternale Verkürzung die Fehlerrate bei der Nukleotidinkorporation abgesenkt wird¹⁵⁸. Der Grund dafür wird in der Entfernung von DNA-Bindungsstellen vermutet. Dies bewirkt, daß DNA-Produkte nach Einbau einer falschen Base nicht verlängert werden, da sich die Polymerase vor dem Verlängerungsschritt wegen zu schwacher Bindung wieder vom Template löst. Umgekehrt kann dies bedeuten, daß leichte strukturelle Änderungen im Produkt, bei denen es sich nicht um Basenfehlpaarungen im Sinne von Watson und Crick handelt, durch die schwächere Bindung eher toleriert werden.

Bei den beiden Nukleotidmodifikationen S-dCTP und S-dTTP ist an der Position 2 der Pyrimidinbase der Sauerstoff der Ketogruppe durch ein Schwefelatom ersetzt. Beide Nukleotide werden in der Primer-Extension-Reaktion von den Polymerasevarianten akzeptiert, es war aber auch durch Variation der Pufferzusammensetzung nicht möglich, mit ihnen ein PCR-Produkt zu erzeugen. *Guo et al.*¹⁵⁹ konnten zeigen, daß Pyrimidinanaloga, bei denen die 2-Ketogruppe komplett eliminiert wurde, von der Taq-Polymerase nicht als Substrat erkannt werden. Die Ketogruppe ist offenbar essentiell für die Verwendung der Nukleotide als Substrat, wahrscheinlich durch spezifische Wechselwirkungen mit Aminosäureresten des aktiven Zentrums der Polymerase. Darüber hinaus ist beim Cytosin die 2-Ketogruppe direkt an der spezifischen Basenpaarung als Akzeptor für eine der Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt. Der Austausch des Carbonylsauerstoffs gegen ein Schwefelatom verändert möglicherweise durch die Größe des Atoms und die geringere Elektronegativität sowohl die Wechselwirkung mit dem Enzym als auch die spezifische Basenpaarung. Eine einfache Verlängerung des Primers durch die Taq-Polymerase konnte aber durch die Primer-Extension-Reaktion nachgewiesen werden. Die Reaktion an sich ist also prinzipiell möglich, d.h. das modifizierte Nukleotid wird als Substrat erkannt. Die Diskriminierung muß daher an einer anderen Stelle erfolgen. Möglicherweise wird eine weitere Elongation nach der Inkorporation der Thioanaloga verhindert. *Collazo*¹⁵⁴ konnte zeigen, daß *Pfu(exo⁻)*-DNA-Polymerase in einer PCR mit einem zu amplifizierenden 48mer S-dCTP nicht an zwei aufeinanderfolgenden Positionen inkorporieren kann und die Reaktion an dieser Stelle in der Sequenz abbricht. Eine wenig effiziente Verlängerung über die eingebauten Nukleotidanaloga hinaus könnte daher auch bei der Taq-Polymerase der Grund für die Abwesenheit eines PCR-Produktes sein.

Im Unterschied zu den übrigen getesteten dNTPs ist 5'-S-dTTP nicht an der Base, sondern an der Riboseeinheit modifiziert. Es wird weder in der Primer-Extension-Reaktion noch in der PCR von den Polymerasevarianten oder der Wildtyppolymerase akzeptiert. Der Grund für die fehlende Inkorporation könnte in der veränderten Molekülgeometrie liegen. Im natürlichen Nucleosidtriphosphat erfüllt der Sauerstoff an C-5' die Funktion der "bindenden Einheit" zwischen dem Triphosphatrest und der Nucleosid-Komponente. Sein Austausch durch eine Einheit mit veränderten chemischen Eigenschaften kann daher einen entscheidenden Einfluss sowohl auf die Konformation als auch auf die elektronischen Eigenschaften der modifizierten Nucleosidanaloga haben. Insbesondere die direkt an der Reaktion zur Bildung der Phosphodiester-Bindung beteiligte α -Phosphatgruppe ist davon betroffen. Der Austausch von Sauerstoff gegen Schwefel an dieser Position bewirkt eine Veränderung des Bindungswinkels der von dieser Position ausgehenden Bindungen ($O = 105^\circ$, $S \sim 92^\circ$). Dieser bestimmt die Positionen der Triphosphat-Gruppe und des Zuckers im Molekül und ist damit für die Strukturkomplementarität bei der Substraterkennung entscheidend. Auch die Größe des Schwefelatoms sowie seine geringere Elektronegativität können hier eine Rolle spielen. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen deuten darauf hin, daß eine Modifizierung an Position C-5' einen starken Einfluß auf die Substraterkennung vieler anderer Polymerasen hat^{160,161,162,163}. Viele der untersuchten Polymerasen konnten Modifikationen dieses Typs überhaupt nicht als Substrat akzeptieren, und selbst bei positiv getesteten DNA-Polymerasen, wie z.B. bei der von *Shirokova*¹⁶⁴ untersuchten DNA-Polymerase I aus *E. coli*, waren die Inkorporationsraten stark herabgesetzt. Die bei der Taq-Polymerase vorgenommenen Mutationen haben in diesem Fall keine Verbesserung bewirkt. Bei dieser Versuchsreihe zeigte sich aber die Überlegenheit der Massenspektrometrie im Vergleich zur Gelelektrophorese: Es konnte ein Verlängerungspeak im Massenspektrum detektiert werden, bei dem mit Hilfe der exakten Masse das inkorporierte Nucleotid als dTMP identifiziert werden konnte. Dies lässt als Schluss nur zu, daß die 5'-S-dTTP-Lösung mit unmodifiziertem dTTP verunreinigt war. Durch Gelelektrophorese wäre diese Unterscheidung nicht möglich gewesen, was zu einer falschen Einschätzung der Substratspezifität geführt hätte.

Die Genauigkeit der DNA-Synthese ist abhängig von der Fähigkeit des aktiven Zentrums der DNA-Polymerase, zwischen korrektem und inkorrektem Substrat¹⁶⁵, d.h. komplementären und nicht-komplementären dNTPs sowie korrekt und fehlgepaarten 3'-Primerenden¹⁶⁶ zu unterscheiden. Neben der Sequenzabhängigkeit von Fehleinbauten besteht ein starker Einfluß der verwendeten Reaktionsbedingungen^{54,55} auf die Genauigkeit der Polymerasereaktion, wie z.B. die Pufferzusammensetzung

und der pH-Wert, aber auch die Anzahl der anwesenden Nukleotidsorten und die Länge der Reaktionszeit. Der Einfluß der Base im Enzym-Substrat-Komplex bei der DNA-Synthese ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Fähigkeit der Basen zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit bestimmter räumlicher Ausrichtung repräsentiert dabei nicht allein das stabilisierende Element für die spezifische Basenpaarung. Untersuchungen mit einem Thymidintriphosphatanalogon¹⁶⁷, bei dem die Sauerstoffatome der Carbonylgruppen durch Fluor ersetzt wurden, zeigen, daß dieses Nukleotid inkorporiert wird, ohne die Sequenz-Selektivität bei der Basenpaarung herabzusetzen. Das derart modifizierte Nukleotid kann zwar keine "echten" Watson-Crick-Wasserstoffbrückenbindungen mehr ausbilden, weist jedoch im Vergleich zum natürlichen Thymidinsubstrat keine signifikanten sterischen Veränderungen auf. Die relativ hohe Genauigkeit bei der Basenpaarung kann hier in erster Linie durch die Molekülgeometrie erklärt werden. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, daß die DNA-Polymerase die Spezifität bei der Insertion der Nukleotide erhöhen kann, wenn ihr aktives Zentrum so beschaffen ist, daß es die Ausbildung der Watson-Crick-Geometrie unterstützt^{168,169}. Dies geschieht neben der reinen sterischen Anordnung der Substrate im aktiven Zentrum sicher auch über spezifische Wechselwirkungen der Aminosäureseitenketten des Enzyms mit dem hinzukommenden Nukleotid. Die beobachtbaren Fehleinbauten der Mutanten TAQW und TAQYW können daher durch eine Verzerrung des aktiven Zentrums an der Bindungsstelle für die Primer-Template-Duplex erklärt werden.

Neben den Untersuchungen der Polymerasevarianten sollte die Möglichkeit verfolgt werden, die Taq-Polymerase an einer festen Phase zu immobilisieren. Immobilisierte Enzyme bieten allgemein die Vorteile einer einfachen Abtrennung vom Reaktionsprodukt und der Wiederverwertbarkeit. Insbesondere bei DNA- und RNA-Polymerasen bieten sie sich zu kinetischen Untersuchungen an. Es wurde dazu eine Siliziumoberfläche aminofunktionalisiert und mit dem homobifunktionellen Linker DITC, der mit primären Aminogruppen eine Reaktion eingeht, aktiviert. Diese Oberflächen wurden dann mit einer Taq-Polymerase-Variante umgesetzt, an deren Carboxyterminus sich zwei zusätzliche Lysinreste befanden, die mögliche Kopplungspartner für DITC sind. Die derartig behandelten Siliziumchips wurden dann in der PCR und der Primer-Extension-Reaktion auf Polymeraseaktivität hin untersucht. Die Menge des immobilisierten Enzyms sollte durch eine Proteinmengenbestimmung nachgewiesen werden. Keine der verwendeten Untersuchungsmethoden lieferte einen Hinweis auf aktives, immobilisiertes Enzym. Durch massenspektrometrische Analysen von Primer-Extension-Reaktionen war es aber möglich, den Einfluß der unterschiedlich behandelten Oberflächen

auf die unspezifische Adsorption sichtbar zu machen. So wird an die unbehandelte Chipoberfläche in größeren Mengen Polymerase adsorbiert. Die Aktivität der Polymerase bleibt nach erneuter Freisetzung in die Lösung erhalten. Dies geschieht in geringerem Ausmaß auch bei der hydrophileren, aminofunktionalisierten Oberfläche, so daß entstandene Verlängerungsprodukte durch die Aktivität des abgelösten Enzyms erklärt werden können. Nur bei der mit DITC aktivierten Oberfläche ließ sich keine Reaktion in Form eines verlängerten Primers nachweisen. Dies kann bedeuten, daß entweder keine Adsorption stattgefunden hat oder daß das adsorbierte Enzym inaktiv ist und auch nach eventueller Ablösung nicht mehr renaturiert werden kann. Möglicherweise befindet sich auch aktives Enzym in kovalent gebundener Form auf der Chipoberfläche, dessen aktives Zentrum durch die Immobilisierung aber zu wenig oder gar nicht zugänglich ist. Dies könnte nur durch weitergehende Mutationsexperimente zur Herstellung von Modifikationen des Enzyms, die an weiteren Positionen Lysinreste tragen, geklärt werden.

Insgesamt konnte durch die erzeugten Polymerasevarianten keine Verbesserung der Inkorporation für die untersuchten modifizierten Nukleotide erreicht werden. Es ist aber gelungen, ein leistungsfähiges und zuverlässiges Untersuchungssystem für die Produkte der Polymerasen zu etablieren, das innerhalb kurzer Zeit exakte Informationen liefert. Die Anwendung der Massenspektrometrie erlaubt durch die Ermittlung des Molekulargewichts in allen Fällen eine exakte Zuordnung des Reaktionsproduktes. So konnten auf diese Weise Verunreinigungen in verschiedenen Nukleotidlösungen auf Anhieb zugeordnet und erklärt werden. Mittels gelelektrophoretischer Analyse wäre dies nicht möglich gewesen. Es gibt bisher keine vergleichbare Methode, die dies leisten kann. Durch die semiquantitative Auswertung, deren Verbesserung durch weiteren technischen Fortschritt in Zukunft erwartet werden kann, ist eine Übertragung auf kinetische Untersuchungen von anderen enzymatischen Reaktionen mit DNA möglich.

8 Zusammenfassung

Für die Hochdurchsatzanalyse der Substratspezifität von DNA wurde ein leistungsfähiges System unter Nutzung der MALDI-TOF-Massenspektrometrie etabliert. Dazu wurden zunächst auf der Basis eines bestehenden Expressionssystems 13 Varianten der Taq-Polymerase kloniert, bei denen die Aminosäuren Phenylalanin an Position 667 und Tyrosin an Position 671 in der O-Helix der Polymerasedomäne des Enzyms ausgetauscht wurden. An Position 667 wurde die Aminosäure Tyrosin eingeführt (F667Y), an Position 671 jeweils die Aminosäuren Phenylalanin, Serin, Threonin, Tryptophan, Histidin und Prolin. Alle Varianten an Position 671 wurden sowohl als Einzelmutationen als auch in Kombination mit F667Y kloniert. Die Enzymvarianten wurden nach einem Standardverfahren exprimiert und durch Metallchelate-Affinitätschromatographie isoliert. Vorläufige Aktivitätsuntersuchungen durch den Einsatz in standardisierten PCRs ergaben, daß an Position 671 nur die Einführung von Phenylalanin (Y671F) ohne erkennbaren Aktivitätsverlust toleriert wurde. Gelelektrophoretisch detektierbare PCR-Produkte konnten bei den übrigen Polymerasevarianten nicht nachgewiesen werden. Daher wurde die spezifische Aktivität einer Auswahl der Polymerasevarianten durch einen nicht-radioaktiven Assay bestimmt. Die Aktivität der Einzelmutation F667Y lag bei 246 % des Wertes für die Enzymvariante TAQ mit der Wildtypsequenz in der O-Helix. Für die Einzelmutation Y671F und die Kombination Y671F/F667Y lag die spezifische Aktivität bei 14 % respektive 18 %.

Zur Untersuchung der Substratspezifität wurde eine Primer-Extension-Reaktion benutzt, bei der ein synthetischer Primer Template-abhängig um bis zu 10 Nukleotide verlängert werden konnte. Die erhaltenen Reaktionsprodukte wurden massenspektrometrisch analysiert. Die Probenkonditionierung, die Probenauftragung und die Vermessung im Massenspektrometer erfolgten automatisiert. Die Möglichkeit zur Software-gestützten semiquantitativen Auswertung der Spektren konnte durch die Analyse von Oligonukleotidmischungen bekannter Zusammensetzung nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse aus der PCR-Untersuchung konnten durch die Analyse von Primer-Extension-Reaktionen differenziert werden: Die Polymerasevarianten mit den Mutationen Y671W, Y671H und die Kombination Y671W/F667Y waren zwar nicht in der Lage ein PCR-Produkt zu erzeugen, konnten aber unter den Bedingungen der Primer-Extension-Reaktion den Primer vollständig um 10 Nukleo-

tide verlängern. Die Enzyme mit den Mutationen Y671S und Y671T sowie ihre Kombinationen mit F667Y konnten den Primer lediglich um ein Nukleotid verlängern, die Kombination Y671H/F667Y konnte dies um bis zu fünf Nukleotide. Lediglich die Enzymvariante Y671P und die Kombination Y671P/F667Y waren sowohl in der PCR als auch in der Primer-Extension-Reaktion inaktiv. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Modifikationen Y671F, Y671W und Y671H sowie ihre Kombinationen mit F667Y für weitere Untersuchungen ausgewählt. Dazu kamen noch das Wildtypenzym und die einfache Mutation F667Y.

Beim Einsatz von Ribonukleotiden konnte keine der untersuchten Polymerasevarianten den Primer über ein Nukleotid hinaus verlängern. Der Einbau von α -S-dNTPs war jedoch möglich. 2'-Desoxy-7,9-Dideaza-7-oxoadenosin-5'-triphosphat, das Modifikationen an der Base trägt sowie 5-Hydroxy-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat, einem Pyrimidinnukleotid mit Modifikation in Position 5 der Base konnten in der Primer-Extension-Reaktion und in der PCR nach Pufferoptimierung erfolgreich eingebaut werden. 2-Thio-2'-desoxycytidin-5'-triphosphat und 2-Thio-2'-desoxythymidin-5'-triphosphat, zwei Pyrimidinnukleotide mit Modifikation an Position 2 der Base wurden zwar in der Primer-Extension-Reaktion von den Polymerasen akzeptiert, eine PCR war mit ihnen aber nicht möglich. Ein Nukleotid mit modifizierter Riboseeinheit (5'-Thio-5'-desoxythymidin-5'-S-triphosphat) wurde weder in der Primer-Extension-Reaktion noch in der PCR akzeptiert.

Zusätzlich wurden Untersuchungen zur Immobilisierung einer Taq-Polymerase mit zwei carboxyständigen Lysinresten auf einer Siliziumoberfläche durchgeführt. Mit einem Silylierungsreagenz aminofunktionalisierte Siliziumchips wurden nach Aktivierung durch Umsetzung mit dem bifunktionellen Linker 1,4-Phenylendiisothiocyanat (DITC) mit den Polymerasevarianten inkubiert. Ein Einfluß der unterschiedlich behandelten Oberflächen auf die unspezifische Adsorption des Enzyms wurde jedoch beobachtet und mittels des vorher etablierten Primer-Template-Systems untersucht. Aktivitätsuntersuchungen der Taq-DNA-Polymerasen nach Immobilisierung bleiben weiteren Untersuchungen vorbehalten.

9 Summary

An efficient high-throughput screening method based on MALDI-TOF mass spectrometry is described which was used to screen thirteen mutants of Taq DNA polymerase for substrate specificity. The recombinant polymerases were cloned using an established expression system employing *E. coli* bacteria. Two amino acid positions in the O-helix of the polymerase domain were investigated: phenylalanine at position 667 was exchanged with tyrosine; tyrosine (671) was exchanged with each, phenylalanine, serine, threonine, tryptophane, histidine, and proline. In a second series of experiments each variant (Y671) was cloned in combination with a second amino acid exchange F667Y. The Taq DNA polymerase mutants were expressed using standard procedures and isolated by immobilized metal ion affinity chromatography. Preliminary investigations with standard PCR showed that the mutation Y671F was tolerated without loss of activity. None of the other variants was able to produce amounts of PCR product detectable in gel electrophoresis. Therefore the specific activity of selected polymerase mutants was determined by a non-radioactive polymerase assay. The enzyme with the single mutation F667Y displayed 246 % activity compared with the wildtype O-helix enzyme. The single mutation Y671F and the combination Y671F/F667Y retained a specific activity of 14 % and, 18 % respectively.

Substrate specificity was further examined by a primer extension reaction based on synthetic primers and templates. Reaction products were analysed by mass spectrometry. Conditioning, dispensing onto the chip and measurement of the samples in the mass spectrometer were carried out automatically. The feasibility of a semi-quantitative evaluation of mass spectrometric data was proven using oligonucleotide mixtures of known composition.

Preliminary results from the PCR investigations could be differentiated: Using deoxyribonucleotides as substrates with the polymerase mutants Y671W, Y671H and the combination Y671W/F667Y a complete primer extension reaction product was obtained. Primer extension reaction with the mutations Y671H/F667Y, Y671S, Y671T and their combinations with F667Y resulted in incomplete products. Only the variant Y671P and its combination with F667Y was proven to be completely inactive. Based on these findings the modifications Y671F, Y671W, Y671H and their combination with F667Y were selected for further investigations with nucleotide derivatives.

While α -S-dNTPs could be used as a nucleotide substrate, none of the mutants investigated was able to incorporate more than a single ribonucleotide in the primer extension reaction. 2'-Deoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosine-5'-triphosphate, carrying modifications in position 7 and 9 of the base and 5-hydroxy-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate, a pyrimidine nucleotide with a modification in position 5, were successfully incorporated in the primer extension reaction and, following buffer optimization, also in the PCR. Two pyrimidine nucleotides with modifications in position 2 of the base, 2-thio-2'-deoxycytidine-5'-triphosphate and 2-thio-2'-deoxythymidine-5'-triphosphate, were utilized in the primer extension reaction, but PCR remained without detectable product. A nucleotide carrying a modified ribose (5'-thio-5'-deoxythymidine-5'-S-triphosphate) was neither accepted in the primer extension reaction nor in the PCR.

Covalent attachment of the Taq DNA polymerase on silicon chips was investigated further. Taq polymerase mutants with two lysine residues at the carboxy terminus were cloned and expressed. Aminommodified silicon chips were activated with the homobifunctional crosslinking agent 1,4-phenylenediisothiocyanate (DITC) and incubated with the polymerase mutant. The influence of differently modified surfaces on the adsorption of the enzyme was detected and investigated. Further studies will be needed to assess activity of the immobilized Taq polymerase.

10 Experimenteller Teil

10.1 Allgemeine Hinweise

Die Zusammensetzung der einzelnen Pufferlösungen ist zur besseren Übersicht jeweils bei den Beschreibungen der einzelnen Methoden angegeben, ebenso die Hersteller der jeweiligen Reagenzien. Alle Lösungen wurden vor der Verwendung autoklaviert bzw. sterilfiltriert.

10.1.1 Geräte und Methoden

Inkubation

Die Anzucht von Bakterienkulturen erfolgte in einem Schüttelinkubator der Fa. GFL (Modell 3033) bzw. in einem Brutschrank der Fa. Heraeus (Modell B5060 EC/CO₂) ohne CO₂-Zufuhr. Zur Inkubation z. B. von Restriktionsansätzen wurde ein Thermowasserbad der Fa. GFL (Modell 1002) benutzt.

Elektroporator

Es wurde der Elektroporator E. coli Pulser von Bio-Rad Laboratories verwendet.

Gelelektrophoresen

Elektrophoresen von Polyacrylamid- und Agarosegelen wurden mit Gelkammern der Fa. Keutz durchgeführt.

Geldokumentation

Für die Aufnahme von Gelbildern standen die DocuGel V Station der Fa. MWG Biotech sowie der Alpha Imager 1220 der Fa. Biozym zur Verfügung.

Thermocycler

Für die PCR in 96 well Mikrotiterplatten wurde ein Thermocycler der Fa. MJ Research, DNA Engine Tetrad, verwendet. PCRs in Einzeltubes wurden mit einem OmniGene der Fa. Hybaid bzw. dem TRIO Thermoblock von Biometra durchgeführt. Alle Thermocycler waren mit einer Deckelheizung ausgestattet.

Magnetic Particle Collector

Zur Separation der magnetischen Streptavidin-Beads wurden MPC der Fa. Dynal benutzt.

Mikrotiterplatten

Die Primer-Extension-Reaktion wurde in 96 well Mikrotiterplatten AB0800 der Fa. ABgene durchgeführt.

UV/VIS-Messungen erfolgten in UVMax 96 well Mikrotiterplatten der Fa. Whatman Polyfiltronics. Für die Fluoreszenzmessungen wurden schwarze 96 well Mikrotiterplatten Fluotrac 200 der Fa. Greiner verwendet.

Pipettierautomat

Die Konditionierung der Proben für die MALDI-TOF-MS-Proben erfolgte mittels eines Multimek 96 der Fa. Beckmann.

Nanoplotter

Die DNA-Proben wurden mit dem Nanoliter-Pipetting System Spectrojet Nanoplotter der Fa. GeSiM mbH auf die Chipoberfläche gebracht.

Silizium-Chips

Silizium-Chips der Fa. SEQUENOM, SpektroCHIP-96 Elements bzw. SpektroCHIP-384 Elements, beladen mit 96 bzw. 384 Matrix-Spots, wurden für die MALDI-TOF-Messungen benutzt.

Für die Immobilisierungsversuche wurden beidseitig polierte, vorgeschnittene quadratische Silizium-Wafer der Fa. GeSiM mbH mit einer Kantenlänge von 4 mm und einer Dicke von 0,5 mm verwendet.

pH-Meter

pH Messungen erfolgten mit dem pH537 der Fa. WTW GmbH unter Verwendung der pH-Elektrode InLab 410 Mettler-Toledo.

UV/VIS-und Fluoreszenzspektroskopie

Für die Messungen einzelner Proben wurde mit einem Biochrom LBK 4060 UV/VIS-Photometer der Firma Pharmacia mit Quarzglas- bzw. Polystyrolküvetten gearbeitet. Für Messungen im Mikrotiterplattenformat wurde ein Mikrotiterplattenreader (POLARstar Galaxy der Fa. BMG) benutzt.

MALDI-TOF-Massenspektren

Massenspektren wurden mit einem SpectroPOINT Massenspektrometer der Fa. SEQUENOM aufgenommen. Das Gerät verwendet einen Stickstofflaser. Die Spektren wurden im “positive ions reflector mode” bei einer Laserwellenlänge von 337 nm mit ca. 20 kV Beschleunigungsspannung und mit einer um 500 ns verzögerten Ionenextraktion aufgenommen. Der Laserstrahl besitzt eine Energie von 1×10^6 bis 3×10^6 W/cm². Die Massenkalisierung erfolgte extern mit einem Kalibranten aus drei Oligonukleotiden im Massenbereich zwischen 5000 und 10000 Da der Fa. SEQUENOM. Zur Erhöhung der Signalintensität zeigt jedes Spektrum eine Aufsummierung von mehreren Einzelschüssen. Als Matrix diente eine Lösung von 0,7 mol/l 3-Hydroxypikolinsäure und 0,07 mol/l Ammoniumcitrat in Acetonitril/Wasser (1:1, v/v).

Szintillationszähler

Für die Quantifizierung radioaktivmarkierter DNA wurde ein Beckmann Counter Modell LS 1701 verwendet.

10.1.2 Bakterienstämme

Die für diese Arbeit benutzten *Escherichia coli*-Stämme sind Derivate des 1922 in Stanford, Kalifornien, isolierten Stammes *E. coli* K12.

Escherichia coli DH10B (Fa. GIBCO BRL)

Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80 *dlacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *deoR* *recA1* *endA1* *araD139*
 Δ (*ara,leu*) 7G97 *galU* *galK* λ^- *rpsL* *nupG*

Escherichia coli JM83 (Stammsammlung des Arbeitskreises)

Genotyp: F⁻ *ara* Δ (*lac-proAB*) Φ 80 Δ *lacZ* Δ M15 *thi* *rpsL* (Str⁺)

10.1.3 Nährmedien

Als Flüssigmedium wurde autoklaviertes LB-(Luria-Bertani-)Medium bzw. 2TY-Medium verwendet.

LB-Medium

2TY-Medium

10 g/l NaCl

5 g/l NaCl

10 g/l Caseinhydrolysat

20 g/l Caseinhydrolysat (Select Peptone 140, GIBCO BRL)

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l Hefeextrakt (GIBCO BRL)

Nährböden wurden aus LB-Medium unter Zusatz von 8 g/l Agar (Select Agar, GIBCO BRL) hergestellt. Zur Herstellung selektiver Medien wurde Ampicillin (Sigma Aldrich) zu einer Endkonzentration von 100 μ g/ml zugegeben.

10.1.4 Plasmide

pHK236 (M. Kröger, Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Universität Gießen):

Expressionsvektor mit *tac*-Promotor, β -Lactamase-Gen

pTAQ (Diplomarbeit C. Pauk):

pHK236-Derivat, enthält aminoterminal um 735 bp verkürztes Fragment des Taq-Polymerase-Gens + 6 Histidin-Codons am 3'-Ende des Proteinleaserasters, außerdem 3'- und 5'-untranslatierte Regionen des *ompA* Gens aus *E. coli* + Proteinstart des *ompA* Gens aus *E. coli*

pOM8, pOM9 (Plasmid-Sammlung des Arbeitskreises):

pUC8-Derivat¹⁷⁰, Sequenzier- und Klonierungsvektor

10.1.5 Synthetische Oligonukleotide

Alle in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion bezogen.

Sequenzierprimer

Universeller Sequenzierprimer (USP), Sequenz: GTAAAACGACGGCCA

Reverser Sequenzierprimer (RSP), Sequenz: CCGGGGATCCTCTAGAG

Primer für die Mutagenese der Taq-Polymerase-Varianten

Die substituierten Basen sind fett markiert, die neu eingeführten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Punktmutation, Restriktionsschnitt</i>
pol1	GACCATCAACTACGGGGTCTCTACG	F667Y
pol2	TTGGCCGCCCT <u>TGCGCAT</u> CAGGGGG	Gegenprimer zu pol1, <i>MstI</i>
pol3	<u>CTCTCCGGA</u> ATGTCGGCCCACCGCCTC	Y671S, <i>BspMII</i> , <i>ScaI</i> (anteilig)
pol4	<u>CTC</u> ACCGGT ATGTCGGCCCACCGCCTC	Y671T, <i>PinAI</i> , <i>ScaI</i> (anteilig)
pol5	<u>CTCTTCGGC</u> ATGTCGGCCCACCGC	Y671F, <i>ScaI</i> (anteilig)
pol6	<u>TACTCCGT</u> AGTTGATGGTCTTGGCCGC	Gegenprimer für pol3-5 und pol11-13, <i>ScaI</i> (anteilig), enthält Mutation F667Y
pol10	<u>TACTCCGA</u> AGTTGATGGTCTTGGCCGC	Gegenprimer für pol3-5 und pol11-13, <i>ScaI</i> (anteilig), ohne Mutation F667Y
pol11	<u>CTCTG</u> GGGCATGTCGGCCCACCGCCTC	Y671W, <i>ScaI</i> (anteilig)
pol12	<u>CTCCCGG</u> GCATGTCGGCCCACCGCCTC	Y671P, <i>SmaI</i> , <i>ScaI</i> (anteilig)
pol13	<u>CTCCATG</u> GCATGTCGGCCCACCGCCTC	Y671H, <i>NcoI</i> , <i>ScaI</i> (anteilig)

Primer für die Klonierung zweier carboxyterminaler Lysine

Die substituierten Basen sind fett markiert, die neu eingeführten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

<i>Name</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Mutation, Restriktionsschnitt</i>
his6-lys	CTTTTTC <u>AC</u> GTGATGGTGATGGTGGTG	Einführung von einem Valin- und zwei Lysinresten hinter dem His6-Tag, <i>Pma</i> CI
Omp2	TAAGTTCTCGTCTGGTAG	Gegenprimer zu his6-lys

10.2 Mikrobiologische Methoden

10.2.1 Bakterienkulturen

Die Inkubation der *E. coli*-Kulturen erfolgte bei 37 °C entweder im Brutschrank auf LB-Agarplatten oder im Schüttelinkubator in LB-Medium. Für die DNA-Präparationen wurden Übernachtskulturen verwendet.

10.2.2 Induktion

Zur kontrollierten Expression der in dieser Arbeit klonierten Fusionsproteine wurde der *tac*-Promotor⁷⁶ verwendet, der durch IPTG induzierbar ist. Dazu wurden 500 ml 2TY-Medium (s. Kap. 10.1.3) im Verhältnis 1:50 mit einer frischen Übernachtskultur angeimpft, 2,5 Stunden bei 37 °C im Schüttler inkubiert und mit einer 100 mM IPTG-Stammlösung zu einer Endkonzentration von 1 mM versetzt. Nach dreistündiger Induktion bei 37 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (6000 rpm/15 min), nachdem zur Untersuchung des Gesamtproteingehalts 500 µl

Zellkultur entnommen wurden (s. Kap. 10.4.5).

10.2.3 Bakterientransformation

Zur Transformation wurde statt der älteren Calciumchlorid-Methode das neuere Verfahren der Elektroporation¹⁷¹ verwendet.

Vorbereitung der Zellen

Aus einer Übernachtskultur von *E. coli*-Zellen wurde in 100 ml LB-Medium im Verhältnis 1:100 angeimpft. Nach Inkubation bei 37 °C für 1,5 Stunden wurde die Zellkultur 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (5000 rpm/10 min) und das Bakteriensediment in 200 ml eiskaltem 10 %igem Glycerin p.a. resuspendiert. Es folgten weitere Waschschrte:

- Zentrifugation (5000 rpm/10 min), Resuspension in 100 ml 10 %igem Glycerin p.a.
- Zentrifugation (5000 rpm/10 min), Resuspension in 20 ml 10 %igem Glycerin p.a.
- Zentrifugation (5000 rpm/10 min), Resuspension in 2 ml 10 %igem Glycerin p.a.

Aliquots von 100 µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so vorbereiteten Zellen sind mindestens sechs Monate bei -70°C lagerfähig.

Elektroporation

Die vorbereiteten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut; pro Transformation benutzt man 20 – 25 µl Zellsuspension. Die Suspension wurde mit DNA-Lösung, z.B. aus einer Ethanol-fällung (s. Kap. 10.3.1.3), vermischt, zu einem Gesamtvolumen von 50 µl mit Wasser aufgefüllt und in eisgekühlte Porationsküvetten mit einem Elektrodenabstand von 0,1 cm überführt. Der angelegte Strompuls hatte eine Spannung von 1,80 kV mit einer Pulsdauer von etwa 5,5 msec. Nach Überführung der Zellsuspension in 0,5 ml SOC-Medium wurde 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Zur Selektion der erfolgreich transformierten Zellen wurden je 0,25 ml der Bakteriensuspension auf ampicillin-haltigen Agar-Platten (s. Kap. 10.1.3) ausgestrichen und ca. 12 Stunden bei 37 °C inkubiert.

SOC-Medium

2 g/100 ml Caseinhydrolysat (Select Peptone 140, Gibco BRL)

0,5 g/100 ml Hefeextrakt (Gibco BRL)

0,01 M NaCl

0,0025 M KCl

0,02 M Glucose

0,2 M MgCl₂

10.2.4 Lagerung von Bakterienkulturen

Um Bakterienkulturen über längere Zeit zu lagern, wurden sogenannte Glycerinstocks hergestellt und bei -70°C eingefroren. Dazu wurden jeweils 180 µl Glycerin (97%, p.a.) in einem Eppendorfgefäß vorgelegt, mit je 820 µl einer Übernachtskultur vermischt und bei -70°C eingefroren.

10.3 Molekularbiologische Methoden

10.3.1 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA

10.3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab (Minilysat)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab wurde die Methode der alkalischen Lyse verwendet^{172,173}. 1,5 ml einer bis zur stationären Phase gewachsenen Bakterienkultur wurden zentrifugiert (6000 rpm/5 min) und der Überstand verworfen. Das Bakteriensediment wurde in 0,1 ml Lösung I resuspendiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Lösung II wurde vorsichtig gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Denaturierungsvorgang durch Zugabe von 0,15

ml Lösung III gestoppt. Die Mischung wurde 20 Minuten auf Eis inkubiert, ausgeflockte Proteine und denaturierte genomische DNA wurden durch Zentrifugation abgetrennt (13500 rpm/10 min). Die Plasmid-DNA wurde aus dem Überstand durch Dekantieren in ein Eppendorfggefäß mit 1 ml eiskaltem 96 %igem Ethanol 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Die gefällte DNA wurde abzentrifugiert (13000 rpm/15 min) und mit 0,5 ml 80 %igem, eiskaltem Ethanol gewaschen. Nach erneuter kurzer Zentrifugation wurde das Sediment 5 min an der Luft getrocknet und in 100 µl Wasser aufgenommen. Aliquots von 10 µl dieser Lösung wurden für eine analytische Restriktionsspaltung eingesetzt.

Zusammensetzung der Lösungen

- Lösung I: 10 mM EDTA
50 mM Tris-HCl (pH 8,0)
- Lösung II: 0,2 M NaOH
1 % SDS
- Lösung III: 3 M NaOAc (pH 4,8)

10.3.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

Zur Aufreinigung größerer Mengen Plasmid-DNA für die Sequenzierung oder die präparative Spaltung von DNA wurden Ionenaustauscher-Säulen der Firma Qiagen verwendet, mit denen zwischen 20 und 2500 µg Plasmid-DNA isoliert und gereinigt werden können.

Zur Isolierung von ca. 100 µg DNA wurden 30 ml einer Übernachtskultur in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert (5000 rpm/15 min) und das Bakterienpellet in 4 ml Resuspensionspuffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 4 ml Puffer P2 erfolgte die Lyse der Zellen, und die Bestandteile wurden alkalisch denaturiert. Puffer P2 enthielt zusätzlich RNase A zum Abbau der vorhandenen RNA. Nach fünfminütiger Inkubation der Suspension bei Raumtemperatur wurde die Denaturierung durch Mischen mit 4 ml gekühltem Neutralisationspuffer P3 gestoppt, und das Gemisch 15 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (5000 rpm/30 min) konnte der Überstand mit der gelösten Plasmid-DNA zur weiteren Aufreinigung auf die Säulen dekantiert werden, die zuvor durch Spülen mit 4 ml

QBT-Puffer equilibriert wurden. Anschließendes Waschen mit 2 x 10 ml QC-Puffer entfernte verbleibende RNA- und Proteinverunreinigungen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 5 ml QF-Puffer. Die resultierende Lösung wurde in 3,5 ml Isopropanol aufgenommen, um die DNA zu fällen (Raumtemperatur). Nach der Zentrifugation (10000 rpm/30 min) wurde das DNA-Sediment mit 2 ml 70 %igem eiskaltem Ethanol gewaschen, 5 min an der Luft getrocknet und in 300 µl Wasser aufgenommen.

Zusammensetzung der Pufferlösungen

P1 (Resuspension):	100 mg/ml RNase A
	50 mM Tris-HCl
	10 mM EDTA (pH 8,0)
P2 (Lyse):	200 mM NaOH
	1 % SDS
P3 (Neutralisation):	3,0 M Kaliumacetat (pH 5,5)
QBT (Equilibrierung):	750 mM NaCl
	50 mM MOPS
	15 % Ethanol
	0,15 % Triton X-100
QC (Waschen):	1,0 M NaCl
	50 mM MOPS
	15 % Ethanol (pH 7,0)
QF (Elution):	1,25 M NaCl
	50 mM Tris-HCl
	15 % Ethanol (pH 8,5)

10.3.1.3 Ethanolfällung

DNA kann aus wässrigen Lösungen zur Abtrennung von anorganischen Ionen und Molekülen geringen Molekulargewichts sowie zu Konzentrierung mit Ethanol gefällt werden. Die DNA-Lösung wurde dafür mit 3 M Natriumacetat-Lösung versetzt und gut gemischt. Nach Zugabe des dreifachen

Volumens an 96 %igem Ethanol wurde 10 - 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die ausgefallene DNA wurde durch Zentrifugation abgetrennt (14000 rpm/15 min), das DNA-Sediment mit 1/4 des Ausgangsvolumens an 80 %igem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur kurz getrocknet und in Wasser aufgenommen.

10.3.2 Enzymatische Reaktionen mit DNA

10.3.2.1 Restriktionskartierung von Plasmid-DNA

Die analytischen Reaktionsansätze wurden gemäß den Vorschriften der Enzymhersteller ausgeführt und inkubiert. Dabei wurde je Ansatz bis zu 10 µl Plasmid-DNA-Lösung aus der Minilysat-Methode (s. Kap. 10.3.1.1) verwendet. Zur Entfernung von RNA-Verunreinigungen wurden jedem Reaktionsansatz 2 - 5 ng/µl RNase (Boehringer Mannheim) zugesetzt.

Zusammensetzung eines typischen Restriktionsansatzes

10 µl Plasmid-DNA-Lösung

1 µl Spaltungspuffer 10x

0,3 µl Restriktionsenzym (ca. 3 U)

0,3 µl RNase

Die Inkubationszeit betrug routinemäßig eine Stunde bei der vom Hersteller spezifizierten Temperatur. Die Inkubationspuffer werden von den Herstellern mitgeliefert und unterscheiden sich in ihrer Zusammensetzung je nach Enzym und Hersteller.

10.3.2.2 Präparative Restriktionsspaltung

In Spaltungsansätzen mit größeren DNA-Mengen zur Herstellung von Fragmenten für eine spätere Ligation wurde mit Qiagen-Säulen isolierte DNA verwendet (s. Kap. 10.3.2.2). Als Ausgangsmaterial dienten 10 - 30 µg DNA in Volumina von 10 - 50 µl, die Restriktionsansätze wurden entsprechend vergrößert.

Zusammensetzung eines typischen Ansatzes

26 µl Plasmid-DNA-Lösung

3 µl Spaltungspuffer 10x

1 µl Restriktionsenzym (ca. 10 U)

Die Inkubationszeit betrug in der Regel 3 - 4 Stunden. Der Zusatz von RNase erübrigte sich in diesen Fällen, da die RNA aufgrund der Isolationsmethode bereits entfernt worden war.

10.3.2.3 Partielle Restriktionsspaltung

Wird ein benötigtes Restriktionsfragment durch eines der benutzten Enzyme zusätzlich intern geschnitten, muß eine partielle Spaltung durchgeführt werden, d.h. es muß der Zeitpunkt bestimmt werden, zu dem im Restriktionsansatz das benötigte Fragment in maximaler Konzentration enthalten ist.

Für die Verfolgung des Reaktionsverlaufs durch Gelelektrophorese wurden zunächst Eppendorf-Gefäße mit 10 µl Gel-Auftragspuffer (Blaumarker) vorbereitet. Der bis auf das Enzym komplette präparative Spaltungsansatz wurde dann zusammen mit einem zweiten leeren Eppendorfgefäß im Wasserbad auf die Inkubationstemperatur des Enzyms erwärmt. Durch Zugabe einer geringen Menge an Enzym (0,5 µl) wurde die Reaktion gestartet, 8 µl sofort entnommen und in das leere Eppendorf-Gefäß überführt. Der Hauptansatz wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren. In definierten Zeitabständen wurde dann jeweils 1 µl der Reaktionsmischung entnommen, in die vorbereiteten Eppen-

dorfgefäße gefüllt und ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Ende der Reaktionszeit wurden die Proben für die Gelanalyse aufgetaut und auf einem 1 %igen Agarose-Gel aufgetrennt. Aus der daraus erkennbaren Spaltungskinetik kann eine entsprechende Inkubationsdauer für den Hauptansatz ausgewählt werden, bei der das gewünschte Fragment das Hauptprodukt bildet. Der Hauptansatz wurde im Wasserbad rasch aufgetaut und nach Ende der Inkubationszeit mit einem entsprechenden Volumen an Gel-Auftragspuffer versetzt, der einen sofortigen Abbruch der Reaktion bewirkt. Das partiell gespaltene DNA-Fragment kann auf die übliche Weise durch ein präparatives Agarose-Gel isoliert werden (s. Kap. 10.3.4).

10.3.2.4 Ligation

Die DNA-Fragmente für den Einsatz in Ligationen wurden durch die Glasmilch-Methode gereinigt (s. Kap.10.3.4). Das verwendete Enzym war die T4-DNA-Ligase (Boehringer Mannheim). Das Gesamtvolumen der Ansätze betrug in der Regel 20 µl, es wurde 1 µl T4-DNA-Ligase-Lösung (1 U) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Zur Erzielung einer besseren Ausbeute und Vermeidung von Mehrfachinsertionen wurden Vektor und Insert im Mengenverhältnis 1:3 eingesetzt. Die genaue Zusammensetzung der Ligationsansätze war daher von der Ausgangskonzentration der einzelnen DNA-Lösungen abhängig

Ligationspuffer (10x)

660 mM Tris-HCl

50 mM MgCl₂

10 mM DTT

10 mM ATP (pH 7,5)

10.3.2.5 Dephosphorylierung

Zur Entfernung der 5'-Phosphatreste von DNA-Fragmenten wurde alkalische Phosphatase aus Käl-

berdarm (Boehringer Mannheim) verwendet.

Zusammensetzung eines typischen Reaktionsansatzes

50 µl DNA-Lösung (z. B. aus der Ethanol-fällung eines Restriktionsansatzes)

6 µl Phosphatasepuffer 10x

0,3 µl alkal. Phosphatase (ca. 0,3 U)

3,7 µl Wasser

Nach 1 Stunde Inkubation bei 37 °C wurde das DNA-Fragment über Gelelektrophorese (s. Kap. **10.3.3**) und anschließende Isolation aus dem Gel (s. Kap. **10.3.4**) gereinigt.

Phosphatasepuffer (10x)

500 mM Tris-HCl

1 mM EDTA (pH 8,5)

10.3.2.6 Phosphorylierung

Die Übertragung von Phosphatgruppen auf 5'-OH-Enden von DNA-Molekülen erfolgte mit Hilfe von T4-Polynukleotidkinase (PNK, Boehringer Mannheim). Es wurden 30 µl-Reaktionsansätze benutzt.

25 µl DNA-Lösung (z. B. aus Ethanol-fällung eines PCR-Ansatzes)

3 µl PNK-Puffer 10x

1 µl ATP (100 pmol/µl)

1 µl PNK (10 U)

Die Inkubation dauerte 1 Stunde bei Raumtemperatur. Zur weiteren Anwendung wurde die DNA durch Ethanol-fällung (s. Kap. **10.3.1.3**) gereinigt.

PNK-Puffer (10x)

500 mM Tris-HCl

100 mM MgCl₂

1 mM EDTA

50 mM DTT

1 mM Spermidin (pH 8,2)

10.3.2.7 Klenow-Polishing

Zur Entfernung unspezifisch verlängerter, überhängender Einzelstrangenden der Vektor-PCR-Produkte (s. Kap. 10.3.5.1) wurde die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität des Klenow-Fragmentes genutzt. Das PCR-Produkt wurde nach der Isolierung aus dem Gel direkt in die Reaktion eingesetzt.

Zusammensetzung eines typischen Reaktionsansatzes

50 µl DNA-Lösung

6 µl Reaktionspuffer 10x (für Klenow-Fragment)

1 µl dATP-Lösung (10 mM)

1 µl dCTP-Lösung (10 mM)

1 µl dGTP-Lösung (10 mM)

1 µl dTTP-Lösung (10 mM)

1 µl Klenow-Fragment (5 U)

Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur wurde die DNA mit Hilfe von Glas-
milch direkt aus der wäßrigen Lösung isoliert (s. Kap. 10.3.4).

10.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung von PCR-Reaktionen, Restriktionsspaltungen und zur präparativen Isolierung von

DNA-Fragmenten zwischen 8 und 0,2 kb Länge (s. Kap. 10.3.2.1, 10.3.2.2, 10.3.5) wurden 1 %ige (w/w) Agarosegele verwendet. Die Präparation der Gellösung und das Gießen der Gele erfolgte wie bei *Maniatis*¹⁷⁴ beschrieben. Zum Einfüllen der Proben und zur Kennzeichnung der Laufweite wurde den Proben etwa 1/3 Volumen Gel-Auftragspuffer zugegeben. Nach der Elektrophorese wurden die Gele zur Detektion der DNA für ca. 10 min im Ethidiumbromid-Bad angefärbt.

Die Gele wurden mit einer CCD-Videokamera unter UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm aufgenommen und sind aus Gründen der Abbildungsqualität in dieser Arbeit invertiert wiedergegeben. Eine anderweitige Modifikation der Gelbilder fand nicht statt.

Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Agarosepuffer (10x): 400 mM Tris

50 mM NaOAc

10 mM EDTA (pH 7,8)

Gelauftragspuffer: 50 % Glycerin

50 mM EDTA

0,005 % BPB

EtBr-Lösung: 3 Tropfen 10 %ige (w/v) EtBr-Lösung auf 1 Liter Agarosepuffer (1x)

Zusammensetzung des DNA-Fragmentlängenstandards (im Arbeitskreis aus Plasmid-DNA hergestellt, alle Fragmente sind zu gleichen Teilen enthalten)

6043, 4876, 4159, 3114, 2483, 2045, 1541, 1014, 941, 692, 270 bp

10.3.4 Isolierung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese

Durch Gelelektrophorese können gezielt einzelne DNA-Fragmente aus einem Gemisch isoliert werden. Für die Isolierung von Fragmenten mit einer Größe > 300 bp wurden 1 %ige (w/w) Agarose-Gele benutzt (s. Kap. 10.3.3) und die DNA durch Adsorption an eine Silica-Matrix ("Glasmilch") aus der Agarose herausgelöst¹⁷⁵. Dazu wurde das GENE CLEAN KIT der Firma Bio101 Inc., La Jolla, U.S.A. verwendet. Nach dem Gellauf wurde das entsprechende Gel im Ethidiumbromid-

Bad gefärbt und das Gelstück mit der gewünschten DNA-Bande unter UV-Licht der Wellenlänge 360 nm mit einem Skalpell herausgetrennt. Die Agarose-Bande wurde bei 55 °C im dreifachen Volumen gesättigter NaI-Lösung aufgelöst. Danach wurde die Lösung 5 min bei Raumtemperatur mit 5 - 10 µl Silica-Matrix-Suspension (Glasmilch) inkubiert. Nach Zentrifugation (10000 rpm/20 sec) wurde der Überstand verworfen und das Sediment dreimal mit je 500 µl eiskaltem Waschpuffer gewaschen. Durch Resuspension in 40 µl Wasser bei 55°C löst sich die DNA wieder von der Matrix. Nach Abtrennung der Silica-Matrix durch Zentrifugieren (10000 rpm/20 sec) konnte die isolierte DNA ohne weitere Behandlung verwendet werden.

Waschpuffer

50 % Ethanol

10 mM Tris-HCl

50 mM NaCl

1 mM EDTA (pH 7,5)

10.3.5 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

10.3.5.1 Vektor-PCR

Für die Amplifizierung langer DNA-Abschnitte und ganzer Vektoren wurde das ExpandTM High Fidelity PCR System von Boehringer Mannheim benutzt.

Für jeden PCR-Ansatz wurde die Reaktionsmischung in zwei unterschiedliche, sich ergänzende Anteile aufgeteilt. Diese wurden im Thermocycler auf 94 °C erhitzt und dann zusammenpipettiert. Diese sogenannte Hot-Start-PCR dient der Vermeidung unspezifischer Hybridisierung der Primer und ihrer Elongation bei niedrigeren Temperaturen in der Anfangsphase.

Zusammensetzung der Reaktionsmischungen

a:	3,5 µl dATP (5 mM)	b:	5 µl Reaktionspuffer 10x
	3,5 µl dTTP (5 mM)		1 µl Template (50 - 100 ng)
	3,5 µl dGTP (5 mM)		1 µl Expand-Enzym-Mix (3,5 U)
	3,5 µl dCTP (5 mM)		18 µl Wasser
	je 0,5 µl Primer (100 pmol)		
	10 µl Wasser		

Es wurden alternativ zwei verschiedene Temperaturprogramme benutzt. Dabei wurde die Hybridisierungstemperatur dem Schmelzpunkt der verwendeten Primer angepaßt.

Temperaturprogramm 1

	2 min	94 °C
10 Zyklen:	1 min	94 °C
	1 min	65 °C
	8 min	68 °C
2 Zyklen:	1 min	94 °C
	1 min	65 °C
	9 min	68 °C
2 Zyklen:	1 min	94 °C
	1 min	65 °C
	10 min	68 °C
2 Zyklen:	1 min	94 °C
	1 min	65 °C
	11 min	68 °C
2 Zyklen:	1 min	94 °C
	1 min	65 °C
	15 min	68 °C
2 Zyklen:	1 min	94 °C
	1 min	65 °C
	20 min	68 °C
	20 min	68 °C

Temperaturprogramm 2

	2 min	94 °C
10 Zyklen:	15 sec	94 °C
	30 sec	50 °C
	2 min	72 °C
15 Zyklen:	15 sec	94 °C
	30 sec	50 °C
	3 min	72 °C
	5 min	72 °C

Das PCR-Produkt wurde über Agarose-Gelelektrophorese (s. Kap. **10.3.3**) und anschließende Isolierung aus dem Gel gereinigt (s. Kap. **10.3.4**). Vor der Weiterverwendung in einer Ringschlußligation müssen die 5'-OH-Gruppen des Produkts phosphoryliert werden (s. Kap. **10.3.2.6**).

10.3.5.2 PCR-Bedingungen für die Aktivitätsuntersuchung der Taq-Polymerasen

Die Überprüfung der chromatographisch isolierten Fusionsproteine auf Polymerase-Aktivität fand mittels standardisierter PCR-Reaktionen statt. Die Enzyme wurden durch Ultrafiltration in einen Aufbewahrungspuffer überführt (s. Kap. **10.4.3**). Als Standard-Template diente das Plasmid pGI, ein pOM8-Derivat, das ein Insert mit einer Größe von 700 bp enthält. Auf diese Weise konnten die M13-Sequenzierprimer USP und RP (s. Kap. **10.1.5**) benutzt werden.

Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes

5 µl PCR-Puffer für Taq-DNA-Polymerase 10x

1 µl dATP (5 mM)

1 µl dTTP (5 mM)

1 µl dGTP (5 mM)

1 µl dCTP (5 mM)

1 µl USP (20 pmol)

1 µl RSP (20 pmol)

1 µl Template (5 fmol)

x µl Polymerase

y µl Wasser

50 µl Reaktionsansatz

Die Volumenangaben x und y im PCR-Ansatz ergeben sich aus den unterschiedlichen Volumina an eingesetzter Polymerase-Lösung. Die Reaktionsmischung wurde mit einer entsprechenden Menge Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt. Als Kontrolle wurden 2,5 U Taq-DNA-Polymerase (Firma Roche) eingesetzt.

Thermocycler-Programm

4 min 95 °C

25 Zyklen: 50 sec 95 °C

45 sec 49 °C

45 sec 60 °C

10 min 72 °C

Zur Untersuchung des Reaktionsergebnisses wurden jeweils 10 % des Gesamtansatzes auf einem Agarosegel analysiert (s. Kap. 10.3.3).

PCR-Basispuffer (10x)

400 mM TrisHCl

10 mM MgCl₂ (pH 9,0)

10.3.5.3 Standard-PCR ohne Proteinisolierung

Für Untersuchungen der Polymeraseaktivität von exprimierenden *E. coli*-Zellsuspensionen wurden dieselben Standard-PCR-Reaktionen wie in Kapitel 10.3.5.2 beschrieben benutzt.

Vorbereitung der Zellen

Die Zellkulturen wurden nach dem Standardverfahren induziert (s. Kap. 10.2.2). Nach Ablauf der Induktionszeit wurden 500 µl der Zellkultur entnommen und abzentrifugiert (6000 rpm/3 min). Der Überstand wurde verworfen, das Bakteriensediment in 500 µl einer 1 %igen Triton X-100-Lösung resuspendiert und für 5 min auf 90 °C erwärmt. Aliquots der resultierenden Suspension wurden in die Standard-PCR eingesetzt.

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes

5 µl PCR-Puffer für Taq-DNA-Polymerase 10x

1 µl dATP (5 mM)

1 µl dTTP (5 mM)

1 µl dGTP (5 mM)

1 µl dCTP (5 mM)

1 µl Primer USP (20 pmol)

1 µl Primer RSP (20 pmol)

1 µl Template (5 fmol)

x µl Zellkultur

y µl Wasser

50 µl Reaktionsansatz

Auch hier ergeben sich die Volumenangaben x und y wieder aus den Volumina an eingesetzter Zellsuspension. Der Reaktionsansatz wurde mit Wasser auf 50 µl-Gesamtvolumen aufgefüllt.

Temperaturprogramm des Thermocyclers

	4 min	95 °C
25 Zyklen:	50 sec	95 °C
	45 sec	49 °C
	45 sec	60 °C
	10 min	72 °C

Wie bei den PCR-Reaktionen mit gereinigtem Enzym wurden jeweils 10 % des Gesamtansatzes auf einem Agarosegel analysiert.

10.3.5.4 Festphasen-PCR mit Silizium-Chips

Die mit Taq-Polymerase umgesetzten Silizium-Wafer wurden direkt nach der Immobilisierungsreaktion (s. Kap. 10.5.3) in die bereits in Kapitel 10.3.5.2 beschriebene Standard-PCR eingesetzt. Dazu wurde die komplette Reaktionsmischung in Eppendorf-Gefäßen vorgelegt und die behandelten Chips hinzugefügt.

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes

5 µl PCR-Puffer für Taq-DNA-Polymerase 10x

1 µl dATP (5 mM)

1 µl dTTP (5 mM)

1 µl dGTP (5 mM)

1 µl dCTP (5 mM)

1 µl Primer USP (20 pmol)

1 µl Primer RSP (20 pmol)

1 µl Template (5 fmol)

38 µl Wasser

50 µl Reaktionsansatz

Temperaturprogramm des Thermocyclers

	4 min	95 °C
25 Zyklen:	2 min	95 °C
	2 min	49 °C
	2 min	60 °C
	10 min	72 °C

Nach Beendigung der Reaktion wurden die Chips entnommen und 10 % der Reaktionslösung auf einem 1 %igen Agarosegel untersucht. Die Enzymwafer wurden zusätzlich eine Stunde bei 55 °C mit 50 µl Arginin-Puffer behandelt. Von dieser Lösung wurden ebenfalls 10 % auf ein Agarosegel aufgetragen.

Zusammensetzung des Arginin-Puffers

1 M NaCl

50 mM Arginin

10.3.6 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Für die DNA-Sequenzierung nach Sanger^{19,45} wurde das Dye-Terminator-Kit der Firma Perkin Elmer verwendet. Als Terminatoren werden dabei unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide eingesetzt, so daß die gesamte Sequenzierungsreaktion in einem Reaktionsansatz durchgeführt werden kann. Als Primer wurden der Universale Sequenzierprimer und der Reverse Sequenzierprimer verwendet (s. Kap. 10.1.5).

Zusammensetzung des Sequenzieransatzes

4 µl Reaktionspuffer 5x

1 µl dNTP-Mix

0,5 µl Dye-ddATP

0,5 µl Dye-ddTTP

0,5 µl Dye-ddCTP

0,5 µl Dye-ddGTP

1 µl AmpliTaq FS (8 U)

1 µl Primer (5 - 20 pmol)

5 µl DNA-Lösung (1 - 1,5 µg, isoliert mit Qiagen-Säulen, s. Kap. 10.3.1.2)

20 µl Reaktionsansatz

Thermocyclerprogramm

	8 min	96 °C
30 Zyklen:	50 sec	96 °C
	1 min 45 sec	55 °C
	6 min	60 °C

Zur Aufarbeitung wird der Reaktionsansatz mit Wasser auf 80 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und mit 3 M Natriumacetat-Lösung eine Konzentration von 0,3 M Natriumacetat eingestellt. Zur Fällung wird das 3,5fache Volumen an 96 %igem Ethanol zugegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation (14000 rpm/20 min) wird zweimal mit 120 µl eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen. Die Sedimente können bei 4 °C bis zur Analyse im Dunkeln aufbewahrt werden, sollten aber nicht eingefroren werden.

Die Sequenzanalyse erfolgte extern im Servicelabor des Institutes für Zellbiochemie und Neurophysiologie der Universitätsklinik Eppendorf. Die Proben wurden dort auf einem Gel aufgetrennt und die Fluoreszenzmarker beim Austritt aus dem Gel wellenlängenspezifisch mit einem Laser vermessen (ABI Prism, Modell 377). Die Sequenz wurde computergestützt aufgenommen.

10.3.7 Quantifizierung synthetischer Oliognukleotide

10.3.7.1 UV-Messung

Synthetische Oliognukleotide wurden mittels Absorptionsspektrometrie bei einer Wellenlänge von 260 nm quantifiziert. Die DNA wurde dazu in Wasser gelöst und entsprechend verdünnt. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten mit einer Dicke von 1 cm gegen eine Referenzprobe aus Wasser.

10.3.7.2 Fluoreszenzmessung

Für die Untersuchungen zur quantitativen Auswertung der MALDI-TOF-Massenspektren wurden die Oligonukleotide mittels Fluoreszenzspektrometrie quantifiziert. Dies erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers mit dem OliGreen ssDNA Quantitation Kit (Firma Molecular Probes). Die Oligonukleotid-Proben wurden dazu mit TE-Puffer verdünnt und je 100 µl pro Well in einer schwarzen Mikrotiterplatte vorgelegt. Der Farbstoff OliGreen wurde 1:200 mit TE-Puffer verdünnt. Pro Well wurden dann jeweils 100 µl der Farbstofflösung zugegeben und gemischt. Parallel wurde mit einer Verdünnungsreihe eines Oligonukleotids bekannter Konzentration analog verfahren. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluß für 2 bis 5 Minuten. Dann wurde im Mikrotiterplattenreader bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm gegen eine Blindprobe (200 µl Farbstofflösung) gemessen. Aus den Meßwerten für die Verdünnungsreihe wurde eine Eichgerade erstellt, mit deren Hilfe die Konzentrationen der Oligonukleotidlösungen berechnet wurden. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

10.4 Proteinchemische Methoden

10.4.1 Zellaufschluß

Zur Gewinnung des Zellrohextraktes wurde folgendes Aufschlußverfahren angewandt: 500 ml-Kulturen wurden nach dem in Kap. 10.2.2 beschriebenen Verfahren induziert. Nach der Induktion wurden die Zellen abzentrifugiert (5000 rpm/10 min) und das Pellet in 10 ml Sonication-Puffer resuspendiert. Diese Mischung wurde mit 2 ml 10 %iger Triton-X 100-Lösung versetzt und die erhaltene Zellsuspension bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde die Mischung für 15 min auf 70 °C erhitzt, bei -70 °C eingefroren und abschließend erneut für 15 min auf 70 °C erwärmt. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden abzentrifugiert (5000 rpm/30 min) und der Überstand für die chromatographische Aufreinigung verwendet.

10.4.2 Metallchelate-Affinitätschromatographie

Die Proteinisolation erfolgte mit Hilfe der Metallchelate-Affinitätschromatographie⁸⁸.

Vorbereitung der Adsorptionsmatrix

Für eine Aufreinigung von rekombinanter Polymerase mit His-Tag wurden 2 ml Matrixsuspension, Ni-NTA-Agarose (Qiagen), und 2 ml 100 mM NiCl₂-Lösung in Mikro-Spin Zentrifugenfiltern (Fa. Roth GmbH) vermischt und 5 min inkubiert. Die Flüssigkeit wurde kurz abzentrifugiert und das Säulenmaterial mit jeweils 2 ml Wasser, Puffer F und Sonication-Puffer in dieser Reihenfolge gewaschen. Abschließend wurde in 2 ml Sonication-Puffer aufgenommen.

Adsorption

Die vorbereitete Matrix wurde zum Zellrohextrakt der induzierten Zellen gegeben und für 1 Stunde bei 4 °C geschüttelt. Durch Zentrifugation (10000 rpm/20 min) wurde die Ni-NTA-Agarose mit

dem gebundenen Protein abgetrennt. Das Sediment wurde dann viermal mit je 500 µl Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte zweimal mit je 200 µl Elutionspuffer. Dazu wurde jeweils 10 min bei 40 °C inkubiert. Abschließend wurden Eluat und Ni-NTA-Agarose durch kurze Zentrifugation in Zentrifugenfiltern voneinander getrennt. Zur Überprüfung des Isolationsverfahrens wurden auf jeder Reinigungsstufe Proben entnommen und nach dem in Kapitel **10.4.5** beschriebenen Verfahren für die Analyse auf einem SDS-Polyacrylamidgel präpariert. Die aufgetragenen Aliquots entsprachen jeweils einem Ausgangsvolumen von 50 µl Zellkultur.

Zusammensetzung der Pufferlösungen

Sonication-Puffer:	50 mM Na ₂ HPO ₄ 300 mM NaCl (pH 8,0)
Waschpuffer:	Sonication-Puffer + 10 % Glycerin (pH 6,9)
Elutionspuffer:	Sonication-Puffer + 10 % Glycerin + 500 mM Imidazol
Puffer F:	6 M Guanidinhydrochlorid 0,2 M Essigsäure

10.4.3 Ultrafiltration

Für die Proteinmengenbestimmung (s. Kap. **10.4.6**) und die Aktivitätsuntersuchung (Kap. **10.4.7**) wurden die durch Affinitätschromatographie gewonnenen Proteine weiter aufgereinigt. Dazu wurden Einweg-Mikrokonzentratoren der Firma Amicon mit Ultrafiltrationsmembranen einer molekularen Ausschlußgröße von 30000 Da verwendet. Ein Aliquot der Probe wurde in den Ultrafiltrationsaufsatz über einem Auffanggefäß gegeben und ca. 30 min bei 13000 g (11000 rpm) zentrifugiert. Es folgten zwei Waschgänge mit jeweils 100 µl Wasser (13000 g/ca. 30 min). Danach wurde der Ultrafiltrationsaufsatz umgedreht und in ein neues Auffanggefäß gepreßt. Auf die Rückseite der Membran wurde 100 µl Wasser gegeben. Durch fünfminütige Zentrifugation bei 6000 g wurden die Probenmoleküle vollständig von der Membran gelöst.

Die gewonnene Lösung wurde direkt für die Proteinmengenbestimmung eingesetzt. Für die länger-

fristige Lagerung wurde die Enzymlösung mit Aufbewahrungspuffer und Glycerin zu einer Endkonzentration von 50 % (v/v) versetzt. Die Proteinproben konnten dann langfristig bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden.

Taq-DNA-Polymerase-Aufbewahrungspuffer (10x)

200 mM Tris-HCl (pH 8,0)

10 mM DTT

1 mM EDTA

1 M KCl

10% Tween 20

10.4.4 Präparation von Proteinproben für die SDS-Polyacrylamid-Gel-elektrophorese

Die Proteinlösungen wurden mit einem SDS-haltigen Lysepuffer versetzt und auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel analysiert (s. Kap. **10.4.5**).

Zur Untersuchung des Gesamteingehalts wurden *E. coli*-Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (6000 rpm/3 min). Das Sediment wurde in 100 μl Lysepuffer aufgenommen und zunächst für 5 min auf $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, dann für 5 min auf $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Zur Entfernung der unlöslichen Zellbestandteile wurde 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert.

Proteinlösungen wurden zur Vorbereitung ebenfalls in Lysepuffer aufgenommen und wie beschrieben erhitzt. Die Anwesenheit von Ni-NTA-Agarose störte bei der Auftrennung auf dem SDS-Polyacrylamid-Gel nicht, so daß auch die gebundenen Proteinfractionen ohne Elutionsschritt direkt analysiert werden konnte. Die Proben können bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden.

Lysepuffer

0,1 M Tris-HCl (pH 6,8)

5 % SDS

1 M β -Mercaptoethanol

15 % Glycerin

0,005 % BPB

10.4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die gelelektrophoretische Analyse von Proteinen wurden denaturierende, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele¹⁷⁶ verwendet. Die 10 %igen Gele wurden in zwei Schritten gegossen: Zunächst wurde die Gellösung für das Trenngel angefertigt und in die Gelzelle gefüllt, so daß ca. 1 cm des oberen Randes frei bleibt. Zur Bildung einer scharfen, planaren Grenzschicht wurde mit Wasser überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Wasser entfernt und die Lösung für das Sammelgel darauf gegossen. Durch Einstecken eines Probenkammes wurden die Probenaschen geformt. An die Gele mit den in Lysepuffer aufgenommenen Proben (s. Kap. 10.4.5) wurde eine Spannung von 150 - 180 V angelegt, bis die Lauffront mit dem Bromphenolblau des Lysepuffers zur Unterkante des Gels gewandert war. Nach dem Gellauf wurden die Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blue sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel mehrere Stunden in die Färbelösung gelegt und anschließend mit Entfärber behandelt.

Die entwickelten Gele wurden mit der Geldokumentations-Kamera aufgenommen. Eine Modifikation der Gelbilder war nicht notwendig.

Zusammensetzung der Gellösungen für zwei Minigele

<i>Trenngel</i>	<i>Sammelgel</i>	
3,33 ml	0,65 ml	30 %iger Acrylamid/Bisacrylamid Mix 4K (37,5:1), wässrige Lösung(w/v) (AGS GmbH)
4,12 ml	3,05 ml	Wasser
2,5 ml	1,25 ml	Trenngelpuffer bzw. Sammelgelpuffer
50 µl	25 µl	10%ige AMPS-Lösung
5 µl	5 µl	TEMED

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-HCl
0,4 % SDS (pH 8,88)

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris-HCl
0,4 % SDS (pH 6,80)

Elektrophoresepuffer: 0,05 M Tris-HCl
0,2 M Glycin
0,2 % SDS

Färbelösung: 25 % Isopropanol (v/v)
10 % Eisessig (v/v)
0,02 % Coomassie Brilliant Blue (w/v)

Entfärber: 10 % Isopropanol (v/v)
10 % Eisessig (v/v)

verwendete Protein-Größenstandards

Pharmacia Biotech [kDa]:

94; 67; 43; 30; 20,1; 14,4

New England Biolabs; Prestained Protein Marker, Broad Range [kDa]:

175, 83, 62, 48, 33, 25, 17, 7

10.4.6 Bestimmung der Proteinmengenkonzentration

Zur Quantifizierung der isolierten Proteinmengen⁹¹ wurde das Micro BCA Protein Assay Reagent Kit der Firma Pierce benutzt. Die Proteine wurden dazu wie in Kapitel 10.4.2 beschrieben isoliert und aufgereinigt.

Zur Herstellung des Assayreagenz wurden 25 Volumenteile des mitgelieferten Reagenz A mit 24 Volumenteilen Reagenz B und einem Volumenteil Reagenz C vermischt und auf Eis aufbewahrt. Pro Probe wurden 500 µl Assayreagenz in Eppendorfgläsern vorgelegt und jeweils 500 µl der wässrigen Proteinprobe hinzugefügt. Nach sorgfältigem Mischen wurde 30 min bei 60 °C inkubiert. Parallel wurde mit einer Verdünnungsreihe mit einer BSA-Lösung bekannter Konzentration analog verfahren. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden von jeder Probe 200 µl in eine durchsichtige Mikrotiterplatte pipettiert und bei 544 nm im Mikrotiterplattenreader gegen reines Assayreagenz als Referenz vermessen.

Mit Hilfe der BSA-Standard-Proben wurde eine Eichgerade ermittelt. Die Regressionsgerade diente der Berechnung des Proteingehalts der unbekanntenen Proben. Es wurde für jede Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Zusammensetzung der Reagenzien

Reagenz A: Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Natriumtartrat in 0,2 M NaOH

Reagenz B: 4 % BCA in Wasser

Reagenz C: 4 % Kupfer(II)sulfat in Wasser

10.4.7 Methoden der Enzymcharakterisierung

10.4.7.1 Bestimmung der spezifischen Aktivität (radioaktiver Polymerase-Assay)

Die Bestimmung der spezifischen Aktivität erfolgte nach *Maniatis*¹⁷⁴. Dazu wurde mit einer Säurefällung die Einbaurate der dNTPs in das DNA-Template bestimmt. Als Template diente aktivierte Kalbsthymus-DNA (Fa. Sigma Aldrich). Alle Werte wurden durch Dreifachbestimmungen ermittelt. Bei starken Abweichungen der Messwerte wurde die Messung wiederholt. Als Kontrolle wurden bei jeder Messung Nullproben ohne Enzym vermessen. Die Werte der Nullproben sollten maximal 10 % der normalen Messwerte betragen. Als Referenz wurde Taq-Polymerase der Firma Roche verwendet. Bei den Arbeiten mit radioaktivem [α -³²P]dCTP (10 mCi/ml) folgte nach jedem Mischen der Proben ein Zentrifugationsschritt.

Die Reaktionsansätze für die Aktivitätsbestimmung hatten folgende Zusammensetzung:

5 μ l 5x Puffer
2,5 μ l aktivierte Kalbsthymus DNA (6 μ g)
0,5 μ l dNTP-Mix (10 mM dATP, dTTP, dGTP, 5 mM dCTP)
1 μ l [α -³²P]dCTP (1 μ Ci)
x μ l Enzymlösung
y μ l Wasser

25 μ l Gesamtvolumen

Die Volumenangaben x und y ergeben sich aus der jeweils eingesetzten Menge an Enzymlösung. Bis auf das radioaktive Nukleotid wurden alle Komponenten auf Eis vermischt. Bei Temperaturen von unter 35 °C besitzt die Taq-Polymerase kaum noch enzymatische Aktivität⁵¹. Erst dann wurde [α -³²P]dCTP zugegeben und der Reaktionsansatz gemischt. Die Polymerisationsreaktion wurde

durch Inkubation bei 74 °C im Thermocycler gestartet. Nach 10 min wurden die Proben auf Eis gestellt und die Reaktion durch Zugabe von jeweils 5 µl 60 mM EDTA-Lösung gestoppt. Zur Fällung wurden die Reaktionsansätze aufgeteilt: Jeweils 10 µl eines Ansatzes wurden auf je ein Glasfaser-Filterpapier (GF/C, Fa. Whatman) pipettiert und bei Raumtemperatur getrocknet. Ein Satz der Filterpapiere wurde in je 5 ml eiskalte 10 %ige (w/v) Trichloressigsäure(TCA)/20 mM Natriumpyrophosphat-Lösung getaucht und 5 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurde dreimal mit je 5 ml eiskalter 5 %iger (w/v) TCA/20 mM Natriumpyrophosphatlösung und einmal mit 5 ml 96 %igem Ethanol gewaschen. Die Trocknung der Filterpapiere erfolgte bei Raumtemperatur. Beide Filtersätze wurden in Zählröhrchen überführt und mit je 4 ml Szintillationsflüssigkeit überschichtet (Rotiszint ecoplus, Fa. Roth). In einem Szintillationszähler wurde mit einer Meßzeit von 5 min pro Probe die β-Strahlung gemessen.

Die spezifische Aktivität wurde mit Hilfe der Proteinkonzentrationen der Taq-Polymerase-Varianten ermittelt. Dazu wurde ein GC-Gehalt der Kalbsthymus-DNA von 44 % zugrunde gelegt.

Reaktionspuffer (5x)

125 mM TAPS-HCl

250 mM KCl

10 mM MgCl₂

5 mM Dithiothreit (pH 9,3)

10.4.7.2 Bestimmung der spezifischen Aktivität (nicht-radioaktiver Polymerase-Assay)

Als Alternative zum radioaktiven Assay wurde ein Kit für die nicht-radioaktive Bestimmung von Polymerase-Aktivität der Firma Roche verwendet. Dabei wurde nach den Anweisungen des Herstellers verfahren. Alle Werte wurden durch Dreifachbestimmung ermittelt.

Die Reaktionsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

20 µl Reaktionsmischung	(Tris-Puffer mit Dig-dUTP, Biotin-dUTP, dNTP, Primer, MgCl ₂ , DTE)
10 µl Template	(Tris-EDTA-Puffer mit aktivierter DNA)
x µl Enzymlösung	
y µl Wasser	

100 µl Gesamtvolumen	

Die Volumenangaben x und y ergeben sich aus der jeweils eingesetzten Menge an Enzymlösung. Die einzelnen Komponenten wurden auf Eis zusammengegeben und gemischt. Die Reaktion erfolgte für 1 h bei 74 °C in einem Thermocycler. Durch Zugabe von jeweils 5 µl 0,5 M EDTA-Lösung wurde sie gestoppt und die Proben nach gründlichem Mischen auf Eis gestellt.

Die Reaktionslösungen wurden dann in Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten überführt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und die Mikrotiterplatte fünfmal mit 250 µl Waschpuffer (PBS mit Tween 20) pro Well für mindestens 30 sec gewaschen. Die Reste an Waschpuffer wurden sorgfältig entfernt. Anschließend wurden pro Well 200 µl Antikörperkonjugat-Lösung (Anti-DIG-POD, 200 mU/ml) zugegeben und erneut bei 37 °C inkubiert. Nach einer Stunde wurde der Überstand entfernt und die Mikrotiterplatte fünfmal mit 250 µl Waschpuffer (PBS mit Tween 20) pro Well für mindestens 30 sec gewaschen. Die Reste des Waschpuffers wurden gründlich entfernt. Pro Well wurden dann 200 µl ABTS-Lösung zugegeben und bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Die Absorption bei 405 nm wurde mit einem Mikrotiterplattenreader gegen reine ABTS-Lösung als Referenz gemessen.

Als Standard diente ein mit je einem Biotin- und Digoxigenin markiertes Kontrollpeptid. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe dieses Peptids konnte eine Kalibrierungskurve erstellt werden, die einen linearen Zusammenhang zwischen Absorption und der Menge an enthaltenem Digoxigenin herstellt. Mit dieser Kurve wurde der lineare Bereich des Assays mit einer Menge von 50 fmol bis 3 fmol Digoxigenin ermittelt. Zusätzlich wurde bei jeder Messung eine Verdünnungsreihe von Taq-Polymerase (Fa. Roche) mitgeführt. Sie diente als Referenz für die Berechnung der Polymeraseaktivität.

Hierfür wurde ein linearer Bereich des Assays zwischen 0,075 und 0,0025 U ermittelt.

10.4.7.3 Primer-Extension-Reaktion

Für die Untersuchung der Taq-Varianten wurde eine Primer-Extension-Reaktion eingesetzt. Als Template diente ein synthetisches 30mer, das die Primerbindungsstelle für den USP enthielt. Die Reaktionen erfolgten in einer Mikrotiterplatte. Die Zusammensetzung der Reaktionsmischungen war folgendermaßen:

1 µl Bio-USP (10 pmol)
1 µl Template (1 pmol)
2 µl 10x Reaktionspuffer
1 µl dNTP-Mix (je 5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
2,5 µl Enzymlösung
11,5 µl Wasser

20 µl Gesamtvolumen

Es wurde aus parallel durchgeführten Enzymaufreinigungen jeweils eine gleiche Menge Enzymlösung verwendet.

Temperaturprogramme:

- Standard-PCR-Programm:
 - 5 min 95 °C
 - 25 Zyklen: 1 min 95 °C
 - 1 min 49 °C
 - 1 min 72 °C
 - hold 4 °C
- verkürzte Zyklenzahl:
 - 5 min 95 °C
 - 10 Zyklen: 1 min 95 °C
 - 1 min 49 °C
 - 1 min 72 °C
 - hold 4 °C
- ohne Zyklisierung:
 - 5 min 95 °C
 - 5 min 49 °C
 - 10 min 72 °C
 - hold 4 °C

10.4.7.4 Probenkonditionierung für die MALDI-TOF-MS

Die Probenkonditionierung erfolgte aufgrund der großen Probenzahl in Mikrotiterplatten. Lediglich die Vorbereitung und Zugabe der magnetischen Streptavidin Beads erfolgte manuell. Alle übrigen Schritte wurden durch einen Pipettierroboter durchgeführt.

Pro Reaktionsansatz wurden 10 µl Streptavidin Beads (Fa. Dynal) benutzt. Die Beads wurden einmal mit je 10 µl 1x B/W-Puffer gewaschen und dann in je 20 µl 2x B/W-Puffer aufgenommen. Die vorbereiteten Beads wurden mit den Reaktionsansätzen 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde nach magnetischer Separation entfernt, und die Beads einmal mit 50 µl 10 mM

TrisHCl (pH 8.0) gewaschen. Zur Abtrennung des Templates wurde 25 µl 2 M Ammoniaklösung zugegeben und 5 min bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde verworfen und die Denaturierung wiederholt. Abschließend wurden die Beads dreimal mit je 50 µl 10 mM TrisHCl (pH 8.0) gewaschen. Im letzten Schritt wurde der biotinylierten Strang von den Beads abgespalten. Dazu wurden je 10 µl 2 M Ammoniaklösung zugegeben und 10 min bei 65 °C inkubiert. Die Überstände wurden in eine frische Mikrotiterplatte überführt und 30 min bei Raumtemperatur zur Abdampfung des Ammoniaks geschüttelt.

Die Proben wurden mit Hilfe einer piezoelektrischen Pipette auf einen SEQUENOM SpectroCHIP mit vorgefertigten Matrixspots übertragen und automatisch im Massenspektrometer vermessen. Die Aufwertung erfolgte durch die Software Spectrotyper RT der Fa. SEQUENOM.

10.4.7.5 Primer-Extension-Reaktion mit immobilisierter Taq-Polymerase

Die Festphasenversion der Primer-Extension-Reaktion wurde in Mikrotiterplatten mit flachem Boden und in einem Reaktionsvolumen von 100 µl durchgeführt, so daß die Chips komplett mit Reaktionslösung bedeckt waren. Dabei wurden die Wafer zunächst mit einer Reaktionslösung ohne Nucleotid überschichtet und einem verkürzten PCR-Programm (Programm a) ausgesetzt. Die Reaktionslösung hatte dabei folgende Zusammensetzung:

1 µl Bio-USP (10 pmol)
1 µl Template (1 pmol)
10 µl 10x Reaktionspuffer
87 µl Wasser

99 µl Gesamtvolumen

Parallel wurden in derselben Mikrotiterplatte die gleiche Anzahl vollständiger Reaktionslösungen angesetzt und ebenfalls diesem Vor-PCR-Programm unterzogen. Die Zusammensetzung dieser Ansätze war folgendermaßen:

1 µl Bio-USP (10 pmol)
1 µl Template (1 pmol)
1 µl dGTP (5 mM)
10 µl 10x Reaktionspuffer
87 µl Wasser

100 µl Gesamtvolumen

Nach Ablauf der Vorinkubation, durch die nicht kovalent gebundenes Enzym von der Oberfläche entfernt werden sollte, wurden die Enzym-Wafer aus der Lösung entnommen und in die vollständigen Reaktionslösungen überführt. Der erste Satz Reaktionslösungen wurde durch die Zugabe von 1 µl dGTP (5 mM) komplettiert und die gesamte Mikrotiterplatte einem zweiten, längeren PCR-Programm (Programm b) unterworfen. Nach Ablauf der Reaktion wurden die Reaktionsansätze wie unter Kapitel **10.4.7.4** beschrieben für die massenspektrometrische Analyse konditioniert. Dabei wurden die Chips während der Inkubation mit den Streptavidin-Beads in der Reaktionslösung belassen, nach der ersten magnetischen Separation aber entfernt, da sie in den nächsten Schritten die Abtrennung der Beads vom jeweiligen Überstand störten.

PCR-Programme

Programm a:

	1 min	80 °C
3 Zyklen:	2 min	80 °C
	2 min	40 °C
	2 min	72 °C
	hold	25 °C

Programm b:

	1 min	80 °C
25 Zyklen:	2 min	80 °C
	2 min	40 °C
	2 min	72 °C
	10 min	72 °C
	hold	25 °C

10.5 Chemische Methoden

10.5.1 Funktionalisierung der Silizium-Oberfläche

Die Silizium-Wafer wurden mit Ethanol gewaschen und im Muffelofen bei 1000 °C für 15 min ausgeglüht. Die noch heißen Wafer wurden in je 750 µl einer 25 %igen 3-(Triethoxysilyl)-propylamin-Lösung in Toluol gegeben und bei 65 °C über Nacht geschüttelt. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Wafer dreimal mit je 750 µl Toluol, DMSO, Ethanol, 0,05 M NaHCO₃-Lösung, Wasser und Ethanol in dieser Reihenfolge gewaschen.

10.5.2 Aktivierung der aminofunktionalisierten Silizium-Chips mit DITC

Die aminofunktionalisierten Wafer aus Kapitel 10.5.1 wurden dreimal mit DMF gewaschen, in frische Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit je 750 µl einer 0,1 M DITC-Lösung in DMF/Pyridin 10:1 für 2 Std. bei 40 °C geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen und die Wafer jeweils mit je 750 µl DMF und Ethanol gewaschen.

10.5.3 Immobilisierung von Taq-Polymerase an Silizium-Chips

Die nach Umsetzung mit DITC aktivierten Silizium-Wafer (s. Kap. 10.5.2) wurden dreimal mit Immobilisierungspuffer gewaschen und in frische Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Sie wurden dann mit Immobilisierungspuffer überschichtet und mit 20 µg Taq-DNA-Polymerase in wässriger Lösung aus Kapitel 10.4.4 unter kräftigem Schütteln bei 37 °C eine Stunde inkubiert. Abschließend wurde jeweils dreimal mit Immobilisierungspuffer und Wasser gewaschen. Parallel wurde zur Kontrolle mit gelühten und aminofunktionalisierten Chips ebenso verfahren.

Zusammensetzung der Puffer

Polymerase-Puffer:	10 mM Tris
	1,5 mM MgCl ₂
	50 mM KCl (pH 8,3)
Wetting-Solution:	10 ml 2-Propanol
	9,4 ml Wasser
	200 µl N-Methylmorpholin
	400 µl Tween 20
Immobilisierungspuffer:	Polymerase-Puffer/Wetting-Solution 5:1

11 Anhang

11.1 Gefahrstoffe

<i>Stoffbezeichnung</i>	<i>Gef.-Symbol</i>	<i>R-Sätze</i>	<i>S-Sätze</i>
Acetonitril	F, T	11-23/24/25	16-27-45
Acrylamidlösung	T	45-46-24/25-48/23/24/25	53-45
Ammoniaklösung 32 %	C, N	34-50	26-36/37/39-45-61
Bicinchoninsäure	Xn	36/37-42	22-26-36
CTAB	Xn, N	22-36/38-50/53	26-39-61
N,N-Dimethylformamid	T	61-E20/21-36	24/26-37/39-45
Essigsäure	C	10-35	23.2-26-45
Ethidiumbromid	T ⁺	22-26-36/37/38-40	26-28.2-36/37-45
Ethylendiamintetraessigsäure Di-natriumsalz	Xn	22	--
3-Hydroxypicolinsäure	--	36/37/38	26-37/39
Imidazol	C	22-34	22-26-36/37/39-45
2-Mercaptoethanol	T, N	22-23/24-34-51/53	26-36/37/39-45-61
Natriumcarbonat	Xi	35	22-26
Natriumdodexylsulfat	Xn	--	22-36/38
Natriumhydroxid	C	35	7/8-26
Nickel(II)chlorid	T	25-43	24-37-45
2-Propanol	F	11	7-16
Pyridin	F, Xn	11-20/21/22	26-28.1
Salzsäure 32 %	C	34-37	26-36/37/39-45
N,N,N',N'-Tetramethylendiamin	F, Xn	11-20/22-37/38-41	16-26-39
Toluol	F, Xn	11	16-25-29-33
Trichloressigsäure	C, N	35-50/53	26-36/37/39-45-60-61
Triethylamin	F, C	11-20/21/22-35	3-16-26-29-36/37/39-45
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Xi	36/38	5 --
Triton-X 100	Xn	22-41	24-26-39

Tab. 11-1: Gefahrenmerkmale und Sicherheitsratschläge von verwendeten Substanzen

11.2 Entsorgungshinweise

Organische halogenfreie bzw. halogenhaltige Lösungsmittel wurden in gesonderte Sammelbehälter gegeben. Saure bzw. alkalische Lösungen wurden neutralisiert und entsprechend der Lösungsmittelart entsorgt.

12 Literaturverzeichnis

- 1 International Human Genome Sequencing Consortium
Nature **409** (2001) 860-921
Initial sequencing and analysis of the human genome
- 2 J.C. Venter et al.
Science **291** (2001) 1304-1351
The sequence of the human genome
- 3 V.A. McKusick
Genomics **5** (1989) 385-387
HUGO news. The Human Genome Organization: history, purposes and membership
- 4 C.R. Cantor
Science **248** (1990) 49-51
Orchestrating the Human Genome Project
- 5 E. Marshall
Science **290** (2000) 2042-2043
Human Genome. Stormerupts over terms for publishing Celera's sequence
- 6 L. Roberts, R.J. Davenport, E. Pennisi, E. Marshall
Science **291** (2001) 1195
A history of the Human Genome Project
- 7 <http://gdbwww.gdb.org>
- 8 L.T. Franca, E. Carrilho, T.B. Kist
Q. Rev. Biophys. **35** (2002) 169-200
A review of DNA sequencing techniques
- 9 J.A. Luckey, H. Drossman, A.J. Kostichka, D.A. Mead, J. D'Cunha, T.B. Norris, L.M. Smith
Nucleic Acids Res. **18** (1990)4417-4420
High speed DNA sequencing by capillary electrophoresis
- 10 A.S. Cohen, D.R. Neyarian, B.L. Karger
J. Chromatography **516** (1990) 49-60
Separation and analysis of DNA sequence reactions products by capillary gel electrophoresis
- 11 J.M. Prober, G.L. Trainor, R.J. Dam, F.W. Hobbs, C.W. Robertson, R.J. Zagursky, A.J. Cocuzza, M.A. Jensen, K. Baumeister
Science **238** (1987) 336-341
A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides
- 12 F.S. Collins, A. Patrinos, E. Jordan A. Chakravarti, R. Gesteland, L. Walters
Science **282** (1998) 682
New goals for the U.S. Human Genome Project: 1998-2003

- 13 Human Genome Project Information
SNP fact sheet, <http://www.ornl.gov/hgmis>
- 14 R. Froböse
Nachr. Chem. **50** (2002) 819-822
Individualisierte Medizin – Chance oder Risiko?
- 15 K. Ishikawa, G. Tsujimoto
Nippon Yakurigaku Zasshi **118** (2001) 170-176
New strategies on medical research after completion of genome sequencing
- 16 M. Gannon
Trends Genet. **17** (2001) 23-28
Molecular genetic analysis of diabetes in mice
- 17 P.H. St. George-Hyslop et al.
Nature **347** (1990) 194-197
Genetic linkage studies suggest that Alzheimer's disease is not a single homogeneous disorder
- 18 M. Stratton
Nature **409** (2001) 850
Cancer and genomics
- 19 F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson
Proc. Natl. Acad. Sci. **74** (1977) 560-564
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors
- 20 S. Labeit, H. Lehrach, R.S. Goody
DNA **5** (1986) 173-177
A new method of DNA sequencing using deoxynucleoside α -thiotriphosphates
- 21 J.L. Wolfe, T. Kawate, D.A. Sarracino, M. Zillmann, J. Olson, V.P. Stanton jr.
G.L. Verdine
Proc. Natl. Acad. Sci. **99** (2002) 11073-11078
A genotyping strategy based on incorporation and cleavage of chemically modified nucleotides
- 22 S. Lutz, P. Burgstaller, S.A. Benner
Nucleic Acids Res. **27** (1999) 2972-2798
An in vitro screening technique for DNA polymerases that can incorporate modified nucleotides:
Pseudothymidine as a substrate for thermostable polymerases
- 23 R. Frank, H. Köster
Nucleic Acids Res. **6** (1979) 2069-2087
DNA chain length markers and the influence of base composition on electrophoretic mobility of
oligodeoxyribonucleotides in polyacrylamid-gels
- 24 M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp
Anal. Chem. **57** (1985) 2935-2939
Influence of wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry

- 25 M. Karas, U. Bahr, A. Ingendoh, E. Nordhoff, B. Stahl, K. Strupat, F. Hillenkamp
Anal. Chim. Acta **241** (1991) 175-185
Principles and applications of matrix-assisted UV-laser desorption/ionization mass spectrometry
- 26 M. Karas, F. Hillenkamp
Anal. Chem. **60** (1988) 2299-2301
Laser desorption ionization of proteins with molecular masses extending 10,000 daltons
- 27 K. Tanaka, H. Waki, Y. Ido, S. Akita, Y. Yoshida, T. Yoshida
Rapid Commun. Mass Spectrom. **2** (1988) 151-153
- 28 M. Karas, U. Giessmann
Labor 2000 (1992) 71-83
Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Massenspektrometrie
- 29 K.J. Wu, A. Steding, C. Becker
Rapid Commun. Mass Spec. **7** (1993) 142-146
Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of oligonucleotides using 3-hydroxypicolinic acid as an ultraviolet-sensitive matrix
- 30 F. Lottspeich, H. Zorbas (Hrsg.)
Spektrum Akademische Verlag (1998) 323ff.
Bioanalytik
- 31 R.J. Cotter
Anal. Chem. **64** (1992) 1027
Time-of-flight mass spectrometry for the structural analysis of biological molecules
- 32 W.C. Wiley, I.H. McLaren
Rev. Sci. Instrum. **26** (1995) 1150
Time-of-flight mass spectrometer with improved resolution
- 33 K. Tang, N.I. Taranenko, S.L. Allman, L.Y. Chang, C.H. Chen
Rapid Commun. Mass Spectrom. **8** (1994) 727-730
Detection of 500-nucleotide DNA by laser desorption mass spectrometry
- 34 U. Piles, W. Zürcher, M. Schär, H.E. Moser
Nucleic Acids Res. **21** (1993) 3191-3196
Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides
- 35 H. Köster, K. Tang, D.-J. Fu, A. Braun, D. van den Boom, C.L. Smith, R.J. Cotter, C.R. Cantor
Nature Biotech. **14** (1996) 1123-1128
A strategy for rapid and efficient DNA sequencing by mass spectrometry
- 36 N.R. Isola, S.L. Allman, U.U. Golovlov, C.-H. Chen
Anal. Chem. **71** (1999) 2266-2269
Chemical cleavage sequencing of DNA using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

- 37 U. Puapaiboon, J. Jai-nhuknan, J.A. Cowan
Anal. Chem. **72** (2000) 3338-3341
Characterization of a multi-functional metal-mediated nuclease by MALDI-TOF mass spectrometry
- 38 M.S. Shchepinov, M.F. Denissenko, K.J. Smylie, R.J. Wörl, A.L. Leppin, C.R. Cantor, C.P. Rodi
Nucleic Acids Res. **29** (2001) 3864-3872
Matrix-induced fragmentation of P3'-N5' phosphoramidite-containing DNA: high-throughput MALDI-TOF analysis of genomic sequence polymorphisms
- 39 K.H. Buetow, M. Edmondson, R. MacDonald, R. Clifford, P. Yip, J. Kelley, D.P. Little, R. Strausberg, H. Köster, C.R. Cantor, A. Braun
Proc. Natl. Acad. Sci. **98** (2001) 581-584
High-throughput development and characterization of a genomewide collection of gene-based single nucleotide polymorphism markers by chip-based matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
- 40 M. Werner, M. Sych, N. Herbon, T. Illig, I.R. König, M. Wjst
Hum. Mutat. **20** (2002) 57-64
Large-scale determination of SNP allele frequencies in DNA pools using MALDI-TOF mass spectrometry
- 41 D. Lechner, G.M. Lathrop, I.G. Gut
Curr. Opin. Chem. Biol. **6** (2002) 31-38
Large-scale genotyping by mass spectrometry: experience, advances and obstacles
- 42 S. Sauer, D.H. Gelfand, F. Boussicault, K. Bauer, F. Reichert, I.G. Gut
Nucleic Acids Res. **30** (2002) 22
Facile method for automated genotyping of single nucleotide polymorphisms by mass spectrometry
- 43 C. Jurinke, D. van den Boom, C.R. Cantor, H. Köster
Methods Mol. Biol. **187** (2002) 179-192
Automated genotyping using the DNA MassArray technology
- 44 R.K. Saiki, D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis, H.A. Ehrlich
Science **239** (1988) 487-491
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase
- 45 M. Innis, K.B. Myambo, D.H. Gelfand, M.A. Brown
Proc. Natl. Acad. Sci. **85** (1988) 9436-9440
DNA-sequencing with *T. aquaticus*-polymerase I and direct sequencing of PCR-amplified DNA
- 46 F.C. Lawyer, S. Stoffel, R.K. Saiki, K.B. Myambo, R. Drummond, D.H. Gelfand
J. Biol. Chem. **264** (1989) 6427-6437
Isolation, characterization and expression in *E. coli* of the DNA polymerase gene from *T. aquaticus*
- 47 Y. Kim, S.H. Eom, J. Wang, D.-S. Lee, S.W. Suh, T.A. Steitz
Nature **376** (1995) 612-616
Crystal structure of Taq DNA polymerase

- 48 S.H. Eom, J. Wang, T.A. Steitz
Nature **382** (1996) 278-281
Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site
- 49 M. Delarue, O. Poch, N. Tordo, D. Moras, P. Argos
Protein Eng. **3** (1990) 461-467
An attempt to unify the structure of polymerases
- 50 R. Sousa
Trends Biochem. Sci. **21** (1996) 186-190
Structural and mechanistic relationships between nucleic acid polymerases
- 51 F.C. Lawyer, S. Stoffel, R.K. Saiki, S.-Y. Chang, P.A. Landre, R.D. Abramson
D.H. Gelfand
PCR Meth. Appl. **2** (1993) 275-287
High-level expression, purification and enzymatic characterization of full-length Taq DNA-polymerase and a truncated form deficient in 5'-3'-exonuclease activity
- 52 L.S. Merkens
Biochim. Biophys. Acta **1264** (1995) 243-248
Inactivation of the 5'-3'-exonuclease of *Thermus aquaticus* DNA polymerase
- 53 S. Korolev, M. Nayal, W.M. Barnes, E. DiCera, G. Waksman
Proc. Natl. Acad. Sci. **92** (1995) 9264-9268
Crystal structure of the large fragment of Taq DNA polymerase I at 2.5-Å resolution: structural basis for thermal stability
- 54 K.A. Eckert, T.A. Kunkel
Nucleic Acids Res. **18** (1990) 3739-3744
High fidelity DNA synthesis by Taq-DNA-polymerase
- 55 J. Cline, J.C. Braman, H.H. Hogrefe
Nucleic Acids Res. **24** (1996) 3546-3551
PCR fidelity of Pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases
- 56 M.E. Dahlberg, S.J. Benkovic
Biochemistry **30** (1991) 4835-4843
Kinetic mechanism of DNA polymerase I (Klenow fragment): identification of a second conformational change and evaluation of the internal equilibrium constant
- 57 A.H. Polesky, T.A. Steitz, N.D. Grindley, C.M. Joyce
J. Biol. Chem. **265** (1990) 14579-14591
Identification of residues critical for the polymerase activity of the Klenow fragment of DNA polymerase I from *E. coli*
- 58 A.H. Polesky, T.A. Steitz, M.E. Dahlberg, S.J. Benkovic, N.D. Grindley, C.M. Joyce
J. Biol. Chem. **267** (1992) 8417-8428
Side chains involved in catalysis of the polymerase reaction of DNA polymerase I from *E. coli*

- 59 C.M. Joyce, T.A. Steitz
Annu. Rev. Biochem. **63** (1994) 777-822
Function and structure relationships in DNA polymerases
- 60 L.S. Beese, J.M. Freidman, T.A. Steitz
Biochemistry **32** (1993) 14095-14101
Crystal structure of the Klenow fragment of DNA polymerase I complexed with deoxynucleoside triphosphate and pyrophosphate
- 61 M. Astatke, N.D.F. Grindley, C.M. Joyce
J. Biol. Chem. **270** (1995) 1945-1954
Deoxynucleoside triphosphate and pyrophosphate binding sites in the catalytically competent ternary complex for the polymerase reaction catalyzed by DNA polymerase I (Klenow fragment)
- 62 S.S. Carroll, M. Cowart, S. Benkovic
Biochemistry **30** (1991) 804-813
A mutant of DNA polymerase I (Klenow fragment) with reduced fidelity
- 63 J. B. Bell, K.A. Eckert, C.M. Joyce, T.A. Kunkel
J. Biol. Chem. **272** (1997) 7345-7351
Base miscoding and strand misalignment errors by mutator Klenow polymerase with amino acid substitutions at tyrosine 766 in the O-helix of the fingers subdomain
- 64 M. Suzuki, D. Baskin, L. Hood, L.A. Loeb
Proc. Natl. Acad. Sci. **93** (1996) 9670-9675
Random mutagenesis of Taq DNA polymerase I: concordance of immutable sites in vivo with the crystal structure
- 65 M. Suzuki, A.K. Avicola, L. Hood, L.A. Loeb
J. Biol. Chem. **272** (1997) 11228-11235
Low fidelity mutants in the O-helix of Taq DNA polymerase I
- 66 S. Tabor, C.C. Richardson
Proc. Natl. Acad. Sci. **92** (1995) 6339-6343
A single residue in DNA polymerase of the PolI family is critical for distinguishing between ddNTPs and dNTPs
- 67 S.E. Lee, A. Sidorov, T. Gourelain, N. Mignet, S.J. Thorpe, J.A. Brazier, M.J. Dickmann, D.P. Hornby, J.A. Grasby, D.M. Williams
Nucleic Acids Res. **29** (2001) 1565-1573
Enhancing the catalytic repertoire of nucleic acids: a systematic study of linker length and rigidity
- 68 H. Strobel, L. Dugué, P. Marlière, S. Pochet
Nucleic Acids Res. **30** (2002) 1869-1878
Synthesis and recognition by DNA polymerases of a reactive nucleoside, 1-(2-Deoxy-β-erythro-pentofuranosyl)-imidazole-4-hydroazide
- 69 G.F. Joyce
Proc. Natl. Acad. Sci. **95** (1998) 5845-5847
Nucleic acid enzymes: playing with a fuller deck

- 70 H.A. Held, S.A. Benner
Nucleic Acids Res. **30** (2002) 3857-3869
Challenging artificial genetic systems: thymidine analogs with 5-position sulfur functionality
- 71 A. Nguyen, C. Zhao, D. Dorris, A. Mazumder
BMC Biotechnol. **2** (2002) 14
Quantitative assessment of the use of modified nucleoside triphosphates in expression profiling: differential effects on signal intensities and impacts in expression ratios
- 72 C. Siegert
Dissertation 1999, Universität Hamburg
Chemische und enzymatische Synthese modifizierter Nukleinsäuren für die Analytik mit Hilfe der MALDI-TOF Massenspektrometrie
- 73 S. Atrott
Dissertation 2001, Universität Hamburg
2'-Desoxy-7,9-dideaza-7-oxoadenosin: Ein optimierter Baustein für die MALDI-TOF Massenspektrometrie und biochemische DNA-Analytik
- 74 A. Chien, D.B. Edgar, J.M. Trela
J. Bacteriol. **127** (1976) 1550-1557
Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*
- 75 T. Kenkel, J.M. Trela
J. Bact. **140** (1979) 543-546
Proteinturnover in the extreme thermophile *Thermus aquaticus*
- 76 C. Pauk
Diplomarbeit 1997, Universität Hamburg
In vitro-Mutagenese des DNA-Polymerase I-Gens aus *Thermus aquaticus*
- 77 E. Amann, J. Brosius, M. Ptashne
Gene **25** (1983) 167-178
Vectors bearing a hybrid trp-lac promotor useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*
- 78 R. Chen, W. Schmidmayr, C. Kramer, U. Chen-Schmeisser, U. Henning
Proc. Natl. Acad. Sci. **77** (1980) 4592-4596
Primary structure of major outer membrane protein I (ompF, porin) of *Escherichia coli* B/r
- 79 V. Derbyshire, P.S. Freemont, M.R. Sanderson, L. Beese, J.M. Friedman, C.M. Joyce, T.A. Steitz
Science **240** (1988) 199-201
Genetic and crystallographic studies of the 3'-5'-exonucleolytic site of DNA polymerase I
- 80 V. Derbyshire, N.D. Grindley, C.M. Joyce
EMBO J. **10** (1991) 17-24
The 3'-5'-exonuclease of DNA polymerase I of *E. coli*: contribution of each amino acid at the active site to the reaction

-
- 81 D.T. Minnick, M. Astatke, C.M. Joyce, T.A. Kunkel
J. Biol. Chem. **271** (1996) 24954-24961
A thumb subdomain mutant of the large fragment of *E. coli* DNA polymerase I with reduced DNA binding affinity, processivity and frameshift fidelity
- 82 Y. Li, S. Korolev, G. Waksman
EMBO J. **17** (1998) 7514-7525
Crystal structure of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I: structural basis for nucleotide incorporation
- 83 M. Czubayko
Dissertation 2000, Technische Universität Braunschweig
Herstellung der *Thermus aquaticus* DNA Polymerase und Untersuchung ihrer dNTP-Substrataffinität
- 84 R. Sousa, R. Padilla,
EMBO J. **14** (1995) 4609-4621
A mutant T7 RNA polymerase as a DNA polymerase
- 85 D.A. Kostyuk, S.M. Dragan, D.L. Lyakhov, V.L. Tunitskaya, B.K. Chernov, S.N. Kochetkov
FEBS Letters **369** (1995) 165-168
Mutants of T7 RNA polymerase that are able to synthesize both RNA and DNA
- 86 P.N. Hengen
Trends Biochem. Sci. **20** (1995) 285-286
Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*
- 87 J. Porath
Protein Expression Purif. **3** (1992) 263-281
Immobilized metal ion affinity chromatography
- 88 E. Hochuli, H. Döbeli, A. Schacher
J. Chromatogr. **411**(1987) 177-184
New metal chelat adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues
- 89 E. Hochuli
Genetic Engineering **12** (1990) 87-98
Purification of recombinant proteins with metal chelat adsorbent
- 90 The QIAexpressionist, Qiagen (2001) 18-19
- 91 O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall
J. Biol. Chem. **193** (1959) 265-275
Protein measurement with the folin phenol reagent
- 92 P.K. Smith, R.J. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, D.C. Klenk
Anal. Biochem. **159** (1985) 76-85
Measurement of protein using bicinchoninic acid
- 93 U.S. Patent No. 4,839,295

- 94 K. Wiechelmann, R. Braun, J. Fitzpatrick
Anal. Biochem. **175** (1988) 231-237
Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of groups responsible for colour formation
- 95 K.S. Lundberg, D.D. Shoemaker, M.W.W. Adams, J.M. Short, J.A. Sorge, E.J. Mathur
Gene **108** (1991) 1-6
High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*
- 96 H.J. Hölteke, W. Ankenbauer, K. Mühlegger, R. Rein, G. Sagner, R. Seibl, T. Walter
Cell. Mol. Biol. **41** (1995) 883-905
The digoxigenin (DIG) system for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids – an overview
- 97 K. Yoshida, A. Tosaka, H. Kamiya, T. Murate, H. Kasai, Y. Nimura, M. Ogawa
S. Yoshida, M. Suzuki
Nucleic Acids Res. **29** (2001) 4206-4214
Arg660Ser mutation in *Thermus aquaticus* DNA polymerase I suppresses T?C transitions: implication of wobble base pair formation at the nucleotide incorporation step
- 98 G. Gao, M. Orlova, M.M. Georgiadis, W.A. Hendrickson, S.P. Goff
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94** (1997) 407-411
Conferring RNA polymerase activity to a DNA polymerase: a single residue in reverse transcriptase controls substrate selection
- 99 D.P. Little, T.J. Cornish, M.J. O'Donnel, A. Braun, R.J. Cotter, H. Köster
Anal. Chem. **69** (1997) 4540-4546
MALDI on a chip: analysis of arrays of low-femtomole to subfemtomole quantities of synthetic oligonucleotides and DNA diagnostic products dispensed by a piezoelectric pipet
- 100 C. Mülhardt
Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 2000
Der Experimentator: Molekularbiologie
- 101 J.M. Clark
Nucleic Acids Res. **19** (1988) 9677-9686
Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases
- 102 A.A. Purmal, Y.W. Kow, S.S. Wallace
Nucleic Acids Res. **22** (1994) 72-78
Major oxidative products of cytosine, 5-hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil, exhibit sequence context-dependent mispairing *in vitro*
- 103 S. Shigeta, S. Mori, T. Kira, K. Takahashi et al.
Antivir. Chem. Chemother. **10** (1999) 195-209
Anti-herpesvirus activities and cytotoxicities of 2-thiopyrimidine nucleoside analogues *in vitro*

- 104 T.W. Myers, D.H. Gelfand
Biochemistry **30** (1991) 7661-7665
Reverse transcription and DNA amplification by *Thermus thermophilus*
- 105 V.I. Grabko, L.G. Christyakova, V.N. Lyapustin, V.G. Korobko, A.J. Miroshnikov
FEBS Lett. **387** (1996) 189-192
Reverse transcription, amplification and sequencing of poliovirus RNA by Taq DNA polymerase
- 106 A.L. Shaffer, W. Wojnar, W. Nelson
Anal. Biochem. **190** (1990) 292-296
Amplification, detection and automated sequencing of Gibbon interleukin-2 mRNA by *Thermus aquaticus* DNA polymerase reverse transcription and polymerase chain reaction
- 107 R. Iakobashvili, A. Lapidot
Nucleic Acids Res. **27** (1999) 1566-1568
Low temperature cycled PCR protocol for Klenow fragment of DNA polymerase I in the presence of proline
- 108 C.S. Rajendrakumar, T. Syrynarayana, A.R. Reddy
FEBS Lett. **410** (1997) 201-205
DNA helix destabilization by proline and betaine: possible role in the salinity tolerance process
- 109 K. Varadraj, D.M. Skinner
Gene **140** (1994) 1-5
Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G+C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases
- 110 G. Michael Blackburn, Michael J. Gait
IRL Press Cambridge 1990
Nucleic Acids in Chemistry and Biology
- 111 L.C. Sowers, G.V. Fazarkerly, H. Kim, C. Dalton, M.F. Goodman
Biochemistry **25** (1986) 3983-3988
Variation of non-exchangeable proton resonance chemical shifts as a probe of aberrant base pair formation in DNA
- 112 K.R. Tindall, T.A. Kunkel
Biochemistry **27** (1988) 6008-6013
Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase
- 113 M. Huang, N. Arnheim, M.F. Goodman
Nucleic Acids Res. **20** (1992) 4567-4573
Extension of base mispairs by Taq DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR
- 114 L.V. Mendelman, M.S. Boosalis, J. Petruska, M.F. Goodman
J. Biol. Chem. **264** (1989) 14415-14423
Nearest neighbour influences on DNA polymerase insertion fidelity

- 115 H.-D. Gräf
Pharmazie i. u. Zeit **2** (1977) 43-48
Immobilisierte Enzyme
- 116 H.-P. Kleber, D. Schlee, W. Schöpp
Gustav Fischer Verlag, Jena, 5. Aufl. (1997) 242-250
Biochemisches Praktikum: Methoden für Studium, Praxis, Forschung
- 117 M. Kashlev, E. Martin, A. Polyakov, K. Severino, V. Nikiforov, A. Goldfarb
Gene **130** (1993) 9-14
Histidine-tagged RNA polymerase: dissection of the transcriptional cycle using immobilized enzyme
- 118 M. Kashlev, E. Nudler, K. Severinov, S. Borukhov, Natalia Komissarova, A. Goldfarb
Methods Enzymol. **274** (1996) 326-334
Histidine-tagged RNA polymerase of *Escherichia coli* and transcription in solid phase
- 119 P.R. Cook, F. Gove
Nucleic Acids Res. **20** (1992) 3591-3598
Transcription by an immobilized RNA polymerase from bacteriophage T7 and the topology of transcription
- 120 F.J. Iborra, An Pombo, J. McManus, D.A. Jackson, P.R. Cook,
Exp. Cell Res. **229** (1996) 167-173
The topology of transcription by immobilized polymerases
- 121 H.H. Weetall
Chemiker Zeitung **11** (1973) 611-619
Trägergebundene Enzyme und ihre Anwendung in der Nahrungsmittel- und Getränkeindustrie
- 122 E. Katchalski-Katzir
Trends. Biotechnol. **11** (1993) 471-478
Immobilized enzymes – learning from past successes and failures
- 123 M.A. Mazid
Bio/Technology **11** (1993) 690-695
- 124 W.H. Scouten, J.H. Luong, R.S. Brown
Trends Biotechnol. **13** (1995) 178-185
- 125 R.F. Taylor, Ed.
Macel Dekker, New York, 1991
Protein Immobilization: Fundamentals and Applications
- 126 P. Wittlich
BioTec **2** (1999) 48-49
Neue Verfahren für den Einschluß von Biokatalysatoren
- 127 J. Ronnenberg, B. Preitz, G. Wöstemeier, S. Diekmann
J. Chromatography **656** (1994) 169-177
Immobilized residue-specific endoproteinases for protein sequencing

- 128 R. Epton, B.L. Hibbert, T.H. Thomas
Methods Enzymol. **44** (1976) 84-107
Enzymes covalently bound to polyacrylic and polymethacrylic copolymers
- 129 J. Turková
Methods Enzymol. **44** (1976) 66-83
Immobilization of enzymes on hydroxyalkyl methacrylate gels
- 130 S.A. Barker, S.H. Doss, C.J. Gray, J.F. Kennedy, M. Stacey, T.H. Yeo
Carbohydrate Res. **20** (1971) 1-7
 β -D-Glucosidase chemically bound to microcrystalline cellulose
- 131 H.-G. Hong, P.W. Bohn, S.G. Sligar
Anal. Chem. **65** (1993) 1635-1638
Optical determination of surface density in oriented metalloprotein nanostructures
- 132 D. Janasek, U. Spohn
Bioforum **3** (1998) 108-109
Poröses Glas als Enzymträger
- 133 C. Ljungquist, B. Jansson, T. Moks, M. Uhlén
Eur. J. Biochem. **186** (1989) 557-561
Thiol-directed immobilization of recombinant IgG-binding receptors
- 134 W. Huang, Jianquan Wang, D. Bhattacharyya, L.G. Bachas
Anal. Chem. **69** (1997) 4601-4607
Improving activity of immobilized subtilisin by site-specific attachment to surfaces
- 135 I. Willner, E. Katz, A. Riklin, R. Kasher
J. Am. Chem.Soc. **114** (1992) 10965-10966
Mediated electron transfer in glutathione reductase organized in self-assembled monolayers on gold electrodes
- 136 U. Haker
Dissertation 2000, Universität Hamburg
Modifizierung von Silizium-Oberflächen zur Immobilisierung von Biomolekülen
- 137 P. Edman
Acta Chem. Scand. **4** (1950) 283
Method for determination of the amino acid sequence in peptides
- 138 R.A. Laursen (H.H. Weetall, Ed.)
Dekker, New York 1975, 567
Immobilized Enzymes, Antigens, Antibodies and Peptides
- 139 R.A. Laursen, A.G. Bonner, M.J. Horn (R.N. Perham, Ed.)
Academic Press, New York, 1975, 73
Instrumentation in Aminoacid Sequence Analysis

- 140 W. Machleidt, E. Wachter
Methods Enzymol. **47** (1977) 263-277
New supports in solid-phase sequencing
- 141 A. Preveiro
Methods Enzymol. **47** (1977) 289-299
Alternative reagents in sequential degradation on solid-phase supports
- 142 D.A. Powers
Methods Enzymol. **47** (1977) 299,320
Solid-phase sequencing in spinning-cup sequenators
- 143 US Patent 5,011,861
- 144 R.H. Aeberhold, D.B. Teplow, L.E. Hood, S.B.H. Kent
J. Biol. Chem. **261** (1986) 4229-4238
Electroblotting onto activated glass
- 145 E. Wachter, W. Machleidt, H. Hofner, J. Otto
FEBS Letters **35** (1973) 97-1012
Aminopropyl glass and its p-phenylene diisothiocyanate derivative, a new support in solid-phase Edman degradation of peptides and proteins
- 146 J. Bridgen
FEBS Letters **50** (1975) 156-162
Solid phase sequencing: a new support for the high sensitivity degradation of peptides and proteins
- 147 S.K. Vishwanath, C.R. Watson, W. Huang, L.G. Bachas, D. Bhattacharyya
J. Chem. Tech. Biotechnol. **68** (1997) 294-302
Kinetic studies of site-specifically and randomly immobilized alkaline phosphatase on functionalized membranes
- 148 Yu.V. Smirnov, A.F. Fradkov, O.G. Chakmakheva, V.A. Efimov
Russian J. of Bioorg. Chem. **21** (1995) 341-342
Synthesis in *E. coli* and a rapid method of isolating high-activity recombinant His6-DNA-Pol I from *Thermus aquaticus*
- 149 H. Döbeli, E. Hochuli
Neue Metallchelatharze, Patentschrift Nr. 87109892.7, 1992
- 150 G. Baun, S.T. Cole
Nucleic Acids Res. **10** (1982) 2367-2374
The nucleotide sequence coding for major outer membrane protein ompA of *Shigella dysenteriae*
- 151 T. Ikemura
J. Mol. Biol. **146** (1981) 1-21
Correlation between the abundance of Escherichia coli transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes

- 152 T. Ikemura
J. Mol. Biol. **151** (1981) 389-409
Correlation between the abundance of Escherichia coli transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the Escherichia coli translational system
- 153 G. Xia, L. Chen, T. Sera, M. Fa, P.G. Schultz, F.E. Romesberg
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99** (2002) 6537-6602
Directed evolution of novel polymerase activities: mutation of a DNA polymerase into an efficient RNA polymerase
- 154 V. Collazo
Dissertation 2001, Universität Hamburg
Reverse Sanger Sequenzierung mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie
- 155 F. Eckstein, J.B. Thomson
Methods Enzymol. **262** (1995) 189-202
Phosphate analogs for study of DNA polymerases
- 156 J.M. Prober, G.L. Trainor, R.H. Dam, F.W. Hobbs, C.W. Robertson, R.H. Zagursky, A.H. Cocuzza, M.A. Jensen, K. Baumeister
Science **321** (1987) 674-525
A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain terminating dideoxynucleotides
- 157 J.W. Brandis
Nucleic Acids Res. **27** (1999) 1912-1918
Dye structure affects Taq DNA polymerase terminator selectivity
- 158 W.M. Barnes
Gene **112** (1992) 29-35
The fidelity of Taq polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion
- 159 M.J. Guo, S. Hildebrand, C.J. Leumann, L.W. McLaughlin, M.J. Waring
Nucleic Acids Res. **26** (1998) 1863-1869
Inhibition of DNA polymerase reactions by pyrimidine nucleotide analogs lacking the 2-ketogroup
- 160 R.L. Letsinger, J.S. Wilkes, L.B. Dumas
Biochemistry **15** (1976) 2810-2816
Incorporation of 5'-Amino-5'-deoxythymidine-5'-phosphate in polynucleotides by use of DNA polymerase I and a Φ X174 DNA template
- 161 G.A. Freeman, J.L. Rideout, W.H. Miller, J.E. Reardon
J. Med. Chem. **35** (1992) 3192-3196
3'-Azido-3',5'-dideoxythymidine-5'-methyl-phosphonic acid diphosphate: synthesis and HIV-1 reverse transcriptase inhibition
- 162 K.H. Scheit, A.J. Stütz
Carbohydrate Nucleoside Nucleotide **1** (1974) 485-490

- 163 D.H. Rammner, L. Yengoyan, A.V. Paul, P.C. Bax
Biochemistry **6** (1967) 1828-1837
Nucleoside phosphonic acids. II. The synthesis of 5'-deoxythymidine-5'-phosphonic acid and its pyrophosphate derivatives
- 164 E.A. Shirokova, A.V. Shipitsyn, E.V. Kuznetsova, L.S. Viktorova, A.A. Kraevskii
Russ. J. Biorg. Chem. **19** (1993) 736-741
5'-S-Nucleoside triphosphates. Synthesis and substrate properties in tests with DNA polymerases
- 165 M.S. Boosalis, J. Petruska, M.F. Goodman
J. Biol. Chem. **262** (1987) 14689-14696
DNA polymerase insertion fidelity. Gel assay for site-specific kinetics
- 166 F.W. Perrino, L.A. Loeb
J. Biol. Chem. **264** (1989) 2898-2905
Differential extension of 3'-mispairs in a major contribution to the high fidelity of calf thymus DNA polymerase α
- 167 S. Moran, R.X.-F. Ren, E.T. Kool
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94** (1997) 10506-10511
A thymidine triphosphate shape analog lacking Watson-Crick pairing ability is replaced with high sequence selectivity
- 168 J. Petruska, M.F. Goodman, M.S. Boosalis, L.C. Sowers, C. Cheong, I. Tinoco Jr.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85** (1988) 6252-6556
Comparison between DNA melting thermodynamics and DNA polymerase fidelity
- 169 J. Petruska, M.F. Goodman
J. Biol. Chem. **270** (1995) 746-750
Enthalpy-entropic compensation in DNA melting thermodynamics
- 170 J. Oberbäumer
Gene **49** (1986) 81-91
New pUC-derived expression vectors for rapid construction of cDNA libraries
- 171 W.F. Dower, J.F. Miller, C.W. Ragsdale
Nucleic Acids Res. **16** (1988) 6127-6145
High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation
- 172 H.C. Birnboim, J. Doly
Nucleic Acids Res. **7** (1979) 1513-1523
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA
- 173 D. Ish-Horowicz, J.F. Burke
Nucleic Acids Res. **9** (1981) 2989-2998
Rapid and efficient cosmid cloning
- 174 J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis
Cold Spring Harbor Press 2. Aufl. 1989
Molecular Cloning

- 175 B. Vogelstein, D. Gillespie
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76** (1979) 615-619
Preparative and analytical purification of DNA from agarose
- 176 U.K. Laemmli
Nature **227** (1970) 680-685
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. H. Köster danke ich für die freundliche Überlassung des interessanten Themas, seine motivierende Unterstützung und sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises und der Firma SEQUENOM GmbH sei für die freundschaftliche Atmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft gedankt. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Andreas Ruppert für seine fortwährende Unterstützung während dieser Arbeit, die auch über einer Distanz von ca. 800 km funktioniert. Außerdem bedanke ich mich bei Frau Dr. Ute Haker für die Unterweisung im Umgang mit Siliziumchips sowie Frau Dr. Verena Collazo und Frau Dr. Silke Atrott für die Überlassung ihrer modifizierten Nukleotide. Ein ganz großes Dankeschön geht außerdem an Frau Beata Szalay, Frau Julia Clemens, Frau Gabi Sperling und Frau Heike Lücken, die jederzeit hilfsbereit waren, während meiner Schwangerschaft klaglos alle „gefährlichen“ Arbeiten übernahmen und durch ihre fröhliche Stimmung - ganz besonders in der Mittagspause – das Durchhalten im Labor ermöglichten.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für ihre großartige Unterstützung während des Studiums und der Promotion und natürlich meinem Mann und meiner Tochter, die mir jeden Tag zeigen, was im Leben wirklich wichtig ist.