

Gerichte evolutie van DNA-polymerase TerminatorTM voor de incorporatie van artificiële nucleotiden met aspartaat als uittredende groep

Eline BERGHMANS

Promotor: Prof. J. Robben
Laboratorium voor Moleculaire en Synthetische
Biologie, Afdeling Biochemie, Structurele en
Moleculaire Biologie

Begeleider: Yves Peeters

Proefschrift ingediend tot het
behalen van de graad van
Master of Science in
Biochemistry and Biotechnology

Academiejaar 2015-2016

© Copyright by KU Leuven

Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van zowel de promotor(en) als de auteur(s) is overnemen, kopiëren, gebruiken of realiseren van deze uitgave of gedeelten ervan verboden. Voor aanvragen tot of informatie i.v.m. het overnemen en/of gebruik en/of realisatie van gedeelten uit deze publicatie, wendt u tot de KU Leuven, Faculteit Wetenschappen, Geel Huis, Kasteelpark Arenberg 11 bus 2100, 3001 Leuven (Heverlee), Telefoon +32 16 32 14 01.

Voorafgaande schriftelijke toestemming van de promotor(en) is eveneens vereist voor het aanwenden van de in dit afstudeerwerk beschreven (originele) methoden, producten, schakelingen en programma's voor industrieel of commercieel nut en voor de inzending van deze publicatie ter deelname aan wetenschappelijke prijzen of wedstrijden.

VOORWOORD

Eindelijk, het sluitstuk van mijn opleiding, na jaren hard werken. Zonder een aantal mensen was dit resultaat niet haalbaar geweest. Vandaar wil ik graag een eerste, welgemeend dankwoord richten aan mijn promotor Professor Johan Robben, voor de kans die ik kreeg om interessant onderzoek te voeren in zijn labo en bij wie ik, ondanks zijn drukke agenda, terecht kon voor het bespreken van resultaten, voor eventuele problemen en voor het nalezen van deze masterproef. Verder wil ik ook graag mijn dagdagelijkse begeleider Yves bedanken. Van hem kreeg ik telkens een duidelijke uitleg, goede hulp in het experimenteel werk, en kon ik altijd bij hem terecht met al mijn vragen en problemen. Bedankt, vooral voor alles wat ik dit jaar heb bijgeleerd! Ook de andere wetenschappers van deze onderzoeksgroep, Iris, Boris, Kasia, Oscar en Vincent, wil ik graag bedanken voor de toffe samenwerking, de hulp en de aangename werksfeer.

Buiten de eigen onderzoeksgroep wil ik ook graag een woord van dank richten aan Professor Piet Herdewijn voor de mogelijkheid de incorporatietest uit te voeren in zijn labo (Rega Instituut voor Medicinale Chemie, KU Leuven, Minderbroedersstraat 10 te Leuven).

Graag wil ik ook mijn ouders bedanken, zonder wie ik nooit aan deze opleiding ben kunnen starten en tijdens de weekends voor een warme thuis zorgden. Hun enorme steun en vertrouwen in mij heeft deze vijf jaar vlot laten verlopen. Ook de rest van de familie heeft dankzij hun steun, vertrouwen en leuke ontspanningen gezorgd voor een aangename studententijd. Ook aan mijn vrienden en studiegenoten, die zorgden voor de nodige ontspanning en de blijvende motivatie, een dankjewel. Het laatste, maar zeker niet onbelangrijk, dankwoord gaat uit naar mijn grootste steun en toeverlaat, mijn vriend Stef, wie elke dag weer voor me klaar stond.

Kortom, bedankt allemaal voor de zeer fijne en vooral leerrijke ervaring!

VOORWOORD	I
INHOUDSOPGAVE	II
AFKORTINGEN EN SYMBOLEN	IV
SAMENVATTING	VII
SUMMARY	VIII
I. INTRODUCTIE	1
Desoxyribonucleïnezuur (DNA)	2
DNA-polymerasen	3
Structuur	4
Reactiemechanisme	5
Michaelis-Menten kinetica	7
Xenobiologie	8
Artificiële nucleotiden	11
Modificaties in suikergedeelte	11
Modificaties in nucleobase	12
Modificaties in fosfaatgedeelte	13
Gerichte evolutie van DNA-polymerasen	17
Selectiemethoden voor gerichte evolutie van DNA-polymerasen	18
Compartmentalized Self-Tagging	19
DNA-polymerase Terminator™	22
II. DOELSTELLINGEN	24
III. MATERIALEN EN METHODEN	25
Bacteriestam <i>E. coli</i>	25
Vector pASK-Therm en mutantenbibliotheek	25
Oligonucleotiden	26
Activiteitstest	27
Compartmentalized Self-Tagging (CST)	28
Amplificatie geselecteerde varianten	29
Gelextractie	30
Aanmaak vector- <i>backbone</i>	30
Digestie	31
Ligatie	31
Transformatie	32
Kolonie-PCR	32
High throughput polymerase-activiteitstest (PAA)	33

Opzuivering van Terminator™-varianten	34
SDS-PAGE	35
Incorporatietest	35
IV. RESULTATEN EN CONCLUSIES	37
Optimalisatie CST-procedure	37
Invloed celbereiding	37
Amplificatie van geselecteerde varianten	38
Invloed wasstappen	40
Selectie voor incorporatie van Asp-dAMP en Asp-dTMP	43
PAA-analyse met lysaat	43
Karakterisatie van geselecteerde mutanten	47
Specifieke incorporatietest	50
Specifieke incorporatietest met mangaanionen	52
Model voor de geselecteerde varianten	54
V. DISCUSSIE EN TOEKOMSTPERSPECTIEVEN	56
Optimalisatie CST-procedure	56
Geselecteerde varianten	56
Opzuivering	56
Wild-type DNA-polymerase Terminator™ en varianten	57
Toekomstperspectieven	59
REFERENTIES	61
ADDENDUM	A.1
<i>BIJLAGE A</i> Risicoanalyse	A.1
<i>BIJLAGE B</i> Selectie voor incorporatie van Asp-dAMP en Asp-dTMP met vingerdomeinmutanten van DNA-polymerase Terminator™	B.1
PAA-analyse met 88 lysaten na drie CST-rondes	B.1
PAA-analyse met 88 lysaten na twee CST-rondes	B.2

AFKORTINGEN EN SYMBOLEN

AHTC: anhydrotetracycline

APS: ammonium persulfaat

Asp-dAMP (*A): aspartaat desoxyadenosinemonofosfaat

Asp-dCMP: aspartaat desoxycytidinemonofosfaat

Asp-dGMP: aspartaat desoxyguanosinemonofosfaat

Asp-dTMP (*T): aspartaat desoxythymidinemonofosfaat

bp: basenparen

BSA: *Bovine Serum Albumin* (runderalbumine)

CSR: *Compartmentalized Self-Replication*

CST: *Compartmentalized Self-Tagging*

dATP: desoxyadenosinetrifosfaat

dCTP: desoxycytidinetrifosfaat

dGTP: desoxyguanosinetrifosfaat

DigN: digoxigenine

DNA: desoxyribonucleïnezuur (deoxy ribo nucleic acid)

dNTP: desoxynucleotide

dsDNA: dubbelstrengig DNA

DTT: dithiothreitol

dTTP: desoxythymidinetrifosfaat

E. coli: *Escherichia coli*

EDTA: ethyleendiaminetetra-azijnzuur

Exo⁻-variant: uitgeschakeld N-terminaal exonucleasedomein

F: bibliotheek F, vingerdomeinmutanten van DNA-polymerase TerminatorTM

HCl: waterstofchloride

HF: *High Fidelity PCR Enzyme Mix*

HIV-1 RT: humaan immuundeficiëntievirus reverse transcriptase type 1

HNA: hexosenucleïnezuur

HRP: *horseradish* (mierikswortel) peroxidase

kb: kilobase

krpm: kilo *revolutions per minute*

LB: *Lysogeny Broth*

LNA: *locked* nucleïnezuur

MgSO₄: magnesiumsulfaat

MnCl₂: mangaanchloride

mRNA: *messenger* RNA (boodschapper RNA)

Na₂HPO₄: dinatrium(mono)waterstoffosfaat

NaH₂PO₄: natriumdiwaterstoffosfaat

NaOH: natriumhydroxide

nt: nucleotide

OD: optische densiteit

ODu: optische densiteit units

OH: hydroxyl(groep)

ON: overnacht

PAA: polymerase-activiteitstest (*polymerase activity assay*)

PCR: polymerase-kettingreactie (*polymerase chain reaction*)

PNK: polynucleotidekinase

RNA: ribonucleïnezuur (*ribo nucleic acid*)

rpm: *revolutions per minute*

SDS: natriumdodecylsulfaat (*sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE: natriumdodecylsulfaat polyacrylamidegelelektroforese

ssDNA: enkelstrengig DNA

TAE Buffer: Tris-acetaat-EDTA buffer

TEG: triethyleenglycol

TEMED: tetramethylethyleendiamine

Therm⁺: actieve variant van DNA-polymerase TerminatorTM (wild-type)

Therm⁻: inactieve variant van DNA-polymerase TerminatorTM

TMB: 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine

TNA: threosenucleïnezuur

U: units (eenheden)

v/v: volumeconcentratie

w/o: water-in-olie (emulsie)

WT: wild-type

XNA: xenonucleïnezuur (*xeno nucleic acid*)

XyloNA: xylosenucleïnezuur (*xylose nucleic acid*)

1/100: controle-bibliotheek van 1/100 verhouding van Therm⁺ in Therm⁻

1kb⁺: GeneRulerTM 1 kb plus (Thermo Scientific)

+C: positieve controle

-C: negatieve controle

Artificiële nucleotiden en nucleïnezuren genieten een grote belangstelling in de geneeskunde als anti-virale en/of anti-kankercomponenten, maar ook in de biotechnologie omwille van een hogere resistentie tegen degradatie. Hier is gekozen voor nucleotiden waarbij de uittredende groep pyrofosfaat vervangen is door het aminozuur aspartaat, om een mogelijke interferentie van trifosfaten van gemodificeerde nucleotiden met biologische processen te verhinderen. Het beginpunt van dit onderzoek is een aspartaat-gekoppeld nucleotide dat door polymerase in natuurlijk DNA wordt omgezet, om in een volgende, latere stap aspartaat te koppelen aan een suiker-gemodificeerd nucleotide voor de bouw van artificiële nucleïnezuren.

Om te voldoen aan orthogonaliteit, is er een aangepast DNA-polymerase (XNA-polymerase) nodig, dat niet interfereert met de synthese van DNA en/of RNA in de gastheercel en enkel de artificiële nucleotiden herkent en kan incorporeren. Uit een groot repertoire aan mutanten van een natuurlijk DNA-polymerase, kunnen via gerichte evolutie mogelijks XNA-polymerasen geselecteerd worden. De nadruk ligt in dit onderzoek op DNA-polymerase Terminator™ waarvan reeds bekend is dat het een brede waaier aan artificiële nucleotiden kan incorporeren. Een repertoire aan varianten van Terminator™ is aangemaakt met mutaties in een deel van het vingerdomein, belangrijk voor een goede plaatsing van het intredend nucleotide tegenover de DNA-matrijs in het polymerase. Gerichte evolutie van het polymerase verloopt met *Compartmentalized Self-Tagging* (CST) voor de selectie op verbeterde incorporatie van aspartaat-nucleotiden.

Met behulp van deze techniek zijn er uiteindelijk drie varianten van het DNA-polymerase Terminator™ geselecteerd, die een gelijkaardige verhoogde activiteit vertoonden voor de incorporatie van desoxyribonucleotiden gekoppeld aan aspartaat als uittredende groep.

Artificial nucleotides and nucleic acids are of great interest in medicine, where they can act as possible anti-viral or anti-cancer compounds, and also in biotechnology, where they are known as substrates protected against degradation. In this project, nucleotides with the amino acid aspartate as leaving group are studied, to avoid possible interactions of the triphosphate moiety of modified nucleotides with biological processes. This project is limited to the study of natural nucleotides with aspartate as leaving group, which can later on be linked to a sugar-modified nucleotide.

To maintain orthogonality, an XNA polymerase is needed that is able to read and write the unnatural nucleic acids, and may not recognize nor incorporate the natural nucleotides in the host cell. Such XNA polymerases can be generated by directed evolution of a library consisting of mutants of a natural DNA polymerase with one or more substitution(s). DNA polymerase Terminator™ is of great interest in this study, which is known to incorporate a broad range of modified nucleotides. A library of mutants of DNA polymerase Terminator™ is generated in a specific part of the fingers domain, necessary for the positioning of the incoming nucleotide in the polymerase against the DNA template for an efficient incorporation reaction. Directed evolution of the polymerase for the incorporation of nucleotides with aspartate as leaving group is performed with Compartmentalized Self-Tagging (CST).

Three mutants of DNA polymerase Terminator™ were selected with CST, all with a comparable improved activity for the incorporation of deoxyribonucleotides with pyrophosphate substituted with aspartate.

I. INTRODUCTIE

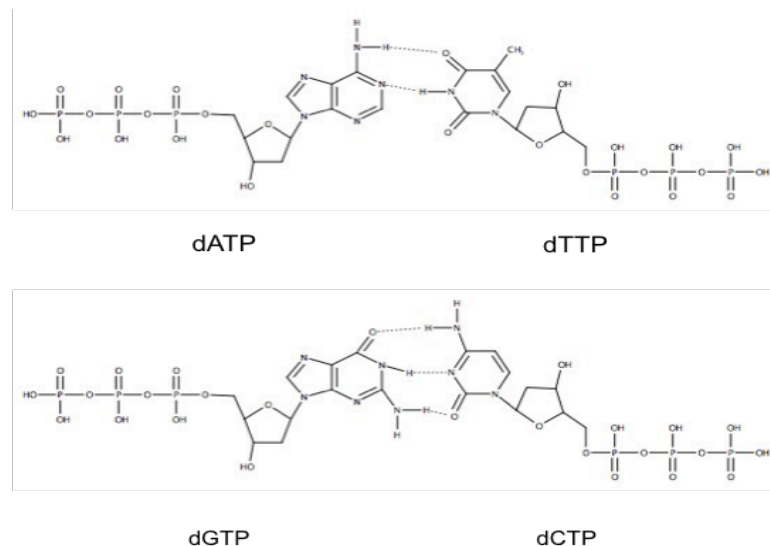
DNA-polymerasen zijn belangrijke eiwitten die de replicatie van DNA katalyseren in een complex reactiemechanisme. Hoewel de meeste artificiële nucleotiden slechte substraten zijn voor het polymerase, is het niet onmogelijk deze te gebruiken voor de aanmaak en replicatie van artificiële nucleïnezuren, XNA. Binnen de onderzoeksgroep ligt ondermeer de interesse bij nucleotiden met een gemodificeerde uittredende groep, waarbij het pyrofosfaatgedeelte vervangen is door aspartaat, waarbij de focus gelegd wordt op de nucleotiden aspartaat-desoxyadenosinemonofosfaat (Asp-dAMP) en aspartaat-desoxythymidinemonofosfaat (Asp-dTMP).

Synthetische biologie laat toe DNA-polymerasen gericht te evolueren om artificiële nucleotiden te herkennen en in te bouwen. Voor de incorporatie van beide artificiële nucleotiden Asp-dAMP en Asp-dTMP, is er binnen de onderzoeksgroep gekozen voor het DNA-polymerase Terminator™. DNA-polymerase Terminator™ is gekend een brede waaier aan gemodificeerde substraten te incorporeren. Preliminair onderzoek hebben aangetoond dat dit polymerase twee tot drie Asp-dAMP-nucleotiden kan incorporeren. Voor een meer efficiënte en langere synthese met Terminator™, worden één of meer varianten van dit polymerase gezocht met behulp van gerichte evolutie. Variaties binnen het polymerase zijn aangebracht, daar waar de uittredende groep interageert met het polymerase voor de incorporatie. De selectie van mogelijks actieve varianten gebeurt in dit project met *Compartmentalized Self-Tagging*.

De interesse voor de synthese van XNA is groot, aangezien artificiële nucleotiden van belang zijn in geneeskunde als anti-virale en/of anti-kanker componenten, doordat XNA heel gericht zou kunnen binden aan het DNA van virussen of van kankercellen. Ook zijn ze van belang in de biotechnologie voor een betere bescherming tegen degradatie.

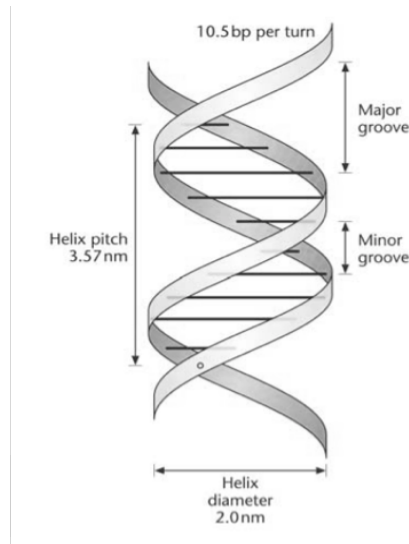
Desoxyribonucleïnezuur (DNA)

Genetische informatie voor overerving zit vervat in één biochemisch macromolecule, namelijk desoxyribonucleïnezuur, afgekort als DNA. Een DNA-molecule wordt opgebouwd, vertrekkende uit vier verschillende desoxynucleoside-trifosfaten, verder afgekort als nucleotiden. De mogelijke nucleotiden zijn desoxyadenosinetrifosfaat (dATP), desoxyguanosinetrifosfaat (dGTP), desoxythymidinetrifosfaat (dTTP) en desoxycytidinetrifosfaat (dCTP). Elk nucleotide bestaat uit een fosfaatgroep, een desoxyribosesuiker en een base. De volgorde van nucleotiden bepaalt voor elk organisme een unieke, erfelijke informatie. Het model van Watson en Crick toont aan dat DNA de vorm aanneemt van een dubbelstrengige helix met twee om elkaar gewonden DNA-strengen, waarbij elke streng alternerend bestaat uit een fosfaatgroep en een desoxyribosemolecule. Beide strengen zijn verknoopt met elkaar door specifieke basenparing via waterstofbindingen tussen telkens een purine- en een pyrimidinebase: adenine (purine) met thymine (pyrimidine) en guanine (purine) met cytosine (pyrimidine), zoals aangegeven in **figuur I.1**. Deze basenparing bevindt zich aan de binnenkant van de helix. Dergelijke helix is de zogenaamde B-helix, de conformatie die dominant voorkomt in de meeste cellen. B-DNA is een rechtsdraaiende helix en bevat 10,5 basenparen in één winding (180° , complete rotatie rond zijn as) (Watson en Crick, 1953).



Figuur I.1: Basenparing tussen nucleotiden via waterstofbindingen. De basen adenine en thymine vormen twee waterstofbindingen met elkaar, terwijl cytosine en guanine er drie vormen. De waterstofbindingen zijn weergegeven in stippellijn.

In de Watson-Crick B-DNA-structuur zijn twee groeves terug te vinden in de helix, de grote en de kleine groeve, zie **figuur 1.2**. Deze groeves kunnen verschillen van grootte in andere DNA-structuren. De grote groeve is een proteïnebindingsplaats, bijvoorbeeld voor transcriptiefactoren, waarin proteïnen binden aan een specifieke DNA-sequentie. Anderzijds zijn er ook proteïnen die aspecifiek binden, bijvoorbeeld chromatineproteïnen, en deze binden in de kleine groeve. In deze laatste groeve binden ook watermoleculen en ionen voor stabilisatie van de DNA-helix (Ussery, 2002).



Figuur 1.2: Helicale B-DNA structuur. Twee om elkaar gewonden DNA-strengen die een helix vormen en verbonden zijn door basenparing in de binnenkant van de helix. De grote (*major*) groeve en de kleine (*minor*) groeve staan weergegeven, net zoals de helicale *pitch*, de lengte van een volledige helixwinding. Bron: Ussery, 2002.

DNA-POLYMERASEN

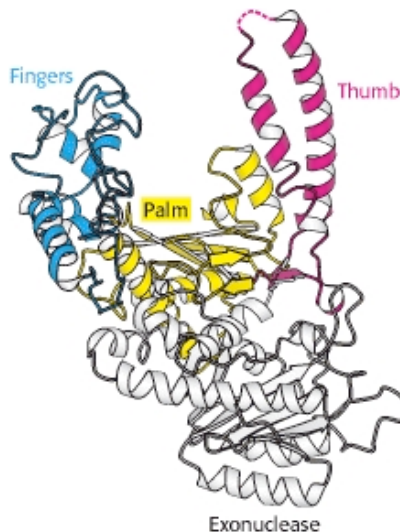
DNA-polymerasen zijn eiwitten die de enzymatische synthese van DNA katalyseren, met de vier nucleotiden als bouwstenen. DNA-polymerasen zijn één van de meest belangrijke reagentia in levende organismen vanwege hun strikte specificiteit en hun verantwoordelijkheid voor het doorgeven van informatie dat vervat zit in DNA. DNA-polymerasen herkennen door hun hoge substraatspecificiteit zelfs de bouwstenen voor RNA-synthese niet, die één enkele hydroxylgroep extra bevatten aan de ribosesuiker. Daarom zijn de functies van DNA-polymerasen, beperkt tot DNA-replicatie en tal van herstelmechanismen na DNA-schade, bijvoorbeeld door omgevingsfactoren. DNA-replicatie is het verdubbelingsproces tijdens de S-fase van de celcyclus, vooraleer de cel mitose ondergaat. DNA-herstellende mechanismen zijn belangrijk om *mismatches* en fouten tijdens DNA-replicatie te herstellen, maar ook om enkel- en dubbelstrengige fouten en verstoringen in DNA-helices correct te vervangen (Hübscher *et al.* 2010).

De synthese van DNA is niet mogelijk met enkel een DNA-polymerase en nucleotiden, maar ook extra factoren zijn noodzakelijk voor een efficiënte

incorporatie. De meeste DNA-polymerasen volgen een sequentie-afhankelijk reactiemechanisme waarbij een enkelstrengige DNA-matrijs nodig is. Bij replicatie wordt de complementaire sequentie van de DNA-matrijs aangemaakt in de dochterstreng, zodat ook hier de complementaire streng aangemaakt kan worden. Zo is de oorspronkelijke DNA-dubbelstreng gerepliceerd en kan genetische informatie doorgegeven worden. Verder is er nog een primer nodig, een oligonucleotide dat hybridiseert aan de DNA-matrijs en een vrije hydroxylgroep (OH-groep) heeft aan zijn 3'-uiteinde voor incorporatie. Vervolgens zijn twee essentiële divalente metaalionen noodzakelijk, meestal magnesium, als cofactor. Tot slot kan de betrouwbaarheid van de synthese van DNA verhoogd worden met DNA-polymerase hulpeiwitten, zoals DNA-helicasen, DNA-topoisomerasen en DNA ligasen. Dit alles vormt een complexe machinerie voor een correcte en betrouwbare DNA-synthese (Hübscher *et al.* 2010).

STRUCTUUR

De globale structuur van DNA-polymerasen is geconserveerd tussen de verschillende types van DNA-polymerasen (Joyce en Steitz, 1994). De structuur is vergelijkbaar met een menselijke rechterhand (**figuur 1.3**), wat blijkt uit studies naar de kristalstructuur (Steitz, 1999). Het polymerasedomein bestaat uit drie delen, namelijk het vingerdomein, de palm en het duimgedeelte. Het vingerdomein interageert met zowel de intredende nucleotiden als met de enkelstrengige DNA-matrijs. Deze interactie zorgt voor een goede plaatsing van het nucleotide tegenover de DNA-matrijs voor een efficiënte incorporatie tijdens de DNA-synthese. Het duimgedeelte van het polymerase is verantwoordelijk voor de processiviteit van de DNA-synthese, aangezien dit deel interageert met dubbelstrengig DNA (dsDNA). Dit betreft de primer gehybridiseerd aan de matrijs én het nieuwe gesynthetiseerd DNA, die beiden correct gepositioneerd worden in het polymerase voor een efficiënte DNA-synthese. Het palmgedeelte is het actieve gedeelte, waar de incorporatiereactie plaatsvindt van het nucleotide in de groeiende DNA-keten, na bepaalde conformationele veranderingen (zie REACTIEMECHANISME). Dit gedeelte bevat katalytische residu's die interageren met zowel de magnesiumionen als met het intredend nucleotide. Het palmgedeelte is het deel dat het meest geconserveerd is tussen verschillende polymerasen (Hübscher *et al.* 2010).



Figuur 1.3: Structuur van een DNA-polymerase. Het eerst bepaalde DNA-polymerase, Klenow fragment genaamd, is ontdekt in *E. coli*. Zoals alle andere DNA-polymerasen heeft dit de structuur gelijkaardig aan een menselijke rechterhand, waarin het vingerdomein is aangeduid in blauw, de duim in paars en de palm in geel. In grijs is het exonucleasedomein weergegeven, dat aanwezig is in verscheidene polymerasen. Bron: Berg *et al.* 2002

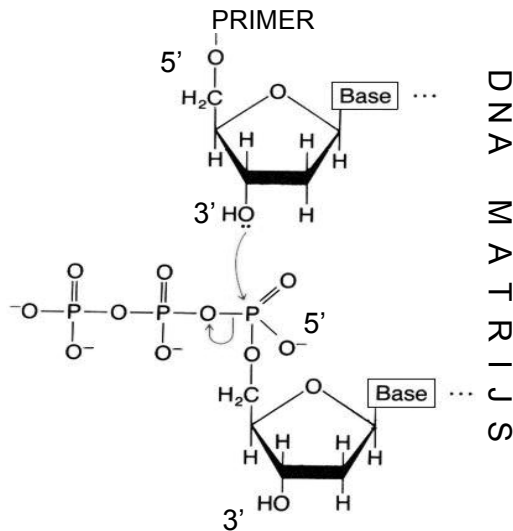
De meeste DNA-polymerasen bestaan uit twee actieve domeinen, namelijk het polymerisatiedomein, zoals hierboven beschreven, en het exonucleasedomein (Shevelev en Hübscher, 2002). Er bestaat zowel een 5'→3'- als een 3'→5'-exonucleasedomein. De 5'→3'-exonuclease-activiteit verloopt stroomafwaarts, volgens de richting van transcriptie om zo de transcriptie te beëindigen, terwijl 3'→5' stroomopwaarts werkt om misincorporaties te verwijderen en te herstellen om een meer betrouwbare DNA-synthese te garanderen. Zowel het polymerisatiedomein als de exonucleasedomeinen zijn geconserveerd tussen verschillende polymerasen (Hübscher *et al.* 2010).

REACTIEMECHANISME

De matrijs-afhankelijke incorporatie van desoxynucleosidetrifosfaten gebeurt in een 5'→3'-richting, waarbij de vrije 3'-hydroxylgroep van de groeiende DNA-keten een verbinding vormt met de 5' α-fosfaatgroep van het intredend nucleotide. Deze chemische reactiestap is de fosforyltransferreactie (**figuur 1.4**), waarbij het desoxynucleosidemonofosfaat geïncorporeerd wordt en pyrofosfaat functioneert als uittredende groep (Yang en Herdewijn, 2011).

Als eerste bindt het primer-matrijscomplex aan het polymerase, waardoor een eerste conformationele verandering plaatsvindt die de nucleotidebindingsplaats vrijstelt voor het intredende nucleotide. De vorming van het ternair actief complex gebeurt als het intredend nucleotide interageert met het vingerdomein van het DNA-polymerase. Het vingerdomein bevat positief geladen residu's, vooral arginine en lysine, die via elektrostatische interacties interageren met de negatief geladen fosfaatgroepen van het intredend nucleotide. Deze interactie zorgt voor een tweede conformationele verandering waarbij het vingerdomein roteert naar het

palmgedeelte en het polymerase op deze manier 'sluit'. Zo wordt er een bindingsplaats gevormd waarin het inkomend nucleotide past van grootte en zodanig gepositioneerd kan worden dat de fosforyltransferreactie kan doorgaan. Dergelijke transitie maakt het enzym dus katalytisch competent (Hübscher *et al.* 2010).



Figuur I.4: De fosforyltransferreactie voor de incorporatie van het intredend nucleotide in de groeiende DNA-keten. De 3' vrije hydroxylgroep voert een nucleofiele aanval uit op het 5' α -fosforatoom van het intredend nucleotide, waarna een fosfo-esterbinding gevormd wordt. Zo is er incorporatie van het desoxynucleoside monofosfaat en een eliminatie van het pyrofosfaatgedeelte.

Het nucleotide zal eerst basenparen met zijn complementaire base in de matrijs. Vervolgens coördineren twee divalente metaalionen elk de transitietoestand van het actief ternair complex. Beide ionen vormen een interactie met zowel carboxylaatgroepen van geconserveerde aspartaat-residu's in het polymerase als met de negatief geladen fosfaatgroepen van het intredend nucleotide. Meestal betreft het twee magnesiumionen, maar mangaanionen zijn ook mogelijk, hoewel mangaanionen de kans op een foutieve incorporatie door het DNA-polymerase verhogen. De positionering met de twee metaalionen laat de nucleofiele aanval toe van de vrije 3'-hydroxylgroep van de primer op het 5' α -fosforatoom van het intredend nucleotide (zie **figuur I.4**), met als resultaat een fosfo-esterbinding tussen de 3' OH-groep en de 5' α -fosfaatgroep. Hierdoor is er een hydrolytische splitsing tussen de α - en de β -fosfaatgroepen. Dit is energetisch gunstig, aangezien pyrofosfaat een zwakke base is en zo ideale eigenschappen bezit om de rol van universele uittredende groep op zich te nemen tijdens de synthese van nucleïnezuren. Door de hydrolytische splitsing zal pyrofosfaat vrijgezet worden wanneer het vingerdomein het DNA-polymerase heropent. Pyrofosfatase zorgt voor hydrolyse van de pyrofosfaatgroep in twee fosfaatmoleculen, waardoor de macromoleculaire biosynthese irreversibel is (Adelfinskaya *et al.* 2007). Als laatste stap van het reactiemechanisme is er in het enzym een translocatie van primer-matrijscomplex met één basenpaar waardoor de 3'-OH van het laatst ingebouwde

nucleotide in positie wordt gebracht voor een nieuwe incorporatiecyclus (Hübscher *et al.* 2010).

Door het complex reactiemechanisme kunnen DNA-polymerasen ook fouten maken. DNA-polymerasen kunnen een fout nucleotide incorporeren, een *mismatch*. Om het aantal *mismatches* te reduceren, beschikken veel polymerasen over een 3'>5'-exonuclease-activiteit, tegengesteld aan de richting van de polymerisatie-activiteit. Tijdens de DNA-synthese is het exonucleasedomein in gesloten conformatie, waardoor dit domein niet kan binden aan de matrijs. Bij een *mismatch* zal het einde van de te verlengen primer en de matrijs zorgen voor een open conformatie van het exonucleasedomein (Shevelev en Hübscher, 1994). Er is een dynamisch evenwicht tussen polymerase- en exonucleasedomeinen en bij een *mismatch* zal het polymerase pauzeren, waarna het exonucleasedomein zal openen (King *et al.* 1997). Dit domein maakt dan excisie mogelijk van het nucleosidemonofosfaat aan het 3'-uiteinde van de groeiende DNA-keten. Hierna kan het polymerisatiedomein het correcte nucleotide incorporeren. Dit exonucleasedomein verhoogt dus de betrouwbaarheid van de DNA-synthese, maar kan anderzijds ook leiden tot een lage opbrengst van DNA-synthese als tot primerdegradatie. Er moet dus een correcte balans zijn tussen DNA-synthese en exonuclease-activiteit (Yang en Herdewijn, 2011).

Genetische en structurele analyses (Yang *et al.* 2011) toonden aan dat dergelijk reactiemechanisme van polymerisatie en structurele veranderingen van het DNA-polymerase geconserveerd is tussen verschillende families van polymerasen en de binding van het intredend nucleotide sterk afhankelijk is van elektrostatische interacties met het vingerdomein. Het is dus van belang dat een nucleotide negatieve ladingen draagt voor een efficiënte binding in het polymerase (Yang *et al.* 2011).

MICHAELIS-MENTEN KINETICA

Zoals eerder vermeld, herkennen het polymerase-primer-matrijscomplex en het intredend nucleotide elkaar door hun structurele complementariteit, aangezien het polymerase in de actieve plaats een conformatie aanneemt, geschikt voor de binding van het intredend nucleotide. Het substraat bindt aan het polymerase met relatief zwakke waterstofverbindingen, ionische bindingen, namelijk zoutbruggen, en Van Der Waals-interacties tussen complementaire atomen. Deze binding en verdere conformationele verandering tussen nucleotide en polymerase volgt de fundamentele Michaelis-Menten-enzymkinetiek. Deze theorie houdt in dat het

polymerase en het nucleotide reversibel associëren om een enzym-substraat-complex te vormen. Het product, in dit geval het nucleïnezuur na de incorporatie van het ingetreden nucleotide, wordt gevormd in een tweede reactiestap (Garrett en Grisham, 2009). Tot slot volgt de translocatie van het primer-matricscomplex met één basenpaar voor een nieuwe incorporatiecyclus (Hübscher *et al.* 2010).

XENO BIOLOGIE

Hoewel de meeste artificiële nucleotiden slechte substraten zijn voor het polymerase en dus moeilijk ingebouwd kunnen worden vanwege de hoge substraatspecificiteit van het polymerase, is het niet onmogelijk. Onderzoek met artificiële nucleotiden is zowel van belang om het mechanisme van polymerase-reacties te ontrafelen, als voor het ontdekken van enzyminhibitoren en om artificieel DNA enzymatisch te synthetiseren voor het identificeren van nieuwe biotechnologische productiesystemen (Yang en Herdewijn, 2011). Uit dit onderzoek is xenobiologie ontstaan, een onderdeel van synthetische biologie die biologische systemen beschrijft die niet in de natuur terug te vinden zijn (Schmidt, 2010).

Synthetische biologen stellen zich de vraag of het mogelijk is een orthogonaal chromosoom te ontwikkelen. Dergelijk chromosoom bestaat uit xenonucleïnezuuren (XNA) en is opgebouwd uit minstens twee verschillende nucleotide-analogen die verschillen van natuurlijke nucleotiden. De polymerisatie van het XNA gebeurt met een aangepast polymerase, dat niet interageert met de synthese van DNA en/of RNA in de gastheercel.

Orthogonaliteit is een belangrijke vereiste voor de modulatie van biologische systemen. Het moduleren van één component van het biologisch systeem mag geen neveneffect(en) hebben op de andere componenten van dat systeem. Gemodificeerde biochemische bouwstenen, aminozuren en/of proteïnen mogen dus niet rechtstreeks interfereren met andere belangrijke fysiologische processen in de cel. Het orthogonaal episoom moet bovendien informatie bevatten, gecodeerd in de genen, voor minstens één selecteerbare functie die onmisbaar is voor de groei van de gastheercel, zoals replicatie, recombinitie, transcriptie, translatie, metabolisme, reproductie, ... (Herdewijn en Marlière, 2009). Met deze vereisten van orthogonaliteit is de modulatie van biologische systemen biologisch 'veilig', aangezien er geen genetische uitwisseling mogelijk is tussen xenobiologische systemen en natuurlijke biologische systemen, en tussen xenobiologische systemen onderling (Schmidt, 2010).

Voor de aanmaak van XNA ligt de focus op alternatieve nucleotiden en XNA-polymerasen. Synthetische biologen hebben de chemische structuur van de natuurlijke nucleotiden aangepast, zodat deze niet meer herkenbaar zijn voor natuurlijke biologische organismen. Hoewel XNA verschillende structurele en chemische veranderingen bevat ten opzichte van DNA of RNA, kan XNA ook een informatiedrager zijn (Schmidt, 2010). Daarnaast heeft XNA, zoals RNA en DNA, de mogelijkheid om aptameren te vormen die een target binden met hoge affiniteit en specificiteit om bijvoorbeeld een molecule uit te schakelen door binding (Pinheiro *et al.* 2012). Dit toont aan dat specifieke XNA's naast erfelijkheid, ook de capaciteit hebben voor Darwiniaanse evolutie en het vouwen van XNA in bepaalde structuren. Twee belangrijke aspecten van het leven, erfelijkheid en evolutie, zijn niet beperkt tot DNA en RNA, want XNA blijkt ook een functie te hebben als dergelijke informatiebron (Pinheiro *et al.* 2012).

De structurele chemische veranderingen maken dit nieuwe systeem zogenaamd 'onzichtbaar' tegenover natuurlijke biologische systemen, aangezien natuurlijke polymerasen vanwege hun strikte specificiteit XNA niet kunnen herkennen. De uitdaging is nu om XNA-polymerasen te genereren, die zowel in staat zijn de artificiële nucleotiden te herkennen als te incorporeren. Dergelijke polymerasen lijken sterk op het wild-type polymerase, met net die specifieke modificatie(s) in het polymerase waardoor het onnatuurlijke nucleotiden kan herkennen en inbouwen om zo eventueel in een verder stadium nieuwe, onnatuurlijke proteïnen te ontwikkelen. Op deze manier is er de mogelijkheid om de genetische code te verbreden (Schmidt, 2010).

In theorie verloopt de aanmaak van een orthogonaal chromosoom als volgt. Als eerste is er de externe toevoer van een gesynthetiseerd XNA-genoom, XNA-precursoren en een XNA-afhankelijk XNA-polymerase aan een DNA-gastheercel. Als er XNA-genexpressie is en een stabiele overerving van het XNA-genoom naar een dochtercel, volgt de eliminatie van het DNA-genoom van de gastheer. Het XNA-genoom kan dan het metabolisme van de gastheer volledig overnemen met specifieke XNA-afhankelijke XNA-polymerasen voor de replicatie van XNA. Dergelijke XNA-polymerasen herkennen DNA niet om volledige orthogonaliteit te bekomen. Het resulterend chromosoom kan dan als matrijs dienen voor de transcriptie met een XNA-afhankelijk RNA-polymerase naar functioneel (gemodificeerd) RNA, namelijk messenger RNA (mRNA). Dan volgt de translatie van de genetische informatie in het mRNA naar onnatuurlijke aminozuren die onnatuurlijke proteïnen vormen, die een functie hebben in het metabolisme. De

translatie kan plaatsvinden met xenosomen, artificiële ribosomen, om zo orthogonaliteit te verhogen (Schmidt, 2010). Hiervoor zijn dan uiteindelijk ook XNA-bindingsproteïnen nodig, zoals XNA-helicasen en XNA-ligasen (Schmidt, 2010). Voor de start van de synthese van deze nieuwe systemen is de belangrijkste vereiste het ontwerpen van een DNA-afhankelijk XNA-polymerase, waar dit project om draait. Door de externe toevoer van XNA-precursoren en een DNA-afhankelijk XNA-polymerase in een DNA-gastheercel, is er de chemische synthese van XNA vanaf een DNA-matrijs. Het aangemaakt XNA en bijhorend polymerase kan mogelijks in een later stadium de bovenbeschreven stappen doorlopen om te beantwoorden aan orthogonaliteit.

Geen metabolische toegang tot XNA is in principe een voordeel, om een volledig veilig genetisch gemodificeerd systeem te verkrijgen. Zo wordt XNA chemisch 'vervreemd' van het metabolisme van bestaande cellen en natuurlijke ecosystemen, met als resultaat veiligere genetische gemodificeerde organismen. De synthese van XNA-precursoren is zodanig dat de opname in de cel mogelijk is via externe toevoer, maar dat de gastheercel de precursoren niet zelf kan synthetiseren. Om endogene synthese van artificiële nucleotiden te vermijden, moeten deze bouwstenen minstens twee synthesestappen verschillend zijn van de natuurlijke nucleotiden. Zo zullen natuurlijke nucleotiden niet geïnterpreteerd worden door het XNA-replicatiemechanisme en vice versa wat beantwoordt aan de orthogonaliteit. XNA kan op deze manier niet 'ontsnappen' uit het organisme en niet incorporeren in het DNA-genoom, wat de mogelijk risico-houdende recombinatie van een DNA-streng met het gastheergenoom vermijdt (Schmidt, 2010).

Xenobiologie kent mogelijke toepassingen in zowel geneeskunde, nanotechnologie als in biotechnologie. In geneeskunde is de toepassing vooral gericht op het ontwerp en de synthese van therapeutica, waarbij XNA gericht het DNA van virussen en kankercellen kan binden en zo hun werking kan uitschakelen. Ook zijn er toepassingen in moleculaire biologie, want XNA kan aptameren vormen, die met hoge affiniteit een target kunnen binden en uitschakelen. Artificiële nucleotiden kunnen mogelijks een inhibitor zijn voor het polymerase. Verder zijn er ook toepassingen van nucleotide-analogen voor het ontwerpen van nucleosideprobes en fluoroforen met een verhoogde resistentie tegen degradatie in biotechnologische applicaties (Pinheiro *et al.* 2012).

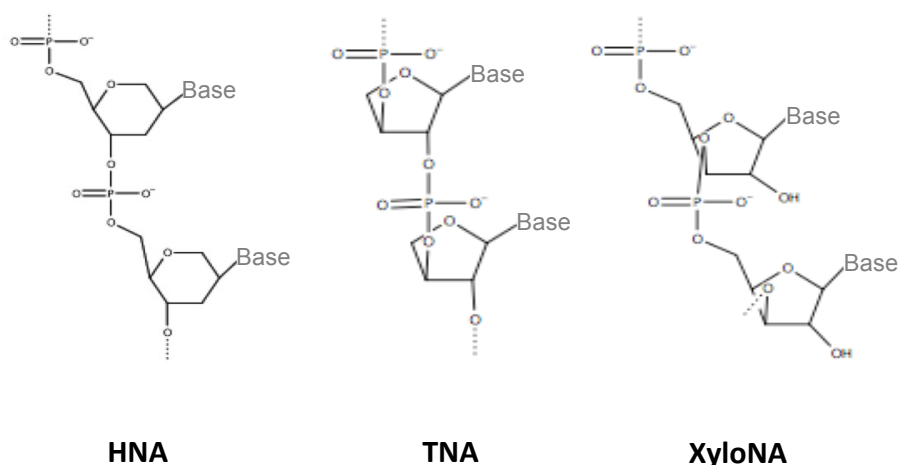
De voorbije jaren is er een enorme vooruitgang geweest in het ontwerp en de synthese van verschillende nucleotide-analogen die als substraat kunnen dienen voor bepaalde DNA-polymerasen. Nucleotide-analogen hebben ofwel een modificatie in het nucleobase, of een onnatuurlijk suikergedeelte of een aangepaste trifosfaatgroep. Dergelijke artificiële nucleotiden worden gebruikt om de substraatspecificiteit en reactiemechanismen van verschillende DNA-polymerasen te onderzoeken, maar ook om XNA-polymerasen te ontwikkelen die nucleotide-analogen als substraten gebruiken (Yang en Herdewijn, 2011).

De ruggengraat van een natuurlijk nucleïnezuur bestaat uit alternerend een (desoxy)ribosemolecule en een fosfaatgroep. Het patroon van het derde type van nucleïnezuren, namelijk XNA, lijkt chemisch gezien op dat van de natuurlijke polymeren, maar verschillen structureel voldoende van DNA en RNA. Zo kan zowel de functie als de biosynthese van XNA afgescheiden worden van die van natuurlijke polymeren (Loakes en Holliger, 2009).

MODIFICATIES IN SUIKERGEDEELTE

Een alternatieve suikergroep, bijvoorbeeld hexose of xylose, kan het natuurlijke (desoxy)ribosegedeelte van DNA of RNA vervangen. Sommige analogen, zoals hexosenucleïnezuren (HNA), hybridiseren met de canonieke basen van natuurlijke nucleïnezuren volgens de regels van Watson-Crick. Xylosenucleïnezuren (XyloNA), waarbij nucleotiden een 3'-epimeer van ribosesuiker zijn, kan enkel met zichzelf hybridiseren en is bovendien voldoende verschillend van de natuurlijke nucleotiden, waardoor XyloNA (zie **figuur 1.5**) in aanmerking komt als substraat voor het construeren van een orthogonaal systeem.

Ondertussen is reeds van een aantal alternatieve ruggengraatstructuren aangetoond dat ze algemene homoduplices (XNA:XNA) kunnen vormen. Zo zijn, bijvoorbeeld hexosenucleïnezuren (HNA) en threosenucleïnezuren (TNA) (zie **figuur 1.5**) substraten voor bepaalde polymerasen en kan dergelijk onnatuurlijk polymeer dienst doen als matrijs. HNA, met een insertie van een CH₂-groep tussen het O-atoom en het anomere C-atoom van de furanosering ten opzichte van een natuurlijk nucleoside, geeft een chemisch en enzymatisch stabiel nucleïnezuur en is bovendien in staat informatie door te geven. HNA kan hybridiseren met DNA-structuren, met RNA en met zichzelf (Herdewijn en Marlière, 2009). Zowel HNA:HNA en HNA:RNA-duplices vormen een A-DNA helix (meer compact vergeleken met de dominante B-DNA helix) met een meer uitgesproken grote groeve.



Figuur 1.5: Voorbeelden van modificaties in het suikergedeelte. Eerst is de structuur van hexosenucleïnezuur (HNA) weergegeven, vervolgens de structuur van threosenucleïnezuur (TNA) en die van xylosenucleïnezuur (XyloNA).

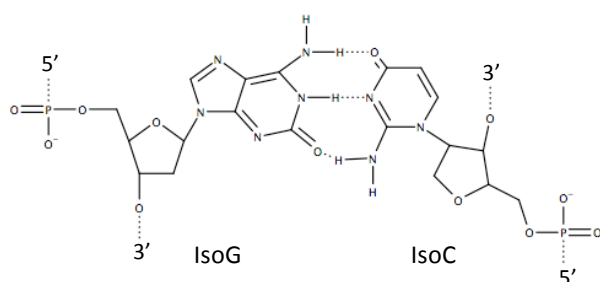
MODIFICATIES IN NUCLEOBASE

De best bestudeerde groep van nucleoside-analogen zijn deze met modificaties in het basedeelte, door de interesse in alternatieve basenparingsystemen. Dit laat een uitbreiding van de genetische code toe om nieuwe specifieke codons te genereren voor de incorporatie van mogelijks onnatuurlijke aminozuren in proteïnen (Loakes en Holliger, 2009).

Substituties aan het C5-atoom van een pyrimidine en aan het C7-atoom van een purine worden goed getolereerd door bepaalde DNA-polymerasen en reverse-transcriptasen, omdat de substituent zich in de grote groeve van de helix bevindt. Indien een substituent zich in de kleine groeve zou bevinden, hindert de extra groep de conformatiesluiting van het polymerase en verdere incorporatie. Substituenten kunnen een functie hebben in detectie, door gebruik van kleurstofmoleculen als substituent. Te grote (hydrofobe) substituenten op het C5-atoom van een pyrimidine zijn echter slechte substraten voor het polymerase, door sterische hinder en veroorzaken bijgevolg *stalling* van het polymerase. Bepaalde polymerasen kunnen echter nucleïnezuuren synthetiseren waarbij enkele of alle basen substituenten dragen (Loakes en Holliger, 2009).

Enkele jaren geleden toonden Loakes en Holliger (2009) aan dat bepaalde nucleosideanalogen, isoG en isoC, specifiek en efficiënt geïncorporeerd kunnen worden als basenpaar in een nucleïnezuur zonder de duplexstructuur te verstoren (zie **figuur 1.6**). Het polymerase insereert het analoog in de groeiende nucleïnezuurketen, specifiek tegenover zijn complementaire base, met slechts een

licht gereduceerde efficiëntie in vergelijking met zijn natuurlijke tegenhangers (Loakes, Holliger, 2009).



Figuur I.6: Alternatieve basenparing tussen isoguanine en isocytosine. Beide basen verschillen van het overeenkomstig natuurlijke nucleobase, maar vertonen toch een basenparing via waterstofbindingen. Bijkomstig kunnen er nog substituenten geplaatst worden op de nucleobase.

MODIFICATIES IN FOSFAATGEDEELTE

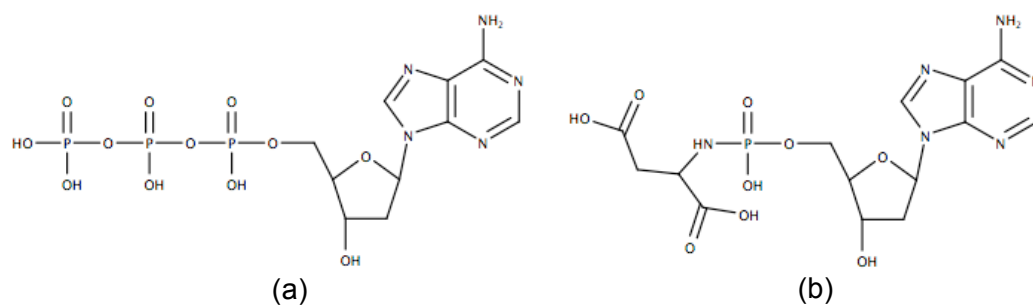
Modificaties in het fosfaatgedeelte betreffen een verandering aan de α -fosfaatgroep of een verandering in het pyrofosfaatgedeelte, de uittredende groep. Een voorbeeld is nucleoside- α -thiotrifosfaten, waarbij een zuurstofatoom vervangen is door een zwavelatoom aan het α -fosforatoom, en dat geïncorporeerd kan worden door bepaalde polymerasen tijdens XNA-synthese (Yang *et al.* 2007).

Een uittredende groep is verantwoordelijk voor de activatie van monomeren en is niet aanwezig in biopolymeren, aangezien dergelijke groep vrijgezet wordt tijdens DNA-synthese. De beste uittredende groepen zijn zwakke basen en protonatie verhoogt de mogelijkheid als uittredende groep (Herdewijn en Marlière, 2012). Hoewel de modificatie van de uittredende groep moeilijk is, is het niet onmogelijk. Er is recent aangetoond dat bepaalde nucleotiden met modificaties in het pyrofosfaatgedeelte ook de vorming van een ternair complex voor incorporatie kunnen activeren in een DNA-polymerase. Hoewel er weinig gedocumenteerd is over modificaties in het fosfaatgedeelte, ligt binnen de onderzoeksgroep de interesse vooral bij modificaties in de uittredende groep tijdens de nucleïnezuursynthese, in het bijzonder vervanging van pyrofosfaat door het aminozuur aspartaat.

Wanneer trifosfaten van gemodificeerde nucleosiden in de cel worden gebracht voor de *in vivo* XNA-synthese, is de kans reëel dat deze trifosfaten interfereren met biologische processen, zoals DNA- en RNA-metabolisme, of met fosforylatieregulatie. Vervanging van de pyrofosfaatgroep door een aspartaat-residu in de precursors voor de XNA-synthese, zou de mogelijke interferentie moeten

verhinderen. Dergelijke nucleotide-analogen mogen enkel herkend worden door XNA-polymerasen en zeker niet door enzymen betrokken bij andere cellulaire functies (Herdewijn en Marlière, 2012). Bovendien is aspartaat als uittredende groep niet toxisch en kan *in vivo* gebruikt worden, aangezien het een natuurlijk aminozuur is dat niet schadelijk is voor de cel. Ook zijn deze analogen voldoende stabiel tegen spontane hydrolyse onder fysiologische condities en tegen enzymatische degradatie. Deze analogen verlagen tot slot de negatieve lading ten opzichte van fosfaatgroepen van vier negatieve ladingen naar drie. Celpenetratie met dergelijke nucleotide-analogen kan zo vlotter verlopen (Adelfinskaya *et al.* 2007).

Hiervoor zijn nucleosidemonofosfaten ontwikkeld, ter vervanging van de natuurlijke nucleosidetrifosfaten. Nucleosidemonofosfaten zijn de precursors van nucleosidetrifosfaten en vormen trifosfaten met behulp van nucleosidefosfaatkinase en nucleosidedifosfaatkinase. Het probleem bij dergelijke nucleosidemonofosfaten is dat het natuurlijk polymerase deze niet als substraat herkent, aangezien er geen nucleofiele aanval kan plaatsvinden. Bijgevolg kan het polymerase niet geactiveerd worden voor incorporatie van het substraat in de groeiende nucleïnezuurketen. Adelfinskaya *et al.* (2007) trachtten een nucleosidemonofosfaat te activeren door het te koppelen met een natuurlijk aminozuur via een fosforamide-binding (P-N binding), meer bepaald met een L-aspartaat-residu, genaamd aspartaat-desoxyadenosinemonofosfaat (Asp-dAMP) (zie **figuur 1.7**). Dit werd gebruikt als substraat voor HIV-1 reverse-transcriptase (RT), een polymerase met een bredere substraatspecificiteit. Dit leek rationeel haalbaar aangezien bepaalde aminozuren een negatieve lading dragen (aspartaat en glutamaat) en/of een complex kunnen vormen met metalen, meer bepaald met magnesiumionen die noodzakelijk zijn in het nucleotide-incorporatiemechanisme. Zo zou het gekoppeld aminozuurresidu als een goede uittredende groep kunnen dienen bij de incorporatie van de nucleotiden. Verder onderzoek (Herdewijn en Marlière, 2007) toonde aan dat het fosforamide-nucleotide Asp-dAMP kan incorporeren met HIV-1 RT als polymerase bij een matrijs afhankelijke DNA-synthese, na het breken van de aanwezige fosforamide-binding tijdens de nucleofiele aanval. Dit betekent dat aspartaat het pyrofosfaatgedeelte van natuurlijke nucleotiden kan nabootsen en over gelijkaardige chemische, structurele en elektrostatische eigenschappen beschikt als de natuurlijke uittredende groep (Herdewijn en Marlière, 2007).



Figuur 1.7: De structuur van een natuurlijk nucleotide en zijn substraatanaloog met een modificatie in het fosfaatgedeelte. (a) Het natuurlijke nucleotide desoxyadenosinetrifosfaat (dATP) en (b) aspartaat-desoxyadenosinemonofosfaat (Asp-dAMP), een natuurlijk desoxyribonucleotidemonofosfaat molecule gekoppeld aan het aminozuur aspartaat via een fosforamide (P-N) binding.

Structurele studies hebben aangetoond dat Asp-dAMP in het actief ternair complex op een andere manier bindt vergeleken met de natuurlijke substraten, maar dezelfde aminozuren in HIV-1 RT zijn betrokken, evenals een vergelijkbare positie van beide magnesiumionen (Herdewijn en Marlière, 2012). Deze ionen vormen ook een coördinatie tussen de carboxylaatgroepen in het polymerase én tussen beide carboxylaatgroepen van het aspartaat-residu in het substraat. De carboxylaatgroepen zijn dus een goede *mimic* van de β - en γ -fosfaatgroepen in het natuurlijke pyrofosfaat. De incorporatie van dit analoog volgt de Michaelis-Menten kinetika en uit kinetische analyses valt af te leiden dat de incorporatie-efficiëntie van Asp-dAMP 1300 maal lager ligt dan die van het natuurlijke substraat dATP en dat de Michaelis-Menten constante (K_m) hoger ligt voor het analoog. Het fosforamide-substraat dissocieert dus eenvoudiger en sneller uit de *binding pocket* van het polymerase. Deze hoge K_m -waarde suggereert verder ook dat er een zwakkere binding, lagere affiniteit, is tussen het artificieel nucleotide en de actieve *site* in het polymerase. Anderzijds is de waargenomen V_{max} maar driemaal lager voor het analoog in vergelijking met het natuurlijke substraat, wat dus een snelle en efficiënte nucleofiele verwijdering van het aspartaat-residu geeft, eenmaal het fosforamide-substraat gebonden is in de actieve *site* en een fosfo-ester binding gevormd is (Adelfinskaya *et al.* 2007). Echter, na het inbouwen van twee Asp-dAMP-moleculen achter elkaar, pauzeert het polymerase HIV-1 RT, om een nog onbekende reden (Adelfinskaya en Herdewijn, 2007).

Elektrostatistische interacties tussen substraat en het polymerase zijn dus van belang voor de nucleotidyltransferreactie. Asp-dAMP toonde aan over gelijkaardige substraateigenschappen te beschikken voor HIV-1 RT en kunnen dus dienen als alternatief substraat voor een beperkte enzymatische DNA-synthese. Ook Asp-dAMP is, net zoals de natuurlijke nucleotiden, wateroplosbaar, chemisch en

enzymatisch stabiel, bezit de juiste geometrie, is herkenbaar in de actieve *site* van het polymerase en kan zo zorgen voor de vorming van het actief ternair complex (Herdewijn en Marlière, 2012). De incorporatie is stereoselectief, want D-Asp-dAMP wordt niet geïncorporeerd. Tot slot volgt de incorporatie van L-Asp-dAMP moleculen de regels van Watson-Crick. Wanneer het artificieel nucleotide incorporeert in de groeiende nucleïnezuurketen, toont het nucleïnezuur natuurlijke eigenschappen, aangezien de nucleobase en het suikergedeelte onveranderd zijn. De translatie van het nucleïnezuur zal dus onveranderd zijn, aangezien de ribosomen de ingebouwde natuurlijke nucleotiden kunnen herkennen. Een verder stadium in dit onderzoek is de koppeling van een gemodificeerd nucleosidemonofosfaat, bijvoorbeeld XyloNA, met aspartaat als alternatieve uittredende groep ter vervanging van pyrofosfaat. Theoretisch gezien zouden dergelijke artificiële nucleotiden kunnen converteren in een actief antiviraal middel tegen HIV, aangezien dan de nucleïnezuurketen verandert van de natuurlijke eigenschappen en translatie van het virus zo niet zal kunnen plaatsvinden (Adelfinskaya en Herdewijn, 2007). Deze laatste zouden voldoen aan de vereisten voor orthogonaliteit, aangezien er geen endogene biosynthese van dergelijke nucleotiden mogelijk is. Voor endogene biosynthese is er een extra enzym vereist om het gemodificeerd nucleoside te koppelen aan het aspartaat-residu (Herdewijn en Marlière, 2012).

Uit het bovenstaande blijkt dat het HIV-1 RT in staat is het fosforamide-nucleotide te herkennen, waarna aspartaat dienst doet als uittredende groep tijdens de polymerisatiereactie. Ook de drie andere fosforamidaat-analogen, namelijk Asp-dTMP, Asp-dGMP en Asp-dCMP, worden herkend door HIV-1 RT en incorporeren in een groeiende DNA-keten, met een juiste basenparing corresponderend met het overeenkomstig nucleotide in de matrijs. Hoe dan ook blijft voor elk nucleoside, gekoppeld aan een aspartaat als uittredende groep, de efficiëntie van de incorporatie lager dan die voor het overeenkomstig natuurlijk nucleotide, aangezien de waargenomen K_m waarde hoger is voor de aspartaatfosforamide-analogen en de waarde voor V_{max} is lager in vergelijking met die van de natuurlijke substraten. Deze gegevens bewijzen dat er een correcte nucleofiele verwijdering is van het aminozuurgedeelte, eenmaal deze gebonden is in de actieve *site* van het polymerase (Terrazas *et al.* 2008). De incorporatie-efficiëntie is tot slot base-afhankelijk. Asp-dAMP vertoont de meest efficiënte incorporatie door HIV-1 RT, gevolgd door Asp-dTMP, Asp-dGMP en tot slot door Asp-dCMP (Terrazas *et al.* 2008).

Verscheidende gemuteerde DNA-polymerasen vertonen een drastische verbetering in de capaciteit voor de incorporatie, elongatie en replicatie van bepaalde nucleotide-analogen. Bij een aantal natuurlijke DNA-polymerasen zijn verdere aanpassingen wenselijk voor een processieve synthese, replicatie en evolutie van artificiële nucleotiden. Aangezien bestaande polymerasen reeds de noodzakelijke eigenschappen voor synthese van natuurlijke nucleïnezuren bezitten, is het relatief eenvoudig deze te modificeren via gerichte evolutie (Loakes en Holliger, 2009).

De zogenaamde *engineering* van natuurlijke DNA-polymerasen is gestart met een simpele deletie van bijkomende domeinen, die geen noodzakelijke functie in het wild-type polymerase vertonen (Loakes en Holliger, 2009). Loakes en Holliger (2009) hebben door dergelijke deleties een aantal polymerasen tot stand gebracht met verbeterde eigenschappen voor de incorporatie van nucleotide-analogen. Een veel voorkomende aanpassing in natuurlijke DNA-polymerasen is de gedeeltelijke of volledige deletie van het 3'>5'-exonucleasedomein van het DNA-polymerase. Ook door inactivatie van dit exonucleasedomein, door de gerichte mutatie van twee essentiële aspartaat-residu's in het N-terminale exonucleasedomein, geeft proofreading-defectieve mutanten (exo^-). De exo^- -varianten zijn geschikt voor de incorporatie van substraatanalogen, aangezien de normale 3'>5'-exonuclease-activiteit zorgt voor excisie van de substraatanalogen, met eenzelfde efficiëntie vergeleken met *mismatches*. Door de inactivatie of deletie van het 3'>5'-exonucleasedomein is de kans wel groter op een foutieve basenparing. Ook inserties van bepaalde structuren in het polymerase (bijvoorbeeld bindingloops) en fusie van DNA-bindende proteïnen aan het polymerase kunnen leiden tot een verbeterde processiviteit voor artificiële nucleotiden (Loakes en Holliger, 2009).

DNA-polymerasen vertonen een specifieke moleculaire herkenning en incorporatie van slechts vier verschillende natuurlijke nucleotiden met een minimale foutenmarge. De hoge betrouwbaarheid en strikte geometrische controle in de actieve *site* van polymerasen maakt ze gevoelig aan aanpassingen in het actief primer-matrijs-nucleotide complex. Dergelijke aanpassingen verlagen de efficiëntie van de incorporatie van nucleotide-analogen en geven dus een beperkte enzymatische replicatie van synthetische nucleïnezuren. XNA-polymerase-activiteiten, met XNA, DNA of RNA als matrijs, moeten in staat zijn om precursoren met bijvoorbeeld een aspartaat als uittredende groep te herkennen en natuurlijke nucleosidetrifosfaten en andere nucleotide-analogen uit te sluiten. Dergelijke XNA-polymerasen kunnen mogelijks ontstaan door gerichte evolutie van bestaande DNA-polymerasen, die vervolgens in staat zijn nieuwe polymeren te synthetiseren en als

matrijs te gebruiken om informatie door te geven. Actieve varianten van gemuteerde DNA-polymerasen worden bekomen met behulp van bepaalde selectiemethoden (Herdewijn en Marlière, 2009).

SELECTIEMETHODEN VOOR GERICHTE EVOLUTIE VAN DNA-POLYMERASEN

In vivo selectie van polymerasen heeft het voordeel dat het een geschikte selectie van actieve varianten toelaat uit een grote bibliotheek van polymerase-varianten. Verschillende repertoireselectiemethoden, die verder beschreven staan, geven een snelle en directe detectie van polymerase-activiteit bij verschillende condities, zoals hoge temperatuur en aanwezigheid van inhibitoren, en dit verduidelijkt het mechanisme van polymerasen (Ghadessy *et al.* 2001).

Eén van de meest productieve selectiemethoden van een grote bibliotheek van mutante polymerasen, is de zogenaamde *phage display* selectiemethode (Fa *et al.* 2004). Hierbij wordt een polymerase aan een faag gekoppeld als fusieproteïne met één van de mantelproteïnen. Het gen voor het polymerase is gecodeerd in het faaggenoom, waardoor een link blijft tussen genotype en fenotype. Op dezelfde faag wordt ook een matrijs-primercomplex gekoppeld (Delespaul *et al.* 2015). Indien het polymerase in staat is de toegediende nucleotide-analogen te incorporeren, zal de primer verlengd worden. Uiteindelijk zal het polymerase een gebiotinyleerd nucleotide inbouwen. Deze biotinylatie laat isolatie toe met behulp van magnetische *beads* bedekt met streptavidine. Voor het bekomen van de meest actieve mutant van een polymerase, is het herhaaldelijk doorlopen van de cyclus noodzakelijk. Deze activiteitsgebaseerde methode laat selectie toe van varianten van polymerasen met een gewenste eigenschap, door het aanpassen van de condities noodzakelijk voor dergelijke eigenschap (Fa *et al.* 2004).

Een alternatieve selectiestrategie voor gerichte evolutie van polymerasen, alleen geschikt voor thermofiele polymerasen, is *Compartmentalized Self-Replication* (CSR). CSR-selectie zorgt voor een snelle evolutie van polymerasen met bruikbare functies uit een repertoire van willekeurig gemuteerde polymerasen. Repertoires kunnen beperkt zijn tot een bepaalde regio voor de evolutie van gewenste polymerase-fenotypes. Deze strategie is gebaseerd op de activiteit van een polymerase dat met toegevoegde (artificiële) nucleotiden en primers enkel zijn eigen coderend gen repliceert in een water-in-olie (w/o) emulsie-PCR. Deze emulsie zorgt voor de genotype-fenotype link van de individuele zelf-replicerende reacties, doordat er geen uitwisseling mogelijk is van macromoleculen, zoals DNA en proteïnen, door de hydrofobe surfactant, zelfs niet bij hoge temperaturen. Een CSR

cyclus kan herhaald worden voor het bekomen van betere eigenschappen van het polymerase, door de geamplificeerde genen van actieve varianten te klonen en de cyclus vervolgens opnieuw te starten. Hierbij kunnen eventueel de condities aangepast worden voor evolutie van polymerasen met nieuwe en bruikbare eigenschappen. Bovendien evolueren de polymerasen genen zelf naar een meer efficiënte replicatie tijdens CSR. Op deze manier zijn als voorbeeld varianten van DNA-polymerase *Taq* waargenomen met een 11 maal hogere stabiliteit vergeleken met het wild-type enzym (Ghadessy *et al.* 2001). CSR kan nuttige eigenschappen van een polymerase verbeteren, vooral de thermostabiliteit, een belangrijke eigenschap in PCR. Nadeel van CSR is wel dat bij inbouw van artificiële nucleotiden (1) relatief efficiënte polymerisatie vereist is, en (2) ingebouwde nucleotiden ook als matrijs moeten worden herkend, waardoor de selectiedruk voor het evolueren van een XNA-polymerase meestal te hoog is (Ghadessy *et al.* 2001).

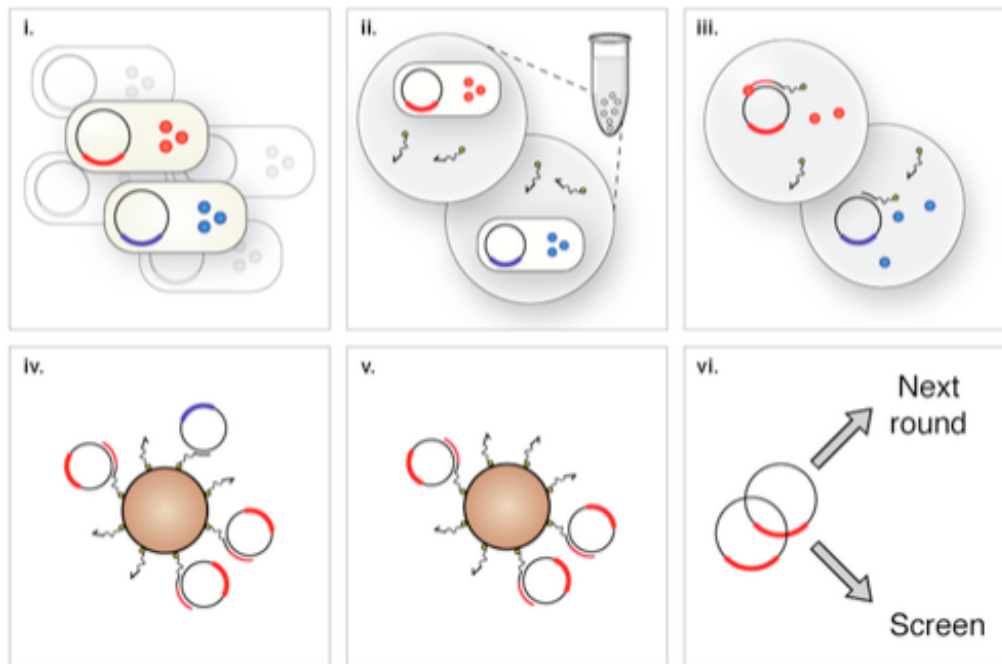
COMPARTMENTALIZED SELF-TAGGING

Met *Compartmentalized Self-Tagging*, verder afgekort als CST, is er een snelle selectie mogelijk van DNA-polymerase-varianten binnen een gegenereerd repertoire, geschikt voor XNA-synthese. Het repertoire wordt opgegroeid en tot expressie gebracht in bacteriecellen, waarna deze cellen, zoals bij CSR, gecompartmentaliseerd worden in een water-in-olie emulsie. Deze emulsies (compartimenten) zijn lange tijd stabiel bij hoge temperaturen tot boven 90 °C, ideaal voor de selectie van repertoires van thermofiele polymerasen. Bacteriële cellen, die het polymerase tot overexpressie brengen (zie **figuur 1.8i**), zijn op een zodanige manier in emulsie gebracht, zodat elk compartiment een enkele cel bevat (zie **figuur 1.8ii**). De oliefase van de emulsie voorkomt uitwisseling van grote fragmenten van nucleïnezuren en proteïnen tussen compartimenten, zodat er een duidelijke link tussen fenotype en genotype is. Dergelijke emulsie bevat ook synthetische nucleotiden en een korte gebiotinyleerde primer, complementair aan het plasmide coderend voor het polymerase. Dergelijke primers zijn te kort om stabiel te binden aan het plasmide en voor een stabiele interactie is er extensie van de primer nodig. Een denaturatiestap met een hoge temperatuur zorgt voor de uitschakeling van achtergrond bacteriële enzymatische activiteiten en de denaturatiestap verzekert het openbreken van de bacteriële cellen, waardoor het polymerase beschikbaar is voor de substraten (zie **figuur 1.8iii**). Actieve polymerasen, die artificiële nucleotiden efficiënt kunnen incorporeren, zorgen voor een extensie van de primer en stabiliseren zo de interactie tussen primer en plasmide. Inactieve varianten van het polymerase verlengen de primer niet of in

verwaarloosbare mate. Breking van de emulsie laat vervolgens isolatie van de plasmiden toe. De overmaat aan onverlengde primers wordt door gelfiltratie verwijderd en de overblijvende gebiotinyleerde primers, stabiel gebonden aan het plasmide, worden vervolgens gebonden aan paramagnetische *beads* bedekt met streptavidine (zie **figuur I.8iv**). Verdere wasstappen verwijderen de zwak gebonden plasmiden, voor een aanrijking van de populatie met genetische informatie van actieve polymerasen (zie **figuur I.8v**). Van opgevangen plasmide-DNA kan de sequentie bepaald worden en/of de geselecteerde DNA-plasmiden kunnen een nieuwe selectieronde ondergaan voor een betere aanrijking van actieve varianten van het polymerase (zie **figuur I.8vi**) (Pinheiro *et al.* 2014).

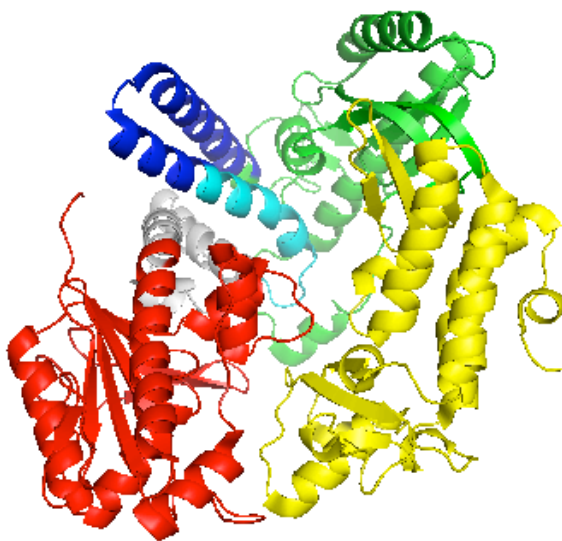
Door de water-in-olie emulsie is CST een geschikte selectiemethode, omdat deze emulsie zorgt voor een sterke link tussen fenotype, de enzymatische functie specifiek voor XNA-synthese, en genotype, genetische informatie verantwoordelijk voor deze functie. Anderzijds laat deze methode ook een grote populatie van varianten toe, die op basis van hun fenotype geselecteerd worden (Pinheiro *et al.* 2014). In tegenstelling tot CSR wordt alleen geselecteerd op DNA-afhankelijke XNA-polymerase-activiteit, en niet op XNA-afhankelijke polymerase-activiteit. Bovendien dient de geselecteerde sequentie (plasmide) voor herklonen niet terug te worden omgezet naar DNA. CST is daarom meer aangewezen bij initiële selectie van verbeterde (DNA-afhankelijke) XNA-polymerasen. CST wordt in dit project ook verkozen boven *phage display*, aangezien in de onderzoeksgroep werd aangetoond dat *phage display* van polymerase en *co-display* van een primer-matricscomplex een lage efficiëntie heeft (Delespaul *et al.* 2015).

De synthese van XNA is afhankelijk van het type substraat en de *engineering* van het polymerase. Verbeteringen door gerichte evolutie van polymerasen samen met de gesofisticeerde chemie van de nucleotide-analogen, maken enzymatische synthese, replicatie en evolutie van onnatuurlijke nucleïnezuuren mogelijk, met een meer uitgebreide mogelijkheid aan chemische substituties (Loakes en Holliger, 2009).



Figuur 1.8: Compartmentalized Self-Tagging. Polymerase-repertoires (i) worden gecompartmentaliseerd met primers en artificiële nucleotiden in een w/o emulsie (ii). Een actief polymerase verlengt de gebiotinyleerde primer en dit zorgt voor een stabiele interactie tussen primer en plasmide, coderend voor het actief polymerase (iii). Breking van emulsie zorgt ervoor dat interacties tussen plasmide en gebiotinyleerde primer binden aan *beads* bedekt met streptavidine (iv). Wasstappen verwijderen onstabiele interacties van plasmide met primer (v) en het aangerijkt plasmide ondergaat een nieuwe CST-ronde, voor een verbeterde verrijking, of sequencing (vi). Bron: Pinheiro *et al.* 2012, supplementary materials.

Zoals eerder aangehaald zijn DNA-polymerasen logische vertrekpunten voor het bekomen van een matrijsafhankelijke XNA-synthese. Hoewel de meeste artificiële nucleotiden slechte substraten zijn voor het polymerase en dus moeilijk ingebouwd kunnen worden, is het niet onmogelijk. Binnen de onderzoeksgroep ligt de interesse ondermeer op het thermostabiele DNA-polymerase TerminatorTM, een variant van DNA-polymerase 9°N *Thermococcus species*. Deze variant verschilt van DNA-polymerase 9°N door een substitutie van het alanine-residu op positie 485 naar leucine. Deze A485L-mutatie, ook wel de Terminatormutatie genoemd, versoepelt de specificiteit van het polymerase en experimenten toonden aan dat TerminatorTM in staat is een brede waaier aan artificiële nucleotiden te incorporeren (Ichida *et al.* 2012). DNA-polymerase TerminatorTM bezit in zekere zin de nodige enzymatische structuren en eigenschappen voor incorporatie van, al dan niet natuurlijke, nucleotiden. De globale structuur van het DNA-polymerase TerminatorTM is weergegeven in **figuur I.9**, met elk domein in een andere kleur.



Figuur I.9: Structuur van DNA-polymerase TerminatorTM. Het palmdomein is weergegeven in groen, het duimdomein in geel, het non-functionele exonucleasedomein (exo⁻-variant) in rood en grijs is het interdomein. In blauw is het vingerdomein weergegeven met in het lichtblauw het deel van het vingerdomein dat van interesse is voor dit project (zie doelstellingen) (PDB ID. 4K8X).

De exo⁻-variant van DNA-polymerase TerminatorTM is een van de best bestudeerde polymerasen voor de incorporatie van artificiële nucleotiden. Het is al eerder aangetoond dat dit polymerase de meest effectieve incorporatie geeft met TNA trifosfaten (zie MODIFICATIES IN SUIKERGEDEELTE), waarbij de waarde voor K_m hoger is en die van K_{cat} verlaagd is in vergelijking met de overeenkomstige waarden voor de natuurlijke nucleotiden. Dit betekent dat DNA-polymerase TerminatorTM een lagere affiniteit heeft voor een TNA-nucleotide vergeleken met een natuurlijk nucleotide, en dat het polymerase bijgevolg een verlaagde katalytische activiteit vertoont. Toch is aangetoond dat dit polymerase TNA-polymeren tot 80 TNA

nucleotiden lang kan synthetiseren (Ichida *et al.* 2012). Voor dergelijke synthese zijn magnesiumionen vervangen door mangaanionen voor een goede positionering van nucleotide-analogen in het polymerase (Loakes en Holliger, 2009). Ook het N-terminale exonucleasedomein is uitgeschakeld door de gerichte mutatie van twee katalytische aspartaat-residu's, aangezien een exo^- -variant een verbeterde aanpassing en affiniteit geeft voor artificiële nucleotiden met een aangepaste geometrie, noodzakelijk voor XNA-synthese (Adelfinskaya *et al.* 2007).

Binnen de onderzoeksgroep is er vooral interesse voor aspartaat-monofosfaatnucleosiden (zie voorbeeld in **figuur I.7 (b)**) als alternatief substraat voor de incorporatie in een groeiende nucleïnezuurketen. DNA-polymerase TerminatorTM is een veel gebruikt polymerase in PCR-experimenten, door zijn hoge thermostabiliteit, waardoor dit polymerase mogelijk geschikt is als katalysator voor de enzymatische productie van nucleïnezuren met fosforamidaat-nucleotidesubstraten (Yang en Herdewijn, 2011). De groep van Herdewijn toonde reeds aan dat DNA-polymerase TerminatorTM Asp-dAMP-nucleotiden herkent en er een aantal kan incorporeren tijdens DNA-replicatie (Adelfinskaya *et al.* 2007). Het polymerase zorgt dan voor een korte extensie van de primer met Asp-dAMP en de drie andere natuurlijke nucleotiden als bouwstenen. Echter, na de incorporatie van twee tot drie Asp-dAMP is er ook een waargenomen blokkering van het polymerase, net zoals bij HIV-1 RT, voor een nog onbekende reden (zie ASPARTAAT DESOXYADENOSINEMONOFOSFAAT (ASP-DAMP)). Incorporatie met glutamaat-dAMP vindt niet plaats met DNA-polymerase TerminatorTM, wat de conformationele substraatspecificiteit van het polymerase voor herkenning en incorporatie bevestigt (Herdewijn en Marlière, 2012).

II. DOELSTELLINGEN

Het doel van dit project is een DNA-afhankelijk XNA-polymerase tot stand te brengen dat aspartaat-nucleotiden kan herkennen en incorporeren tegenover een DNA-matrijs. Aspartaat-nucleotiden zijn beperkt tot Asp-dAMP en Asp-dTMP-substraten, aangezien Asp-dCMP en Asp-dGMP-substraten niet voorhanden zijn. Wegens de gekende versoepelde activiteit van DNA-polymerase TerminatorTM, lijkt TerminatorTM hiervoor het meest geschikt. Bovendien toonde de groep van Herdewijn reeds aan dat TerminatorTM twee tot drie Asp-dAMP kan incorporeren, waarna het polymerase pauzeert (Adelfinskaya *et al.* 2007). Deze pauzering van het polymerase is echter niet gewenst bij XNA-polymerasen. Gerichte evolutie van het DNA-polymerase TerminatorTM met *Compartmentalized Self-Tagging* (CST) kan bijgevolg aangewend worden voor het bekomen van mutanten van DNA-polymerase TerminatorTM die in staat zijn voor een meer efficiënte elongatie met Asp-dAMP en Asp-dTMP-moleculen. Zo kunnen mogelijks interacties tussen polymerase en Asp-dAMP (en Asp-dTMP) energetisch gefavoriseerd worden voor een correcte en efficiënte incorporatie, wat het uiteindelijke doel is in dit project en waartoe dit project beperkt blijft.

De focus van gerichte evolutie van het DNA-polymerase TerminatorTM ligt op een bepaalde regio in het vingerdomein (zie figuur 1.9, weergegeven in lichtblauw), daar waar de uittredende groep van nucleotiden interageert met het polymerase. Dat deel van het vingerdomein bestaat normaal uit een aantal positief geladen residu's, die voor elektrostatische interacties zorgen met de negatief geladen uittredende groep van de inkomende nucleotiden met het polymerase. Aangezien aspartaat-nucleotiden een modificatie dragen in het pyrofosfaatgedeelte, lijkt deze regio in het vingerdomein geschikt voor mutaties. Bij CST zal een groot repertoire (bibliotheek F) aan mutanten, die één of meerdere substitutie(s) van elkaar verschillen, van DNA-polymerase TerminatorTM in die regio gebruikt worden. Willekeurig aangebrachte substituties in het deel van het vingerdomein kunnen een verbeterde activiteit van het polymerase geven, een verslechterde activiteit of geen verschil in activiteit geven.

Gerichte evolutie van actieve varianten van het DNA-polymerase TerminatorTM uit het repertoire van mutanten in het deel van het vingerdomein, vindt plaats met de techniek CST. Vooraleer een actieve variant te selecteren, zal de CST eerst verdere optimalisatie moeten ondergaan, waarna met de geoptimaliseerde methode mogelijks varianten, die een verhoogde activiteit vertonen voor de incorporatie van desoxyribonucleotiden gekoppeld aan aspartaat als uittredende groep, geselecteerd kunnen worden.

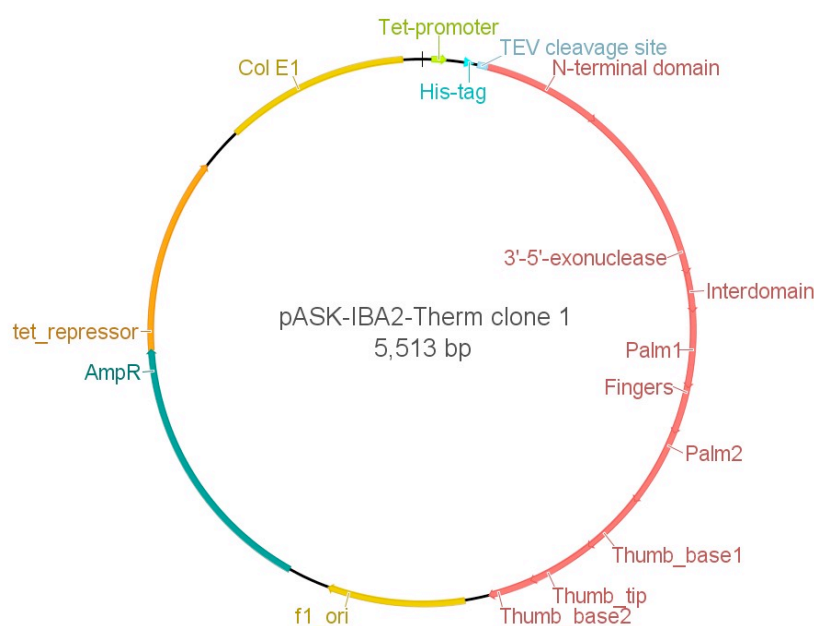
III. MATERIALEN EN METHODEN

BACTERIESTAM *E. CLONI*

E. cloni 10G (Lucigen, Middleton, VS), afgeleid van een elektrocompetente *E. coli* streng, is een algemene kloneringsstam, geoptimaliseerd voor stabiele propagatie van plasmide-DNA.

VECTOR PASK-THERM EN MUTANTENBIBLIOTHEEK

De expressievector pASK-Therm (**figuur III.1**) die gebruikt werd voor de aanmaak van het DNA-polymerase TerminatorTM en zijn varianten, is een afgeleide van de vector pASK-IBA2. Deze expressievector bevat, naast het polymerase-gen onder controle van een tet-promoter, een aantal functionele elementen, waaronder een N-terminale 6xHistidine-tag, een ampicilline-resistentiegen en een tet-repressor-gen. De tet-repressor zorgt voor een strikt gecontroleerde expressie van het polymerase, na transformatie in *E. cloni*-cellen. Anhydrotetracycline (AHTC) is een inducer die sterk bindt aan de tet-repressor en zo de expressie van het gen kan starten. In het polymerase-gen in deze vector werd een groot repertoire aan mutanten (10 miljoen) gegenereerd in een bepaald deel van het vingerdomein, verder benoemd als bibliotheek F (aangemaakt door B. Bauwens via *inverse* PCR met *gespikete* primers).



Figuur III.1: Expressievector pASK-Therm. In het rood is het structurele gen, coderend voor DNA-polymerase TerminatorTM, weergegeven, alsook de verschillende domeinen en doelwitregio's voor mutagenese (Palm1, Fingers, Palm2, ...).

Primers gebruikt voor CST, herklonering, kolonie-PCR, sequencing, *high throughput* polymerase-activiteitstest (PAA) en incorporatietesten zijn opgelijst in tabel III.1. Alle primers waren afkomstig van IDT en bewaard op -20 °C met een concentratie van 20 µM.

Tabel III.1: Primers gebruikt voor CST, herklonering, kolonie PCR, *high throughput* polymerase-activiteitstest (PAA) en DNA-sequencing, matrijzen en DNA-probes gebruikt voor PAA en incorporatietesten.

Primer	Sequentie
CST: Gebiotinyleerde primer (met triethyleenglycerol (TEG)-spacer (15 C-atomen))	
Biotin-primer BP10	5' BiotineTEG/ACC ATC ACC 3'
PCR-amplificatie van vector voor herklonering	
Therm reclone f PstI	5' GTT CTG CCT GCA GTT GAA C 3'
Therm reclone r Sall	5' GAA ACA ACG TCG ACG TAC CG 3'
PCR-amplificatie van geselecteerde Terminator-genen voor herklonering	
Therm reclone f Sall	5' CCG TAC GTC GAC GTT GTT TC 3'
Therm reclone r PstI	5' ACG TTC AAC TGC AGG CAG 3'
Kolonie-PCR	
pASK-IBA-f	5' GAG TTA TTT TAC CAC TCC CT 3'
pASK-IBA-r	5' CGC AGT AGC GGT AAA CG 3'
<i>High throughput</i> polymerase-activiteitstest	
Gebiotinyleerde primer	5' Biotine/GAA CAG ATC ACC CGT GAC CTG 3'
T6	5' GAC CAG ACC AGA ACC TTT TTT CAG GTC ACG GGT GAT CTG TTC 3'
A5	5' GTC CTG TCC TGT TCC AAA AAC AGG TCA CGG GTG ATC TGT TC 3'
Probe voor T6	5' /digN/ GACCAGACCAGAACC 3'
Probe voor A5	5' /digN/ GTGCGGACCGGTAGC 3'
InterA	5' <u>GCT ACC GGT CCG CAC</u> TAG TCC TGT CCT GTT CC 3'
Incorporatietest	
Tag1	5' CTC GCT ATG ACA CTC GTC TCTT 3'
T46	5' AACTTTTTTTAAGAGACGAGTGTCATAGCGAG 3'
T47	5' CCGAAAAAAAAAAGAGACGAGTGTCATAGCGAG 3'
DNA-sequencing	
Therm-seq-400	5' GAA GGT GAC GAA GAA CTG AC 3'
Therm-seq-1200	5' CAA CAT CGT TTA CCT GGA CTT C 3'
Therm-seq-2000	5' GAA CAG ATC ACC CGT GAC CTG 3'

In het vet staan de restrictieplaatsen voor PstI en Sall weergegeven voor herklonering. De complementaire sequenties van probe voor A5 en InterA zijn onderlijnd en het 3'-uiteinde van InterA bindt aan de verlengde primer.

Toevoeging van anhydrotetracycline (0,2 µg/ml) tijdens de exponentiële fase van de cellen (OD₆₀₀ gelegen tussen 0,6 en 0,8) induceerde expressie van het DNA-polymerase Terminator™ in *E. coli*-cellen getransformeerd met pASK-Therm. De expressie werd nagegaan door het meten van de polymerase-activiteit in een PCR in een T3000 Thermocycler (Biometra). In deze activiteitstest zijn de getransformeerde en geïnduceerde *E. coli*-cellen zowel bron van het PCR-polymerase, als van matrijs (polymerase-coderend plasmide). Indien de cellen correct gevouwen en actieve polymerasen produceren, wordt een PCR-product gevormd. Tijdens de eerste denaturatiestap van 15 min lyseren de cellen, zodat het plasmide en het polymerase toegankelijk zijn voor het reactiemengsel. Het reactiemengsel van 25 µl bestond uit natuurlijke nucleotiden (400 µM), primer pASK-IBA-r (0,8 µM), primer Therm-seq-2000 (0,8 µM), Thermopol-buffer met 2 mM MgSO₄ (1x) en 0,05 ODu aan cellen. Aan de positieve controle werd 1 ng pASK-Therm en 1,25 Units (U) Pfu-polymerase, in plaats van geïnduceerde cellen, toegevoegd. Eén unit beschrijft de activiteit van een enzym, de hoeveelheid enzym dat 15 nmol nucleotiden kan incorporeren op 75 °C gedurende 30 min (New England BioLabs). De verwachte lengte van het PCR-product is 415 bp. Het temperatuursprogramma voor de activiteitstest is weergegeven in tabel III.2.

Tabel III.2: Temperatuursprogramma voor activiteitstest.

Stap	Temperatuur (°C)	Tijd	
1	95	15 min	
2	95	30 sec	30x
3	50	30 sec	
4	72	30 sec	
5	72	5 min	
6	12	∞	

PCR-producten werden geanalyseerd met agarose-gelelektroforese in 1x TAE-buffer (40 mM Tris, 20mM azijnzuur en 1mM EDTA). De lengte van de DNA-fragmenten werd bepaald met een ladder van GeneRuler 100bp Plus of GeneRuler 1kb Plus (Thermo Scientific). Na gelelektroforese werd de gel gekleurd in een bad met ethidiumbromide en werd het DNA gevisualiseerd met UV-licht.

COMPARTMENTALIZED SELF-TAGGING (CST)

Repertoires van DNA-polymerase TerminatorTM werden tot expressie gebracht in *E. cloni*-cellen. De geïnduceerde *E. cloni*-cellen (10^7 cellen per reactie) werden gecompartmentaliseerd in een water-in-olie (w/o) emulsie, waarin de oliefase uitwisseling van grote fragmenten nucleïnezuren en proteïnen tussen compartimenten voorkomt. De samenstelling van de waterige fase en de oliefase staat weergegeven in tabel III.3. Er is een reactiemengsel voor 1) het wild-type (actieve vorm van DNA-polymerase TerminatorTM) Therm⁺, 2) het inactief wild-type (D404A D540A D542A) Therm⁻, 3) een controle-bibliotheek van 1/100 verhouding van Therm⁺ in Therm⁻ om de aanrijking na CST te controleren en 4) de bibliotheek F van vingerdomeinmutanten. Verder zijn er nog twee controles, beide met een 1/100 verhouding van Therm⁺ in Therm⁻, waarvan één zonder toegevoegde nucleotiden, om de cellulaire nucleotidevoorraad na te gaan, en één zonder gebiotinyleerde primer, om de achtergrond van plasmiden die binden aan de *beads* na te gaan.

Geïnduceerde cellen werden geresuspendeerd in 150 µl waterfase en toegedruppeld aan 600 µl oliefase onder continu roeren (magnetische roerplaat). Voor volledige w/o-compartmentalisatie werd een extra roertijd van 20 min voorzien. Vervolgens werd elke suspensie gealiquoteerd per 90 µl en overgoten met een laagje minerale olie. Hierna volgde de extensiereactie (tabel III.4) van de gebiotinyleerde primer gedurende vijf cycli.

Tabel III.3: Samenstelling van waterige fase (links) voor één reactie in CST en samenstelling van de oliefase (rechts) voor CST.

Reagens	Volume (µl)	Finale concentratie	Reagens	Volume (ml)	Finale conc (v/v)
mQ water	79,25		Span 80	2,25	4,5 %
Thermopol-buffer 10x	15	1x	Tween 80	0,2	0,4 %
MgSO ₄ (25 mM)	15	2,5 mM	Triton X-100	0,025	0,05 %
MnCl ₂ (100 mM)	1,5	1 mM	Minerale olie	47,525	
dNTP (10 mM)	1,5	100 µM	Totaal	50	
BP10 (100 µM)	1	0,66 µM			
Formamide (100 %)	3	2 %			
DTT (100 mM)	1,5	1 mM			
BSA (10 mg/ml)	1,5	0,1 mg/ml			
Glycerol 50 %	30	10 %			
Totaal	150				

De gebruikte Thermopol-buffer (10x) bevat geen MgSO₄-ionen. Indien dit wel het geval is (20 mM MgSO₄ in Thermopol-buffer (10x)), wordt het volume van MgSO₄ (25 mM) verlaagd naar 3 µl per reactie. De dNTP-mix kan bestaan uit de vier natuurlijke nucleotiden, of uit dGTP, dCTP, Asp-dAMP en Asp-dTMP. Asp-dCMP en Asp-dGMP moleculen zijn niet voorhanden in dit onderzoek.

Tabel III.4: Temperatuursprogramma voor de extensie van de gebiotinyleerde primer in CST.

	Tijd (min)	Cyclus				
		1	2	3	4	5
Initiële denaturatie	10	95 °C				
Denaturatie	1	95 °C	95 °C	95 °C	95 °C	95 °C
Hybridisatie	15	37 °C	37 °C	50 °C	60 °C	65 °C
Elongatie	15	50 °C	60 °C	65 °C	65 °C	65 °C

Na CST werden de aliquots samengevoegd en vermengd met 900 µl waterverzadigd di-ethylether, waarna de oliefase en waterige fase door centrifugatie van elkaar gescheiden werden. De oliefase werd verwijderd en de waterfase een tweede maal geëxtraheerd met 1 ml waterverzadigd di-ethylether. Overmaat aan ongebruikte primers in de resulterende waterfase werden verwijderd door gelfiltratie (MicroSpin S400 *gel-purification columns*, GE Healthcare, VS). Het eluaat werd gedurende vier uur geïncubeerd met 100 µg paramagnetische *beads* (Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 beads, Thermo Fisher Scientific) in BWBS (10 mM Tris HCl pH 7,4, 1 M NaCl, 0,1 % v/v Tween20, 1 mM EDTA), om niet specifieke bindingen te reduceren, in een roterend platform bij kamertemperatuur.

Tot slot werden de *beads* gewassen om zwakgebonden plasmiden met onverlengde primers te verwijderen. Een eerste wasstap vond plaats met een hoge zoutconcentratie, namelijk met 500 µl BWBS. Een volgende wasstap gebeurde met een lage zoutconcentratie, met TBT2 (10 mM Tris HCl, pH 7,4, 20 mM NaCl, 0,02 % (v/v) Tween 20, 0,1 mg/ml BSA). Tot slot werd gewassen met TBT2 met 20 % formamide. Formamide destabiliseert de hybridisatie van de gebiotinyleerde primer aan het plasmide. Zodoende worden onverlengde primers of kortverlengde primers verder gedestabiliseerd en wordt geselecteerd op langere extensieproducten. *Beads* met plasmiden werden geresuspendeerd in 50 µl Tris-HCl-buffer (10 mM, pH 8). Het polymerase-gen van opgevangen plasmide-DNA werd geamplificeerd en geherkloneerd voor een nieuwe selectieronde.

AMPLIFICATIE GESELECTEERDE VARIANTEN

Variantgenen van de geïsoleerde plasmiden werden na CST geamplificeerd, aangezien slechts een kleine fractie plasmiden overblijft, en bij de (relatief inefficiënte) transformatie plasmiden verloren kunnen gaan. Per reactie werd 10 µl *beads-suspensie* met gebonden plasmide toegevoegd aan een reactiemengsel voor PCR (tabel III.5) volgens temperatuursprogramma in tabel III.6. De gebruikte *beads* hebben geen effect op de opbrengst of betrouwbaarheid van de amplificatie.

Tabel III.5: Reactiemengsel voor amplificatie geselecteerde varianten.

Reagens	Volume (µl)	Finale concentratie
mQ water	146	
High Fidelity PCR Buffer met MgCl ₂ 10x	20	1x
dNTP's (10 mM)	4	200 µM
Therm reclone f Sall (20 µM)	4	0,4 µM
Therm reclone r PstI (20 µM)	4	0,4 µM
Plasmide (aan beads)	20	
High Fidelity PCR enzyme mix (5 U/µl)	2	10 U
Totaal	200	

Tabel III.6: PCR-programma voor de amplificatie van geselecteerde varianten.

Stap	Temp. (°C)	Tijd
1	94	3 min
2	94	30 sec
3	52	30 sec
4	72	110 sec
5	72	10 min
6	12	∞

35x

Het reactiemengsel werd verdeeld in aliquots van telkens 50 µl.

GELEXTRACTIE

Geamplificeerde variantgenen werden opgezuiverd via geleextractie. Hiervoor werd een 1 % agarosegel met 2 µg/ml kristalviolet bereid. Aan het staal werd kristalviolet-laadbuffer (6x) toegevoegd. De elektroforese vond plaats in TAE-buffer (1x) bij 110 V gedurende 15 min. De migratie van het DNA is visueel waar te nemen, in tegenstelling tot visualisatie met ethidiumbromide waarbij schadelijk UV-licht noodzakelijk is. Het correcte fragment werd uit de gel gesneden waarna het DNA geïsoleerd werd volgens de procedure van de *Gel Extraction Kit* (Qiagen).

AANMAAK VECTOR-BACKBONE

Na geleextractie werden de variantgenen geligeerd met de pASK-Therm-vector-*backbone*. De *backbone* werd aangemaakt via inverse PCR met het reactiemengsel in tabel III.7 en bijbehorend *touchdown*-temperatuursprogramma (tabel III.8) om amplificatie van niet-specifieke en verkorte vectorsequenties te vermijden.

Tabel III.7: Reactiemengsel voor de aanmaak van de vector-*backbone*.

Reagens	Volume (µl)	Finale concentratie
mQ water	142	
HF-Buffer 5x	40	1x
dNTP's (10 mM)	4	200 µM
Therm reclone f PstI (20 µM)	4	0,4 µM
Therm reclone r Sall (20 µM)	4	0,4 µM
pASK-Therm ⁺ (1 ng/µl)	4	2 ng/100 µl
Phusion-polymerase (2 U/µl)	2	4 U
Totaal	200	

Tabel III.8: *Touchdown* temperatuursprogramma voor PCR-amplificatie van vector-*backbone*.

Stap	Temp	Tijd	
1	98 °C	1 min	
2	98 °C	10 sec	
3	66 °C	10 sec	10x; dT= -0,5 °C
4	72 °C	90 sec	
5	98 °C	1 min	
6	62 °C	10 sec	30x
7	72 °C	90 sec	
8	72 °C	5 min	
9	12 °C	∞	

DIGESTIE

Zowel in de *forward* als de *reverse* primer voor amplificatie van polymerase-genen en vector-*backbone* is er een restrictieplaats voorzien voor restrictie-enzymen Sall en PstI (tabel III.1). Het geextract met geselecteerde en geamplificeerde polymerase-genen werd geknipt met Sall en PstI (beiden 30 U) in buffer O gedurende twee uur bij 37 °C. Dezelfde digestie werd uitgevoerd met de vector, waarbij extra DpnI (10 U) werd toegevoegd om parentaal, gemethyleerd DNA te knippen.

LIGATIE

Variantgenen en vector-*backbone* werden door de complementaire uiteindes geligeerd met T4-DNA-ligase (10 U). Het mengsel werd vier uur geïncubeerd bij kamertemperatuur, gevolgd door een hittestap op 70 °C gedurende vijf min om T4-DNA-ligase te denatureren. Het ligatieproduct werd opgezuiverd met een ethanolzoutprecipitatie. Hiervoor werd 1/10 volume natriumacetaat (3 M) en 2,5 volume 100 % ethanol toegevoegd aan het ligatiemengsel om het DNA te precipiteren. Na één uur incubatie bij kamertemperatuur werd het DNA neergeslaan met centrifugatie (20 min, 13,4 krpm, Eppendorf minispin). Na verwijderen van het supernatans werd de pellet gewassen met 1 ml 70 % ethanol en opnieuw neergeslaan door centrifugatie (20 min, 13,4 krpm). De pellet werd geresuspendeerd in 5 µl Tris-HCl (10 mM, pH 7,5).

TRANSFORMATIE

Het resultaat na ligatie is de volledige vector, dat vervolgens opgenomen werd in *E. cloni*-cellen (50 µl) via elektroporatie (1700 V) met een Eporator (Eppendorf). Door 950 µl LB toe te voegen aan de cellen en ze 45 min te incuberen bij 37 °C, recupereerden de getransformeerde *E. cloni*-cellen van de elektroporatie en bouwden antibioticaresistentie op. Na incubatie werd 10 µl verdeeld op een agarbodem met ampicilline (100 µg/ml). De plaat werd overnacht geïncubeerd bij 37 °C, waarna individuele kolonies waar te nemen zijn.

KOLONIE-PCR

Individuele kolonies werden geanalyseerd met een kolonie-PCR. Het reactiemengsel hiervoor staat weergegeven in tabel III.9, evenals het temperatuursprogramma (tabel III.10). Als matrijs werden cellen van een kolonie toegevoegd, met een steriele tandenstoker, aan het reactiemengsel. Cellen werden gelyseerd bij een initiële denaturatiestap van 15 min op 95 °C, zodat de plasmiden beschikbaar zijn voor het reactiemengsel. Als positieve controles werd aan één reactiemengsel 1 ng plasmide pASK-Therm⁺ toegevoegd in plaats van een kolonie, aan een ander reactiemengsel 1 ng plasmide pASK-Therm⁻.

Tabel III.9: Reactiemengsel per kolonie.

Reagens	Volume (µl)	Finale concentratie
mQ water	20,8	
DreamTaq Green	2,5	1x
Buffer 10x		
dNTP's (10 mM)	0,5	200 µM
pASK-IBA-f (20 µM)	0,5	0,4 µM
pASK-IBA-r (20 µM)	0,5	0,4 µM
DreamTaq-polymerase (5 U/µl)	0,2	1 U
Totaal	25 µl	

Tabel III.10: Temperatuursprogramma kolonie-PCR.

Stap	Temp.	Tijd
1	95 °C	15 min
2	95 °C	30 sec
3	52 °C	30 sec
4	72 °C	260 sec
5	72 °C	5 min
6	12 °C	∞

30x

Met gelektroforese werd nagegaan of de klonen een variant van het DNA-polymerase ThermoTM bevatten. Om de aanrijking van actieve varianten tijdens CST na te gaan, werden kolonie-PCR-producten van de controle-bibliotheek met de verhouding 1/100 (Therm⁺/Therm⁻) geknipt met SacII om onderscheid te maken tussen beide varianten. Therm⁺ bevat één restrictieplaats voor SacII en geeft na digestie twee fragmenten (465 bp en 2092 bp). Therm⁻ heeft een extra restrictieplaats voor SacII en geeft drie fragmenten (465 bp, 781 bp en 1313 bp). Elke reactie bestond uit 10 µl kolonie PCR-product, 18 µl steriel water, 2 µl buffer B

en 1-2 μ l SacII. Alle reacties werden gedurende twee uur op 37 °C geïncubeerd en vervolgens geladen op een 1 % agarosegel.

HIGH THROUGHPUT POLYMERASE-ACTIVITEITSTEST (PAA)

Na een aantal selectierondes met CST werden individuele kolonies van de CST-*output* gescreend op hun activiteit in een *high throughput* (96 *well*-plaat) polymerase-activiteitstest (PAA). Kolonies werden overnacht opgegroeid in een 96 *well*-plaat met 400 μ l LB met ampicilline bij 37 °C. 20 μ l van de startculturen werd overgebracht in 400 μ l vers LB met ampicilline en ongeveer drie uur geïncubeerd bij 37 °C. Hierna werden de culturen geïnduceerd met AHTC (0,2 μ g/ml) en verder overnacht geïncubeerd bij 25 °C. Na inductie werd de 96 *well*-plaat 15 min afgedraaid (4000 rpm, SL16R centrifuge) en werd de pellet geresuspendeerd in 50 μ l Thermopol-buffer (1x). De cellen werden vervolgens gelyseerd met een hittebehandeling (20 min bij 80 °C) en het lysaat werd overgebracht in een nieuwe 96 *well*-plaat na centrifugatie (10 min, 4000 rpm). Dit lysaat kan rechtstreeks toegevoegd worden aan het reactiemengsel (tabel III.11).

Tabel III.11: Reactiemengsel PAA per *well*.

Reagens	Volume (μ l)	Finale conc
mQ water	15,5	
Pfu-buffer 10x	2,5	1x
Elk dNTP (2,5 mM)	1	100 μ M
Gebiotinyleerde primer (1 μ M)	1	40 nM
Oligo (10 μ M)	1	400 nM
Totaal	24	

Tabel III.12: Extensieprogramma voor PAA.

Stap	Temperatuur (°C)	Tijd (min)	
1	94	1	5x
2	50	1	
3	65	1	

dATP en dTTP kunnen vervangen worden door respectievelijk Asp-dAMP en Asp-dTMP, elk 100 μ M, om de incorporatie-activiteit van de variant van het polymerase na te gaan voor aspartaat-nucleotiden. Het uiteindelijk volume van het reactiemengsel bedraagt 25 μ l na het toegevoegd lysaat (1 μ l) en de finale concentraties zijn berekend op basis van het totaalvolume van 25 μ l.

Vooraleer het polymerase aan dit reactiemengsel werd toegevoegd, werd een incubatiestap van vijf min op 94 °C voorzien om het matrijs-oligonucleotide te hybridiseren aan de gebiotinyleerde primer. Na het toevoegen van het polymerase werd een kort extensieprogramma gevolgd (tabel III.12) om de primer te verlengen.

Een 96 *well*-plaat gecoat met neutravidine werd driemaal gewassen met PBST (125 mM NaCl, 16,6 mM Na₂HPO₄, 8,43 mM NaH₂PO₄ en 0,2 % (v/v) Tween 20, pH 7,2). Elk reactiemengsel werd vervolgens overgebracht in deze plaat, in 150 μ l PBST zodat de gebiotinyleerde primer kon binden aan neutravidine gedurende 30 min op kamertemperatuur. Ongebonden producten werden verwijderd door driemaal te wassen met PBST. De matrijs werd gedenatureerd en verwijderd door incubatie met

100 mM NaOH gedurende 30 sec, waarna een neutrale pH bekomen werd door te wassen met PBST. Vervolgens werd de probe (3 pmol in 150 µl PBST per reactie) toegevoegd en gebonden aan de verlengde primer door incubatie gedurende 20 min. Ongebonden probe werd weggewassen met PBST. De probe voor A5 bindt via een intermediair oligonucleotide (InterA) aan de verlengde primer. Het anti-probe antilichaam, geconjugeerd met *horseradish*-peroxidase (15 ng in 150 µl PBST per reactie), werd gebonden tijdens een incubatiestap van 60 min. Ongebonden antilichaam werd verwijderd door drie wasstappen met PBST. Tot slot gebeurde detectie van de verlengde primer door de polymerase-variant door toevoegen van een chromogeen peroxidasesubstraat, namelijk 1-Step ultra TMB-ELISA (Fisher). Na incubatie van ongeveer 3 min werd de kleuring gestopt met 1N HCl, waarna de absorbantie bij 450 nm van elke *well* werd gemeten (TECAN Safire2).

OPZUIVERING VAN THERMINATORTM-VARIANTEN

Actieve varianten van vingerdomeinbibliotheek F van het DNA-polymerase TerminatorTM waargenomen met PAA, werden opgezuiverd om de mogelijke aanwezigheid van cellulaire natuurlijke nucleotiden in de PAA uit te sluiten en voor een meer betrouwbare test op basis van activiteit voor incorporatie van Asp-dAMP en Asp-dTMP. Hiervoor werd de variant opgegroeid in 100 ml LB op 37 °C tot OD₆₀₀ 0,6 - 0,8. Vervolgens werden de culturen geïnduceerd met AHTC (0,2 µg/ml) en overnacht geïncubeerd bij 25 °C. Cellen werden geoogst met centrifugatie (10 min, 6000 rpm, Eppendorf Centrifuge 5810R) en geresuspendeerd in 50 mM fosfaatbuffer (Na₂HPO₄-NaH₂PO₄), 1 M MgCl₂ (1 mM) en 20 U DNase. De suspensie werd bevroren gedurende 20 min op -80 °C en ontdooid bij 37 °C. Lysozyme en Triton-X-100 (0,2 %) werden vervolgens toegevoegd aan de resuspensie en 10 min geïncubeerd bij kamertemperatuur voor sonicatie (2 Hertz, continue *pulse*, 2 maal 2 min, Branson Sonifier 450). Na centrifugatie (15 min, 6000 rpm op 4 °C) werd het supernatans overgebracht en 20 min behandeld op 80 °C. Opnieuw werd het supernatans overgebracht na een centrifugatiestap (15 min, 6000 rpm op 4 °C) en werd imidazool (10 mM) en Nikkel (Ni²⁺)-NTA-hars toegevoegd. Gedurende 1h (4 °C, roterend platform) werden proteïnen met His₆-tag gebonden aan het hars. Het hars werd neergeslaan met centrifugatie (10 min, 4000 rpm op 4 °C), overgebracht op een kolom en gewassen met 25 ml wasbuffer (50 mM fosfaatbuffer, 10 mM imidazool). Gebonden proteïnen werden geëluëerd na toevoeging van 600 µl elutiebuffer (50 mM fosfaatbuffer, 300 mM imidazool). Opgezuiverde polymerasen werden overgebracht in reactiebuffer (Thermopol-buffer (1x)) met *PD MINITRAP G-25* gelfiltratiekolommen volgens het protocol van de fabrikant.

SDS-PAGE

De opzuivering van varianten van het DNA-polymerase Terminator™ werd gecontroleerd met natriumdodecylsulfate-polyacrylamidegelelektroforese (SDS-PAGE). De 6 % gel bestaat uit 30 % acrylamide/bisacrylamide, SDS, Tris-HCl, tetramethyleenethyleendiamine (TEMED) en ammoniumpersulfaat (APS). Elektroforese werd eerst gelopen bij 150V gedurende 15 min, gevolgd door 200V gedurende 30 tot 45 min. Als lengtemerker werd PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) gebruikt. Het polymerase bevindt zich op ongeveer 90 kDa.

INCORPORATIE TEST

De opgezuiverde, actieve varianten van het DNA-polymerase Terminator™ werden bestudeerd met een specifieke incorporatietest waarbij de verschillende extensieproducten, aan een radioactief-gemerkte primer, met één-nucleotideresolutie bestudeerd kunnen worden. Als eerste gebeurde de radioactieve merking van de te verlengen primer door het reactiemengsel in tabel III.13 gedurende 4 uur te incuberen op 37 °C.

Tabel III.13: Reactiemengsel voor het radioactief merken van Tag1 primer met ³³ATP.

Reagens	Volume (µl)	Finale concentratie
mQ water	16,42	
T4-PNK-buffer 10x	2,5	1x
Tag1 primer (48 µM)	2,08	4 µM
T4 PNK (10 U/µl)	1,5	15 U
³³ ATP (3000 Ci/mmol)	2,5	300 Ci/mmol
Totaal	25	

Na de incubatiestap werd het T4 polynucleotidekinase gedenatureerd (75 °C, 10 min) en volgde opzuivering van de gemerkte primer met een *Microspin G25* (GE Healthcare, VS kolom). Het eluaat werd toegevoegd aan gedestilleerd water en matrijs T46 (1 µM), voor selectie op incorporatie met Asp-dAMP, of matrijs T47 (1 µM), voor selectie op incorporatie met Asp-dTMP. Het mengsel werd geïncubeerd gedurende 5 min bij 95 °C en vervolgens traag afgekoeld tot op kamertemperatuur voor hybridisatie van primer en matrijs. Hierna werd Thermopol-buffer (1x) toegevoegd.

De elongatie van de gemerkte primer gebeurde in het reactiemengsel in tabel III.14, tijdens incubatie op 72 °C. Na 15, 30 en 60 min, werd telkens 2,5 µl van elk reactiemengsel toegevoegd aan 5 µl *quenching*-buffer (0,05 % bromophenol blue,

50mM EDTA, TBE-buffer, 0,05 % xyleen cyanol en 95 % formamide) om de elongatiereactie te stoppen. Na 5 min op 95 °C werden de stalen afgekoeld op ijs.

Tabel III.14: Reactiemengsel voor de elongatie van de gemerkte primer.

Reagens	Volume (µl)	Finale concentratie
mQ water	5,1	
Nucleotide (50 µM)/Asp-nucleotide (500 µM)	0,5	2,5 µM/25 µM
Thermopol-buffer 10x	0,9	1x
Polymerase	1	
Primer/matrijs complex (500 nM)	2,5	125 nM
Totaal	10	

Reacties met verschillende nucleotiden werden uitgevoerd. Dit kan met dATP (50 µM) als positieve controle, geen nucleotiden als negatieve controle en Asp-dAMP (500 µM) voor matrijs T46. Voor matrijs T47 is dit met dTTP (50 µM) als positieve controle, geen nucleotiden als negatieve controle en Asp-dTMP (500 µM). Ook kan er extra nog Mn^{2+} (1 mM) toegevoegd worden zoals bij CST, voor een mogelijks meer versoepelde incorporatie met Asp-dAMP en Asp-dTMP.

De verschillende extensieproducten werden geanalyseerd op een denaturerend 20 % polyacrylamidegel. Hiervoor werd 32 g ureum opgelost in 37,5 ml Accugel (acrylamide:bisacrylamide 19:1) en 7,5 ml TBE (Tris-boraat-EDTA) buffer (10x) gedurende 30 min (50 °C). Vervolgens werd tot 75 ml aangelengd met gedestilleerd water. Na het toevoegen van 600 µl APS 10 % en 30 µl TEMED, werd de gel gegoten tussen twee glasplaten (gewassen met water, ethanol en behandeld met een silylatiereagens). Na polymerisatie werd de gel gedurende 30 tot 45 min geëquilibreerd op 60 W. Hierna werd 1-5 µl van elk staal geladen op de gel. Als controle werd de onverlengde primer geladen. Stalen werden gedurende 4h gescheiden aan 60 W. Voor visualisatie werden gels gescand met een *Cyclone Phosphorimager* (Perkin Elmer). Signalen werden gekwantificeerd met Optiquant software.

IV. RESULTATEN EN CONCLUSIES

Een mutantenbibliotheek van DNA-polymerase Terminator™ in een bepaald deel van het vingerdomein, genaamd bibliotheek F, werd ter beschikking gesteld (aangemaakt door B. Bauwens). Selectie van deze vingerdomeinmutanten met een verhoogde activiteit voor de incorporatie van de artificiële nucleotiden Asp-dAMP en Asp-dTMP, vergeleken met het wild-type DNA-polymerase Terminator™, vond plaats met de techniek *Compartmentalized Self-Tagging* (CST). Vooraleer de selectie op actieve varianten met CST kon plaatsvinden, werd CST geoptimaliseerd om aan eerder vastgestelde problemen tegemoet te komen.

OPTIMALISATIE CST-PROCEDURE

INVLOED CELBEREIDING

Voorgaande CST-experimenten gaven aan dat de selectie voor de incorporatie met de artificiële nucleotiden Asp-dAMP en Asp-dTMP tijdens CST mogelijks wordt bemoeilijkt door de aanwezigheid van cellulaire nucleotiden in emulsiecompartimenten. De natuurlijke nucleotiden kunnen ook gebruikt worden om de gebiotinyleerde primer te verlengen, wat tot vals-positieve resultaten kan leiden. Een mogelijke oplossing hiervoor is een langere groei bij 37 °C of een overnachting van geïnduceerde culturen bij 4 °C om de cellulaire nucleotidevoorraad uit te putten. Deze lage temperatuur zorgt bovendien voor minimale vernietiging van de geïnduceerde cellen en minimaal verlies van de activiteit van het polymerase (Pinheiro *et al.* 2014).

Om achtergrondaanrijking door de aanwezigheid van cellulaire dNTP's tijdens CST te karakteriseren, werd gebruik gemaakt van controle-bibliotheeken van cellen met actief polymerase (Therm⁺) en inactief polymerase (Therm⁻) in een verhouding 1/100. De cellen werden bereid volgens twee condities: 1) groei bij 37 °C tot 6 uur na inductie met AHTC, en 2) groei bij 37 °C tot 3 uur na inductie gevolgd door overnacht bewaring bij 4 °C. CST-aanrijking van het actief polymerase in de controle-bibliotheek werd bepaald met behulp van stalen met toegevoegde natuurlijke nucleotiden (100 µM) (+dNTP) en zonder (-dNTP) (tabel IV.1), en door analyse met SacII-digestie. Actief polymerase Therm⁺ geeft na SacII-digestie twee fragmenten, terwijl inactief polymerase Therm⁻ drie fragmenten vertoont, waarna de aanrijking van actief polymerase eenvoudig berekend kan worden.

Tabel IV.1: Aanrijking bij een CST-ronde van actief polymerase Therm⁺ uit controle-bibliotheken van Therm⁺/Therm⁻ met verhouding 1/100 bij twee verschillende inductiecondities, in de aanwezigheid van toegevoegde dNTP's (100 µM) (+dNTP) en in de afwezigheid ervan (-dNTP).

	6h, 37 °C		3h, 37 °C en ON, 4 °C	
	+dNTP	-dNTP	+dNTP	-dNTP
Therm ⁺ /(Therm ⁺ + Therm ⁻)	14/27	18/26	16/26	13/21
Aanrijdingsfactor	52	69	62	62

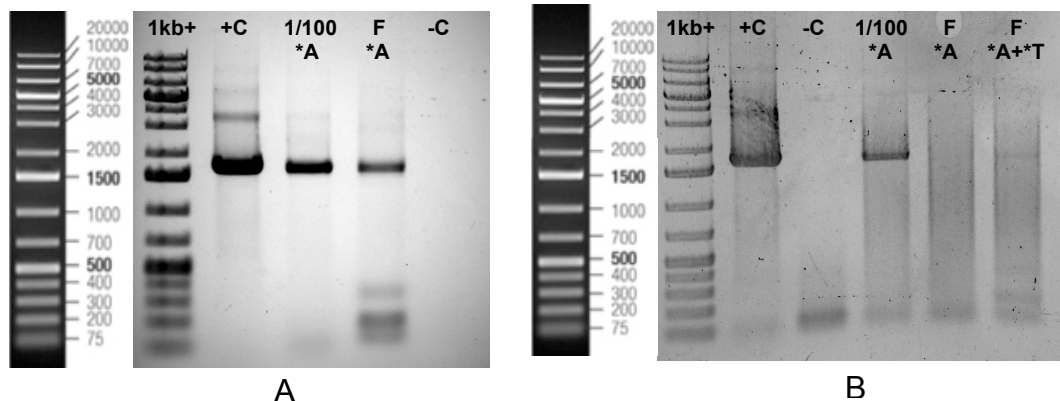
Bij beide condities was er na één CST-ronde een vrij hoge aanrijking (50- tot 70-voudig) van het actief polymerase, wat aantoont dat primerverlenging was opgetreden en gebonden plasmiden efficiënter werden geselecteerd. De aanrijking was evenwel onafhankelijk van toevoeging van dNTP's wat inbouw van aanwezige natuurlijke nucleotiden bevestigt, ook in meer uitgegroeide culturen of overnacht bij 4 °C bewaarde culturen. Eventuele verschillen in extensielengte bij aan- of afwezigheid van toegevoegde dNTP's bleef mogelijks onopgemerkt door onvoldoende selectiviteit bij het binden/wassen van primer-gebonden plasmiden. Daarom werd besloten de selectieve binding te testen en verder te optimaliseren (zie verder INVLOED WASSTAPPEN). Hierbij werd geopteerd om CST te starten na zes uur inductie op 37 °C.

AMPLIFICATIE VAN GESELECTEERDE VARIANTEN

Aanvankelijk gebeurde de PCR-amplificatie van het polymerase-gen op de geselecteerde plasmiden na CST met Phusion-polymerase, om zo over voldoende genetisch materiaal te beschikken, coderend voor polymerase-varianten met een verhoogde activiteit voor incorporatie van Asp-dAMP en Asp-dTMP.

PCR-amplificatie met het betrouwbare Phusion-polymerase, met 3'>5'-exonuclease-activiteit, verliep steeds correct voor de twee bibliotheken: 1) een controle-bibliotheek van 1/100 verhouding van Therm⁺ in Therm⁻, en 2) bibliotheek F, die bestaat uit vingerdomeinmutanten van DNA-polymerase TerminatorTM. De geselecteerde plasmiden na CST van beide bibliotheken gaven een duidelijk PCR-product op een 1 % agarosegel na PCR-amplificatie met Phusion-polymerase (**figuur IV.1A**). Bij latere experimenten was er echter geen duidelijk product meer waar te nemen en steeds een DNA-smeer (**figuur IV.1B**), zelfs bij de positieve

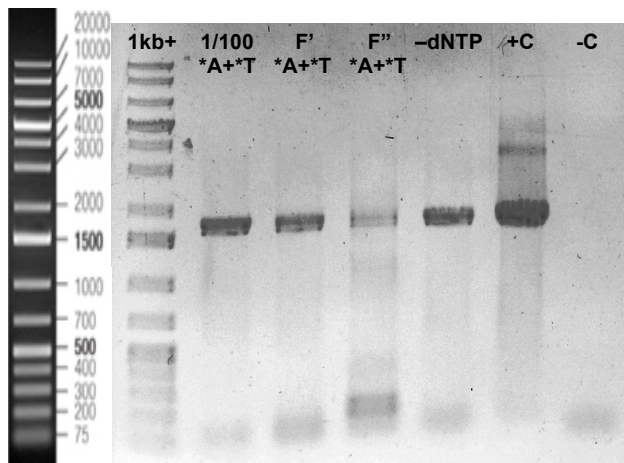
controle, om een onbekende reden. Hierdoor is goede gelextractie onmogelijk, waardoor de verdere stappen voor herklonering niet kunnen plaatsvinden.



Figuur IV.1: PCR-amplificatie van het polymerase-gen op geselecteerde plasmiden met Phusion DNA-polymerase. GeneRuler™ 1 kb plus (Thermo Scientific) werd als ladder gebruikt op een 1 % agarosegel. PCR-amplificatie van de positieve controle (+C) startte met 1 ng plasmide pASK-Therm i.p.v. geresuspendeerde *beads*. Aan de negatieve controle (-C) werd geen plasmide toegevoegd. De eerste 10 PCR-cycli volgden een *touchdown* temperatuursprogramma (dT=-0,5 °C), waarna 30 gewone PCR-cycli volgden. **A)** De PCR-amplificatie vanaf 10 µl geresuspendeerde *beads* van controle-bibliotheek 1/100 Therm⁺/Therm⁻ (1/100 *A) en bibliotheek F (F *A), beiden na selectie voor incorporatie van Asp-dAMP (*A) (100 µM), dGTP, dCTP en dTTP, gaf een eenduidig resultaat van 1695 bp met Phusion-polymerase. **B)** De PCR-amplificatie vanaf 10 µl geresuspendeerde *beads* van zowel controle-bibliotheek 1/100 Therm⁺/Therm⁻ (1/100 *A) en bibliotheek F (F *A), beiden na selectie voor incorporatie van Asp-dAMP (*A) (100 µM), dGTP, dCTP en dTTP, en bibliotheek F (F *A+*T) na selectie op incorporatie van Asp-dAMP (*A) (100 µM), Asp-dTMP (*T) (100 µM), dGTP en dCTP, gaf in latere experimenten een DNA-smeer en geen duidelijke band van 1695 bp met Phusion-polymerase.

De gebruikte *beads* hebben geen effect op de opbrengst of betrouwbaarheid van de PCR-amplificatie (Pinheiro *et al.* 2014) en aangezien ook bij de positieve controle, waarbij plasmide i.p.v. geresuspendeerde *beads* werd toegevoegd, een DNA-smeer waar te nemen was (**figuur IV.1B**), werden andere DNA-polymerasen getest voor PCR-amplificatie. Amplificatie van geselecteerde varianten met DreamTaq-polymerase in plaats van Phusion-polymerase gaf een duidelijk product waardoor de herklonering wel kan plaatsvinden. Zoals bleek uit DNA-sequencing (LGC Genomics) traden er bij herklonering door de lagere accuraatheid van DreamTaq-polymerase echter meer misincorporaties en deleties op, in het laatste geval met een *frameshift* tot gevolg.

Dit probleem werd uiteindelijk opgelost door gebruik te maken van *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (Thermo Scientific) voor de PCR-amplificatie van de geselecteerde varianten. Met dit polymerase werd zowel een eenduidig product waargenomen op een 1 % agarosegel (**figuur IV.2**) als correcte DNA-sequenties. Verdere CST-procedures werden uitgevoerd met *High Fidelity PCR Enzyme Mix* (HF-polymerase).

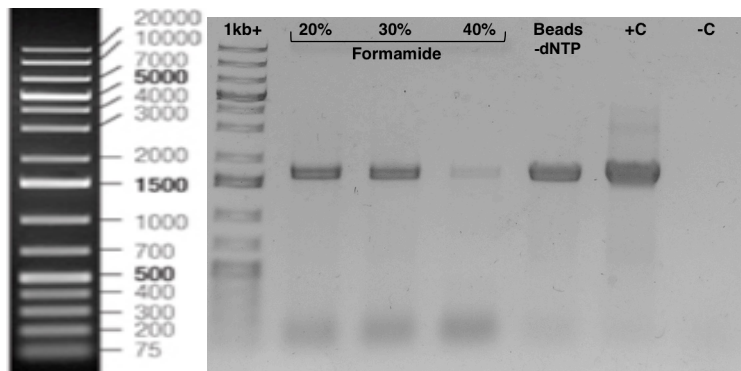


Figuur IV.2: PCR-amplificatie van het polymerase-gen op geselecteerde plasmiden met High Fidelity PCR Enzyme Mix. GeneRuler™ 1 kb plus (Thermo Scientific) werd als ladder gebruikt op een 1 % agarosegel. PCR-amplificatie van de positieve controle (+C) startte met 1 ng plasmide pASK-Therm i.p.v. geresuspendeerde *beads*. Aan de negatieve controle (-C) werd geen plasmide toegevoegd. Het aantal PCR-cycli was 35. De PCR-amplificatie vanaf 10 μ l geresuspendeerde *beads* van controle-bibliotheek 1/100 Therm⁺/Therm⁻ (1/100 *A+*T), bibliotheek F na een eerste CST-ronde (F' *A+*T) en na een tweede CST-ronde (F'' *A+*T), alle drie na selectie voor incorporatie van Asp-dAMP (*A) (100 μ M), Asp-dTMP (*T) (100 μ M), dCTTP en dGTP, en tot slot van een controle-bibliotheek 1/100 Therm⁺/Therm⁻ zonder toegevoegde nucleotiden (-dNTP), gaf een eenduidig resultaat van 1695 bp met High Fidelity PCR Enzyme Mix.

INVLOED WASSTAPPEN

Een cruciale stap in CST is selectie van plasmiden op basis van primerverlenging die de affiniteit van de gebiotinyleerde primer voor het plasmide verhoogt en binding aan de *beads* versterkt. Minimaliseren van niet-specifieke en laag-affiene bindingen van plasmiden aan de *beads* gebeurt bij het wassen van de *beads*. In het oorspronkelijk protocol (Pinheiro *et al.* 2014) gebeurt de eerste wasstap met BWBS (hoge zoutconcentratie), gevolgd door een wasstap met TBT2 (lage zoutconcentratie) en tot slot een wasstap met TBT2 + 20 % formamide. Deze laatste wasstap met formamide is in het bijzonder belangrijk omdat formamide dsDNA destabiliseert. Onverlengde primers mogen in deze buffer niet langer binden aan het plasmide waarbij het plasmide wordt weggewassen, waardoor achtergrond van niet-specifieke bindingen gereduceerd wordt. Ter controle werd een PCR uitgevoerd bij elke wasstap, waaruit bleek dat er bij elke wasstap plasmiden met niet of onvoldoende verlengde primer werden weggewassen. Toch leken bovenvermelde drie wasstappen onvoldoende selectief en werden een vierde en vijfde strengere wasstap onderzocht om achtergrond verder te reduceren: TBT2 + 30 % formamide en TBT2 + 40 % formamide.

Om eventuele verschillen in extensielengte bij aan- of afwezigheid van toegevoegde natuurlijke nucleotiden na te gaan, werden de vijf wasstappen uitgevoerd op een controle-bibliotheek van een 1/100 verhouding van Therm⁺ in Therm⁻ (6h groei op 37 °C na inductie, PCR-amplificatie met *High Fidelity PCR Enzyme Mix*), zonder toegevoegde nucleotiden (-dNTP). Uit **figuur IV.3** bleek dat door wasstap 4 (TBT2 + 30 % formamide) en in beperkte mate door wasstap 5, laag-affiene bindingen van plasmiden aan de *beads* weggewassen werden, en de selectiviteit verhoogt.

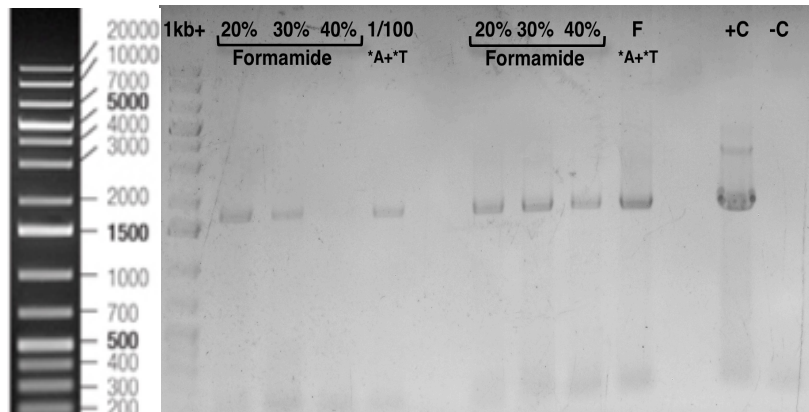


Figuur IV.3: PCR-amplificatie van het plasmide-gecodeerde polymerase-gen na vijf wasstappen voor controle-bibliotheek 1/100 Therm⁺/Therm⁻ zonder toegevoegde dNTP's. GeneRuler™ 1 kb plus (Thermo Scientific) werd als ladder gebruikt op een 1 % agarosegel. PCR-amplificatie van de positieve controle (+C) startte met 1 ng plasmide pASK-Therm i.p.v. geresuspendeerde *beads*. Aan de negatieve controle (-C) werd geen plasmide toegevoegd. Het aantal PCR-cycli was 35 met HF-polymerase. Voor de 1/100 verhouding van Therm⁺/Therm⁻ (1/100) zonder toegevoegde dNTP's was PCR-product te zien op plasmiden aanwezig in de drie wasvloeistoffen met verschillende formamideconcentraties en die nog gebonden waren aan de *beads*. PCR-amplificatie startte vanaf 10 µl geresuspendeerde *beads* en vanaf 10 µl van elke wasvloeistof na ontzouting met ultrafiltratiekolommen (Vivacon 500, Sartorius AG) volgens instructies van de fabrikant.

Ondanks de meer stringente wasstappen, bleven na selectie met CST nog steeds plasmiden gebonden aan de *beads* van de controle-bibliotheek waaraan geen dNTP's toegevoegd werden. Er dient daarom voorzichtig gehandeld te worden met conclusies, aangezien de cellulaire nucleotidevoorraad bij celbereiding (voorlopig) niet volledig uitgeput raakt.

Het effect van de strengere wasstappen werd ook nagegaan op twee bibliotheken, elk onderworpen aan één CST-ronde: 1) een controle-bibliotheek van 1/100 verhouding van Therm⁺ in Therm⁻, en 2) bibliotheek F, die bestaat uit vingerdomeinmutanten van DNA-polymerase Therminator™. Beide bibliotheken ondergingen selectie met artificiële nucleotiden Asp-dAMP en Asp-dTMP en natuurlijke nucleotiden dGTP en dCTP, elk 100 µM. Uit **figuur IV.4** bleek dat ook bij elke wasstap plasmiden weggewassen werden en er toch nog steeds plasmiden aan de *beads* gebonden bleven. De vijf opeenvolgende wasstappen, waarin de

concentratie aan formamide gradueel verhoogd werd, zorgden in principe voor een meer betrouwbare selectie van plasmiden op basis van primerverlenging.



Figuur IV.4: PCR-amplificatie van het plasmide-gecodeerde polymerase-gen na vijf wasstappen voor 1/100 Therm⁺/Therm⁻ en voor bibliotheek F. GeneRuler™ 1 kb plus (Thermo Scientific) werd als ladder gebruikt op een 1 % agarosegel. PCR-amplificatie van de positieve controle (+C) startte met 1 ng plasmide pASK-Therm i.p.v. geresuspendeerde *beads*. Aan de negatieve controle (-C) werd geen plasmide toegevoegd. Het aantal PCR-cycli was 35. Voor de controle-bibliotheek met verhouding 1/100 van Therm⁺/Therm⁻ (1/100 *A+*T) en voor bibliotheek F (F *A+*T), beiden na selectie voor incorporatie van Asp-dAMP (*A) (100 µM), Asp-dTMP (*T) (100 µM), dCTP en dGTP, was telkens PCR-product te zien op plasmiden aanwezig in de drie wasvloeistoffen met verschillende formamideconcentraties en die nog gebonden waren aan de *beads*. PCR-amplificatie startte vanaf 10 µl geresuspendeerde *beads* en vanaf 10 µl van elke wasvloeistof na ontzouting met ultrafiltratie (Vivacon 500, Sartorius AG) volgens instructies van de fabrikant.

Het PCR-product van de plasmiden gebonden aan de *beads* voor de 1/100 verhouding van Therm⁺ in Therm⁻ werd gekloond en bleek bij analyse een hogere aanrijdingsfactor te hebben voor actief polymerase Therm⁺ na deze vijf wasstappen (aanrijdingsfactor 76) t.o.v. een eerder uitgevoerde CST-procedure met de oorspronkelijke drie wasstappen (aanrijdingsfactor 52). Het PCR-product van bibliotheek F werd gekloond en verder onderworpen aan nogmaals twee selectierondes met CST (telkens na 6h te groeien op 37 °C na inductie, selectie met vijf wasstappen en PCR-amplificatie met *High Fidelity PCR Enzyme Mix*).

SELECTIE VOOR INCORPORATIE VAN ASP-DAMP EN ASP-DTMP

PAA-ANALYSE MET LYSAAT

Op basis van vorige experimenten, werd een CST met drie selectierondes uitgevoerd op bibliotheek F, die bestaat uit vingerdomeinmutanten van DNA-polymerase Thermator™, voor de incorporatie van Asp-dAMP (100 µM), Asp-dTMP (100 µM), dCTP (100 µM) en dGTP (100 µM). De cellen die bibliotheek F bevatten, groeiden op 37 °C gedurende 6h na inductie met AHTC, selectie van plasmiden gebeurde met de vijfvoudige wasprocedure en PCR-amplificatie van de geselecteerde plasmiden gebeurde met *High Fidelity PCR Enzyme Mix*.

Voor controle van elke nieuwe selectieronde werd een nieuwe controle-bibliotheek van cellen met actief polymerase (Therm⁺) en inactief polymerase (Therm⁻) in een verhouding 1/100 bereid. Ook bij deze controle-bibliotheken vond de selectie steeds plaats onder dezelfde condities als bibliotheek F (Asp-dAMP (100 µM) en Asp-dTMP (100 µM), 6h groei op 37 °C na inductie, vijf wasstappen en PCR-amplificatie met HF-polymerase). De waargenomen aanrijking van actief polymerase Therm⁺ in elke controle-bibliotheek Therm⁺/Therm⁻ met 1/100 verhouding na SacII-digestie is weergegeven in tabel IV.2.

Tabel IV.2: Aanrijking na elke CST-ronde van actief polymerase Therm⁺ uit de controle-bibliotheek Therm⁺/Therm⁻ met verhouding 1/100.

CST-ronde	Therm ⁺ /(Therm ⁺ + Therm ⁻)	Aanrijdingsfactor
CST-ronde 1	16/22	73
CST-ronde 2	11/24	46
CST-ronde 3	1/26	4

Voor elke CST-ronde is er gestart met een nieuwe controle-bibliotheek van cellen met actief polymerase Therm⁺ en inactief polymerase Therm⁻ in een 1/100 verhouding. Elke controle-bibliotheek onderging steeds selectie voor de incorporatie van Asp-dAMP (100 µM), Asp-dTMP (100 µM), dGTP (100 µM) en dCTP (100 µM).

Op basis van de controlestalen kan verwacht worden dat selectie gezorgd heeft voor een beduidende aanrijking van actieve varianten van het polymerase in CST-ronde 1 en 2, terwijl dit na CST-ronde 3 niet het geval was. Na *sequencing* (LGC genomics) van 12 afzonderlijke kolonies van bibliotheek F na drie CST-rondes, was echter waar te nemen dat de helft van deze kolonies afkomstig waren van het inactief polymerase Therm⁻, waarvan drie essentiële aspartaat-residu's gemuteerd zijn (D404A D540A D542A). Dit voorval is wellicht te wijten aan *carry-over* vanuit de

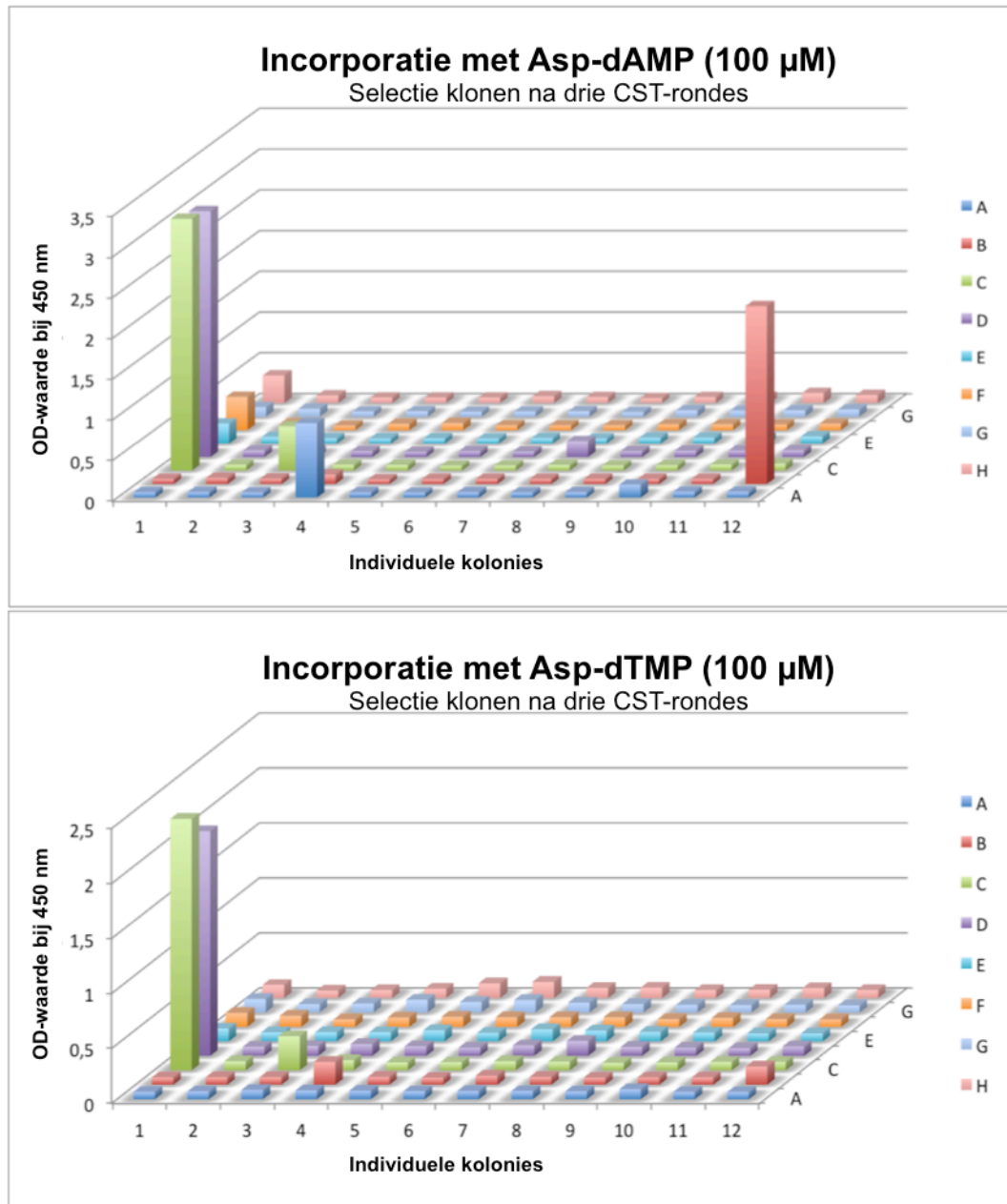
controle-bibliotheek. Een foute manipulatie verklaart mogelijks de lage aanrijksfactor.

Vóór deze resultaten bekend waren, werden reeds 88 willekeurig gekozen individuele kolonies, elk een vingerdomeinmutant van DNA-polymerase TerminatorTM, van bibliotheek F na drie CST-rondes opnieuw gegroeid, geïnduceerd en gelyseerd. Met deze 88 lysaten werd een polymerase-activiteitstest uitgevoerd, waarbij deze 88 individuele kolonies gescreend werden op hun activiteit voor de incorporatie van Asp-dAMP en de drie andere natuurlijke nucleotiden (elk 100 µM), en afzonderlijk voor de incorporatie van Asp-dTMP en de drie andere natuurlijke nucleotiden (elk 100 µM). Elke variant van het polymerase kreeg gedurende vijf temperatuurcycli de kans de gebiotinyleerde primer te verlengen, waarna de verlengde primers gebonden werden met het probe-antiprobe-complex en een kleurreactie als resultaat gaf. De gemeten absorbantie-waarden bij 450 nm van deze kleuring staan grafisch weergegeven in **figuur IV.5** voor elke kolonie afzonderlijk. De exacte waarden zijn waar te nemen in figuur 1 en 2 in **ADDENDUM (BIJLAGE B)**. Deze OD₄₅₀-waarde geeft verlenging van de gebiotinyleerde primer weer, aangezien kleuring enkel kan plaatsvinden als het probe-antiprobe-complex kan binden en deze binding gebeurt enkel als de gebiotinyleerde primer verlengd werd door het polymerase.

De PAA-screening werd ter controle ook uitgevoerd met 1) commercieel DNA-polymerase TerminatorTM (2 U/µl) en 2) wild-type DNA-polymerase TerminatorTM, namelijk cellen met actief polymerase (Therm⁺) waarbij het polymerase opgezuiverd werd met sonicatie en Ni²⁺-NTA-hars. In elke reactie werd bovendien een gelijke hoeveelheid cellen toegevoegd om te compenseren voor groeivariaties. Hierbij werd echter geen rekening gehouden met eventuele verschillen in expressieniveau tussen de cellen.

De PAA-screening leverde vijf actieve mutanten op uit vingerdomeinbibliotheek F geselecteerd op basis van een verbeterde incorporatie-efficiëntie met Asp-dAMP en/of Asp-dTMP vergeleken met het wild-type DNA-polymerase TerminatorTM. Klonen C3 en B12 waren positief voor verlenging van de primer met zowel Asp-dAMP als Asp-dTMP. Kloon A4 was positief voor de verlenging van de primer met Asp-dAMP, en klonen B4 en D8 voor verlenging met Asp-dTMP. Door het gebruik van celextracten is het ook hier niet uit te sluiten dat cellulaire nucleotiden werden gebruikt om de gebiotinyleerde primer te verlengen, wat tot vals-positieve resultaten kan leiden. Incorporatie van cellulaire nucleotiden werd vermeden door opzuivering van de vijf weerhouden polymerase-varianten. Van de vijf positieve klonen bleken

na opzuivering, analyse met SDS-PAGE, en na een nieuwe PAA-analyse met opgezuiverd polymerase, slechts twee varianten actief, namelijk B4 (met mutaties I488M, L489P, A553P) en B12 (met mutaties K487Q, I488M, K501R).



Figuur IV.5: Gemeten OD₄₅₀-waarden na verlenging van de primer met respectievelijk zes Asp-dAMP-nucleotiden (T6 matrijs) en vijf Asp-dTMP-nucleotiden (A5 matrijs) door lysaten van 88 individuele kolonies na drie selectierondes met CST. Aan de negatieve controles, klonen A1 en B1, werd geen polymerase toegevoegd. Aan klonen C1 en D1 werd het commercieel DNA-polymerase Therminator™ (2U) toegevoegd en aan klonen E1 t.e.m. H1 werd het wild-type polymerase toegevoegd. Aan de overige 88 klonen werd lysaat van individuele kolonies na drie selectierondes met CST toegevoegd. De OD₄₅₀-waarde is representatief voor de verlenging van de gebiotinyleerde primer met het overeenkomstig aspartaat-nucleotide (100 µM) en de drie natuurlijke nucleotiden (elk 100 µM), na een extensieprogramma van vijf cycli. Klonen A4, B4, B12, C3 en D8 werden uit deze PAA-screening geselecteerd als mogelijk actieve varianten van het DNA-polymerase Therminator™ voor de incorporatie van zowel Asp-dAMP als Asp-dTMP.

Simultaan aan vorig experiment, werd er nog een selectie uitgevoerd op bibliotheek F. Hiervoor werd CST uitgevoerd met slechts twee selectierondes voor de incorporatie van Asp-dAMP, Asp-dTMP, dGTP en dCTP (elk 100 μ M), verder onder dezelfde condities als vorig experiment. De waargenomen aanrijking van actief polymerase Therm⁺ in elke controle-bibliotheek Therm⁺/Therm⁻ met 1/100 verhouding is weergegeven in tabel IV.3.

Tabel IV.3: Aanrijking na elke CST-ronde van actief polymerase Therm⁺ uit de controle-bibliotheek Therm⁺/Therm⁻ met verhouding 1/100.

CST-ronde	Therm ⁺ /(Therm ⁺ + Therm ⁻)	Aanrijdingsfactor
CST-ronde 1	11/24	46
CST-ronde 2	1/26	4

Voor elke CST-ronde is er gestart met een nieuwe controle-bibliotheek van cellen met actief polymerase Therm⁺ en inactief polymerase Therm⁻ in een 1/100 verhouding. Elke controle-bibliotheek onderging steeds selectie voor de incorporatie van Asp-dAMP (100 μ M), Asp-dTMP (100 μ M), dGTP (100 μ M) en dCTP (100 μ M).

Ook hier was de lage aanrijdingsfactor in CST-ronde 2 waarschijnlijk te wijten aan *carry-over*. Niettemin werden 88 willekeurig gekozen individuele kolonies van bibliotheek F na twee CST-rondes voor screening opnieuw gegroeid, geïnduceerd en gelyseerd. Met deze 88 lysaten werd een polymerase-activiteitstest uitgevoerd, identiek aan vorig experiment. De gemeten absorptie-waarden bij 450 nm van de kleuring staan grafisch weergegeven in **figuur IV.6** voor elke kolonie afzonderlijk. De exacte waarden zijn waar te nemen in figuur 3 en 4 in **ADDENDUM (BIJLAGE B)**.

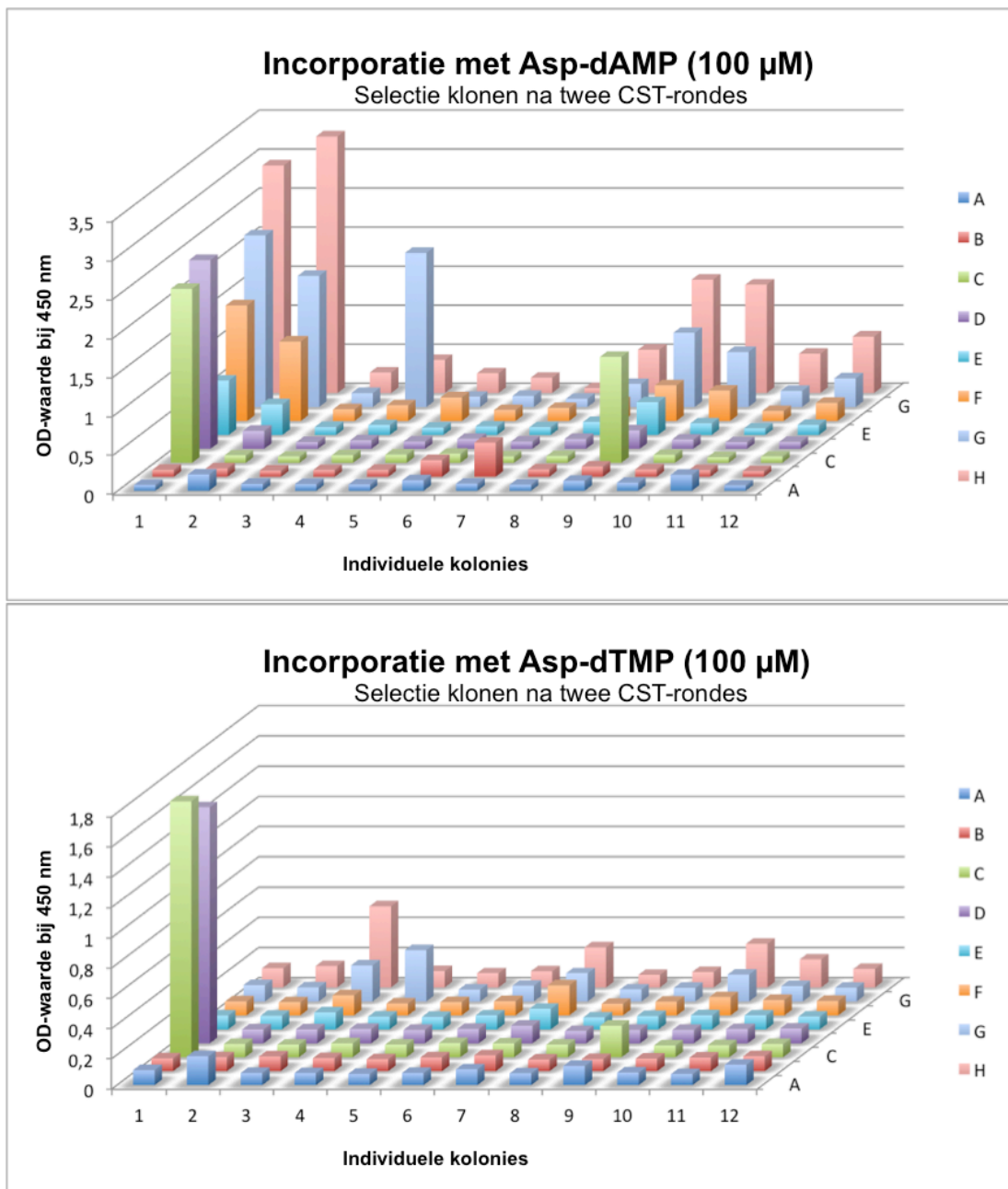
De gemeten OD-waarden bij 450 nm vertoonden een relatief grote variatie voor het wild-type DNA-polymerase TerminatorTM voor de incorporatie van Asp-dAMP. Daarom werd van deze vier OD₄₅₀-waarden een gemiddelde OD₄₅₀-waarde berekend, die 1,821 bedraagt. Aan de hand van deze OD₄₅₀-waarden werden zes klonen weerhouden met de hoogste waarden voor de gemeten absorptie bij 450 nm, vergeleken met het wild-type DNA-polymerase TerminatorTM. Klonen G4 en H2 waren positief voor zowel de incorporatie met Asp-dAMP als Asp-dTMP. Verder waren klonen H3, H10, A2 en C9 positief voor de incorporatie van Asp-dTMP. De selectie werd beperkt tot de zes meest actieve klonen, aangezien opzuivering en een nieuwe PAA-analyse tijdsroevend is. Hoewel er voor de incorporatie van Asp-dTMP nog een aantal klonen een verhoogde OD₄₅₀-waarde vertoonden (bijvoorbeeld kloon G3), werd een keuze gemaakt voor klonen met de hoogste OD₄₅₀-waarden voor de incorporatie met Asp-dTMP en gelijktijdig ook een hogere

OD₄₅₀-waarde vertoonden voor incorporatie met Asp-dAMP (waardoor G3 buiten de selectie viel).

Van de zes weerhouden klonen bleek na opzuivering van het polymerase en na een nieuwe PAA-analyse slechts één variant van het polymerase actief, namelijk G4 (met mutatie P410Q). Deze mutatie bevindt zich niet in het vingerdomein. Mogelijks is tijdens een CST-ronde het wild-type polymerase geselecteerd geweest en was er tijdens de PCR-amplificatie van het geselecteerde plasmide een puntmutatie opgetreden die verantwoordelijk zou kunnen zijn voor een verhoogde incorporatie-activiteit voor zowel Asp-dAMP als Asp-dTMP.

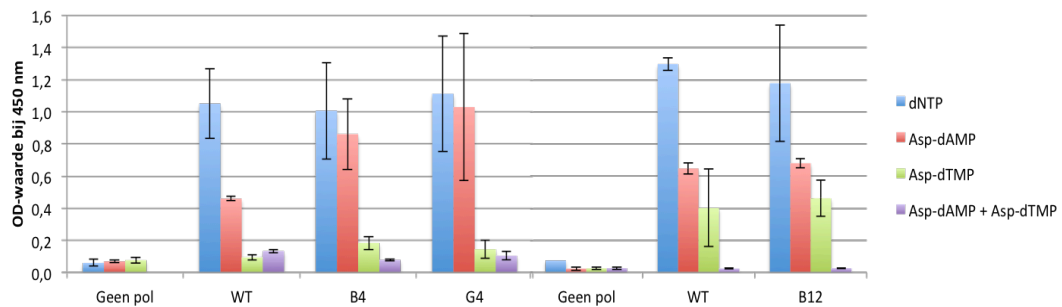
KARAKTERISATIE VAN GESELECTEERDE MUTANTEN

Op basis van vorige PAA-analyses met lysaten na respectievelijk drie en twee selectierondes met CST op vingerdomeinbibliotheek F, werden uiteindelijk drie actieve varianten van het DNA-polymerase TerminatorTM geselecteerd. De geselecteerde varianten B4 (I488M, L489P, A553P), B12 (K487Q, I488M, K501R) en G4 (P410Q) vertoonden een verhoogde activiteit voor de incorporatie van zowel Asp-dAMP als Asp-dTMP. De drie geselecteerde varianten werden opnieuw opgezuiverd om verlenging van de gebiotinyleerde primer met cellulaire nucleotiden, en zo vals-positieve resultaten in de assay, te vermijden. Bovendien konden na opzuivering gelijke enzymhoeveelheden, overeenkomstig met wild-type DNA-polymerase TerminatorTM, gebruikt worden, wat leidt tot een meer betrouwbare test van activiteit voor incorporatie van Asp-dAMP en Asp-dTMP. De opgezuiverde varianten B4, B12 en G4 werden onderworpen aan een nieuwe PAA-analyse, waarbij getest werd op verlenging van de primer door 1) Asp-dAMP, dCTP, dGTP en dTTP, 2) Asp-dTMP, dCTP, dGTP en dATP, 3) Asp-dAMP, Asp-dTMP, dCTP en dGTP, waarbij van telkens elk nucleotide 100 µM aanwezig was in de reactie en de eindconcentratie van elk polymerase 1 µg/ml bedroeg in elke reactie. De resultaten zijn grafisch weergegeven in **figuur IV.7**. De PAA-analyse met variant B12 werd op een ander tijdstip uitgevoerd en werd daarom vergeleken met het wild-type polymerase op hetzelfde tijdstip (rechts in **figuur IV.7**).



Figuur IV.6: Gemeten OD₄₅₀-waarden na verlenging van de primer met respectievelijk zes Asp-dAMP-nucleotiden (T6 matrijs) en vijf Asp-dTMP-nucleotiden (A5 matrijs) door lysaten van 88 individuele kolonies na twee selectierondes met CST. Aan de negatieve controles, klonen A1 en B1, werd geen polymerase toegevoegd. Aan klonen C1 en D1 werd het commercieel DNA-polymerase ThermoTaq™ (2U) toegevoegd en aan klonen E1 t.e.m. H1 werd het wild-type polymerase toegevoegd. Aan de overige 88 klonen werd lysaat van individuele kolonies na twee selectierondes met CST toegevoegd. De OD₄₅₀-waarde is representatief voor de verlenging van de gebiotinyleerde primer met het overeenkomstig aspartaat-nucleotide (100 µM) en de drie natuurlijke nucleotiden (elk 100 µM), na een extensieprogramma van vijf cycli. Klonen A2, C9, G4, H2, H3 en H10 werden uit deze PAA-screening geselecteerd als mogelijk actieve varianten van het DNA-polymerase ThermoTaq™ voor de incorporatie van zowel Asp-dAMP als Asp-dTMP.

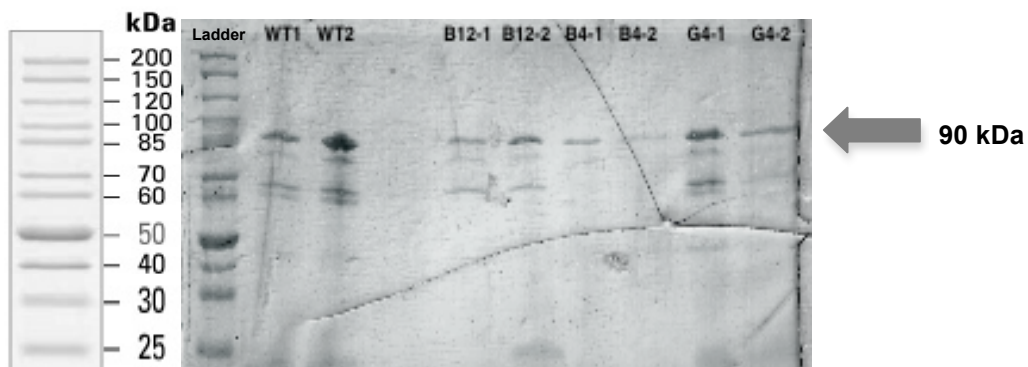
PAA-analyse met opgezuiverde polymerase-varianten



Figuur IV.7: Gemeten OD₄₅₀-waarden na verlenging van de primer met dNTP's (T6 matrijs), Asp-dAMP (T6 matrijs), Asp-dTMP (A5 matrijs) en Asp-dAMP en Asp-dTMP (T6 matrijs) tesamen door drie opgezuiverde varianten van DNA-polymerase Therminator™, geselecteerd na vorige PAA-analyses. Elke variant (1 µg/ml) kreeg de kans de primer te verlengen gedurende vijf cycli met natuurlijke nucleotiden (blauw), Asp-dAMP (rood), Asp-dTMP (groen) en beide aspartaat-nucleotiden (paars). Het reactiemengsel werd aangevuld met dNTP's (uitgezonderd het natuurlijk analoog van het toegevoegd aspartaat-nucleotide(n)) en van elk nucleotide was 100 µM aanwezig per reactie. De drie varianten vertoonden een goede incorporatie voor beide nucleotiden afzonderlijk, maar minder voor beide aspartaat-nucleotiden tesamen. De standaarddeviatie is telkens berekend voor slechts twee meetpunten voor de incorporatie met elk polymerase.

Uit deze PAA-analyse bleek dat varianten B4 (I488M, L489P, A553P) en G4 (P410Q) de primer meer efficiënt konden verlengen met afzonderlijk Asp-dAMP en afzonderlijk Asp-dTMP, vergeleken met het wild-type polymerase, maar de primerverlenging was minder efficiënt voor de incorporatie van Asp-dAMP en Asp-dTMP samen door elke variant. De efficiëntie van primerverlenging door variant B12 (K487Q, I488M, K501R) is vergelijkbaar met die van het wild-type voor elk substraat.

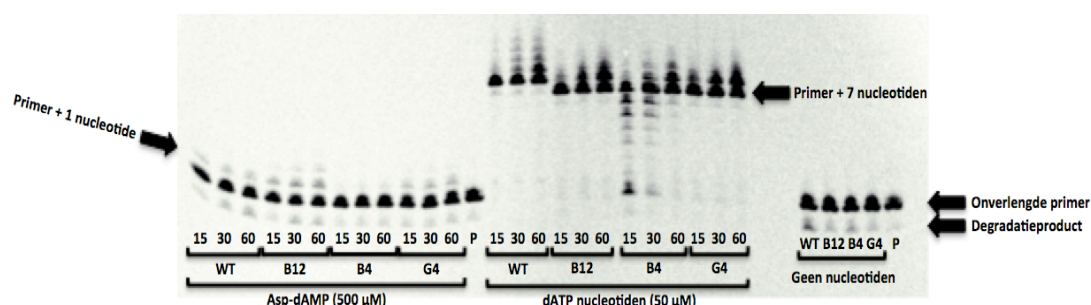
Voor specifieke karakterisatie met een radioactiviteitsgebaseerde incorporatietest, werden de drie varianten en het wild-type DNA-polymerase Therminator™ opnieuw getransformeerd, in duplicaat tot expressie gebracht en opgezuiverd, met het resultaat weergegeven op **figuur IV.8**, een 6 % SDS-gel.



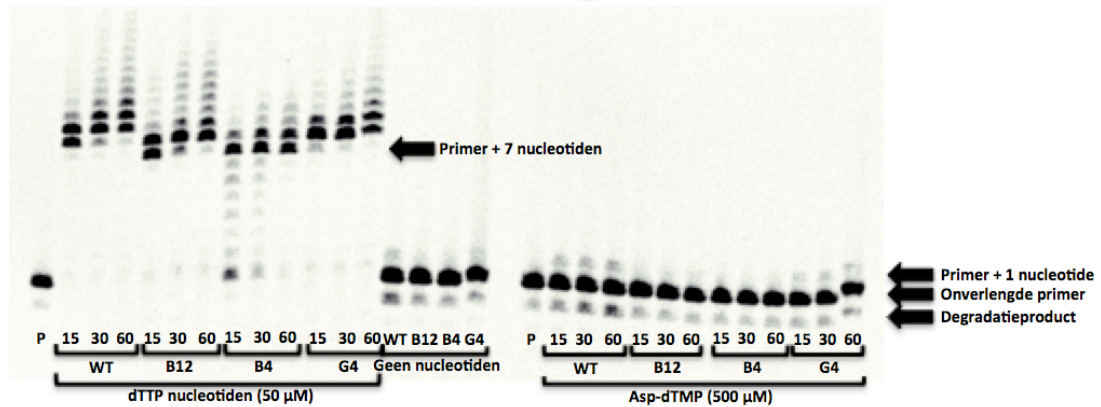
Figuur IV.8: Opgezuiverd wild-type en de drie geselecteerde varianten van het DNA-polymerase Therminator™ na PAA-analyses op een 6 % SDS-gel. PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) werd gebruikt als ladder. Als eerste werd het wild-type DNA-polymerase Therminator™, in duplicaat tot expressie gebracht en in duplicaat opgezuiverd, weergegeven. Dezelfde procedure werd voor de drie varianten B12, B4 en G4 in duplicaat doorlopen. Het polymerase is aangegeven met de pijl (90 kDa).

De opgezuiverde, actieve varianten B12-2, B4-1 en G4-2 (**figuur IV.8**) van het DNA-polymerase *Therminator*TM werden tot slot bestudeerd met een specifieke, op radioactiviteit gebaseerde incorporatietest, waarbij de verschillende extensieproducten met één-nucleotideresolutie bestudeerd kunnen worden. Van zowel het wild-type polymerase (WT1, **figuur IV.8**) als de drie varianten was de eindconcentratie in elke reactie 5 µg/ml om de activiteit voor de incorporatie van Asp-dAMP en Asp-dTMP onderling te kunnen vergelijken.

Het resultaat voor de incorporatie voor zowel Asp-dAMP als Asp-dTMP door elk polymerase, is weergegeven in respectievelijk **figuur IV.9** en **figuur IV.10** op een 20 % polyacrylamidegel. Bij de positieve controles werd de primer volledig (tot zelfs extra) verlengd tegenover de matrix door elk polymerase. Het wild-type polymerase kon niet meer dan één asparaat-nucleotide inbouwen, net zoals variant G4 (P410Q). Variant B12 (K487Q, I488M, K501R) vertoonde wel een kleine verbetering voor incorporatie met Asp-dAMP met P+2 nucleotiden extensieproducten (3,6 % na 60 min, tabel IV.4), terwijl variant B4 (I488M, L489P, A553P) een nauwelijks waarneembaar P+1 nucleotide-extensieproduct kon genereren met Asp-dAMP. De resultaten voor de incorporatie van Asp-dTMP dienen onder voorbehoud behandeld te worden, aangezien de negatieve controle ook een spoor van verlengde primer vertoonde, hoewel geen nucleotiden toegevoegd werden. Tot slot zijn er degradatieproducten waar te nemen, ondanks uitgeschakelde 3'>5'-exonuclease-activiteit. In tabel IV.4 is de relatieve intensiteit, bepaald met de software Optiquant, van de resultaten na incorporatie van Asp-dAMP en Asp-dTMP door elk polymerase afzonderlijk weergegeven.



Figuur IV.9: Specifieke incorporatietest van Asp-dAMP (500 µM) door wild-type DNA-polymerase *Therminator*TM en de drie varianten B12 (K487Q, I488M, K501R), B4 (I488M, L489P, A553P) en G4 (P410Q). Voor elk polymerase (5 µg/ml) werd er telkens na 15, 30 en 60 min incubatie bij 72 °C een staal geanalyseerd op een 20 % polyacrylamidegel. De positieve controle bestaat uit incorporatie van het natuurlijk nucleotide dATP (50 µM) voor elk polymerase en aan de negatieve controle werden geen nucleotiden toegevoegd (60 min, 72 °C). De controle is aangegeven waar de primer niet verlengd werd. Per waargenomen bandje hoger dan de onverlengde primer (P), werd er telkens een extra nucleotide ingebouwd.



Figuur IV.10: Specifieke incorporatietest van Asp-dTMP (500 µM) met wild-type DNA-polymerase Terminator™ en de drie varianten B12 (K487Q, I488M, K501R), B4 (I488M, L489P, A553P) en G4 (P410Q). Voor elk polymerase (5 µg/ml) werd er telkens na 15, 30 en 60 min incubatie bij 72 °C een staal geanalyseerd op een 20 % polyacrylamidegel. De positieve controle bestaat uit incorporatie van het natuurlijk nucleotide dTTP (50 µM) voor elk polymerase en aan de negatieve controle werden geen nucleotiden toegevoegd (60 min, 72 °C). De controle is aangegeven waar de primer niet verlengd werd. Per waargenomen bandje hoger dan de onverlengde primer (P), werd er telkens een extra nucleotide ingebouwd.

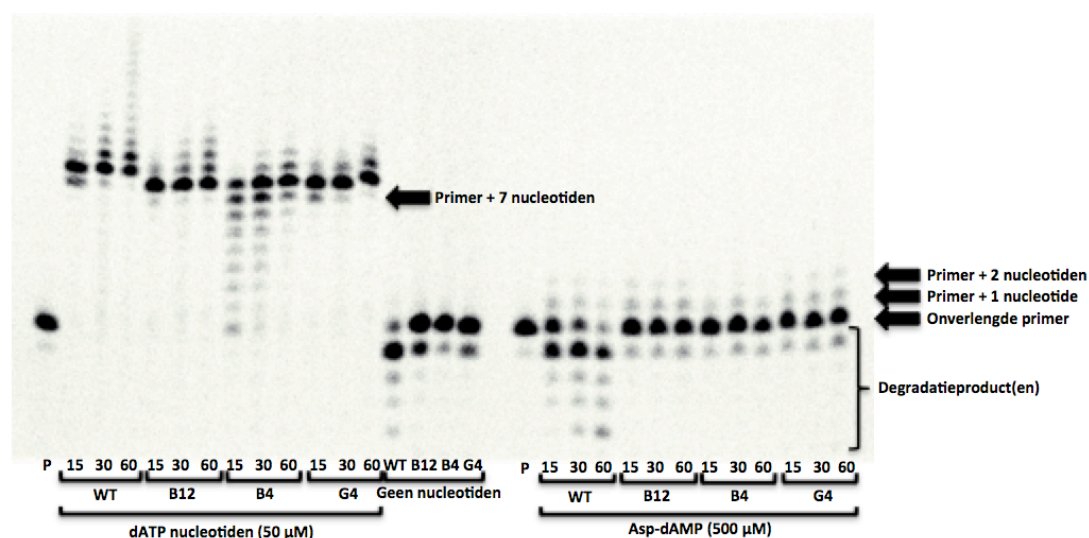
Tabel IV.4: Relatieve intensiteit van het aantal geïncorporeerde Asp-dAMP en Asp-dTMP-nucleotiden (500 µM) voor elk geselecteerd polymerase (5 µg/ml).

		Asp-dAMP (500 µM)				Asp-dTMP (500 µM)		
		Percentage (%)				Percentage (%)		
	min	P+2	P+1	P	Degradatie	P+1	P	Degradatie
WT	15		4,6	89,9	5,5	3,8	89,7	6,5
	30		6	85,9	8,1	3,9	87,9	8,2
	60		6,8	82,2	11	4,3	85,8	9,9
	Blanco			89,3	10,7	3,2	86,9	9,9
B12	15	1,9	10,9	82,5	4,7	1,8	94,3	3,9
	30	3	14,3	73,2	9,5	1,7	94,5	3,8
	60	3,6	14,6	74,6	7,2	2	94,1	3,9
	Blanco			96,1	3,9	1,2	94	4,8
B4	15			96,4	3,6		96,5	3,5
	30		1,8	93,8	4,4		96,7	3,3
	60		1,7	94,3	4	1,8	94,6	3,6
	Blanco			92,8	7,2	1,7	94,1	4,2
G4	15		5,8	89,9	4,3	2,6	93	4,4
	30	0,4	6,2	90,1	3,3	3,1	92	4,9
	60	0,2	6,4	89,4	4	3,6	90,7	5,7
	Blanco			95,8	4,2	3,1	91,6	5,3

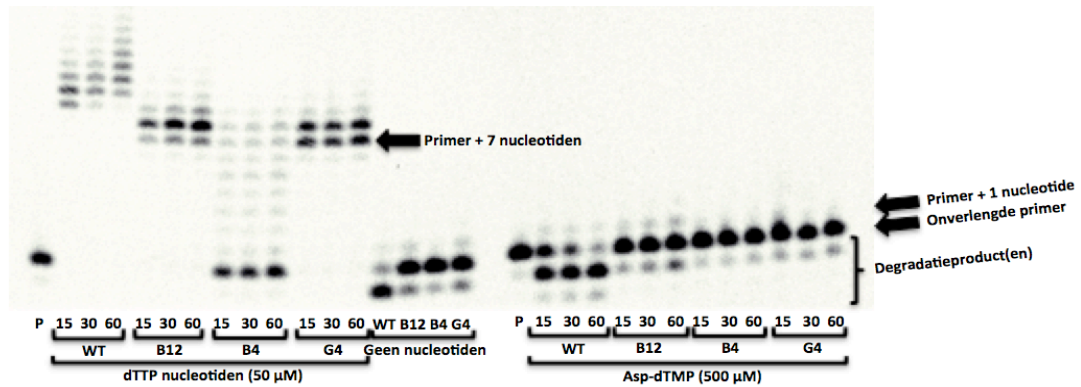
Aan het blanco staal werden geen nucleotiden toegevoegd en dit staal werd geanalyseerd na incubatie op 72 °C gedurende 60 min.

Noch het wild-type, noch een variant van DNA-polymerase Terminator™ was in staat meer dan één Asp-dTMP-nucleotide te incorporeren. Variant B12 (K487Q, I488M, K501R) toonde wel activiteit om de primer met twee Asp-dAMP-nucleotiden te verlengen.

Aangezien de selectie tijdens CST was verlopen in de aanwezigheid van mangaanionen (tabel III.3), is deze conditie voor de specifieke incorporatietest het onderzoeken waard. Het resultaat voor de incorporatie voor zowel Asp-dAMP als Asp-dTMP door elk geselecteerd polymerase in de aanwezigheid van 1 mM MnCl_2 , net zoals de selectiecondities tijdens CST, is weergegeven in respectievelijk **figuur IV.11** en **figuur IV.12** op een 20 % polyacrylamidegel. Mangaanionen kunnen mogelijks de incorporatie van artificiële nucleotiden versoepelen doordat deze ionen zorgen voor een verhoogde *error rate* van het polymerase (Hübscher *et al.* 2010). De positieve controles toonden een volledig verlengde primer tegenover de matrix. Het wild-type polymerase kon tot twee Asp-dAMP-nucleotiden incorporeren, net zoals varianten B12 (K487Q, I488M, K501R) en G4 (P410Q), al na een kwartier. Naarmate de incubatietijd toenam bij het wild-type polymerase, werd een hogere (ongewenste) degradatie waargenomen, om een onbekende reden (zie ook tabel IV.5). Met de resultaten voor de incorporatie van Asp-dTMP door elk polymerase konden geen conclusies getrokken worden, aangezien het signaal voor de incorporatie van een Asp-dTMP eenzelfde intensiteit vertoonde als deze van de negatieve controle. In tabel IV.5 is de relatieve intensiteit, bepaald met de software Optiquant, van de resultaten na incorporatie van Asp-dAMP en Asp-dTMP door elk polymerase afzonderlijk weergegeven, in de aanwezigheid van MnCl_2 .



Figuur IV.11: Specifieke incorporatietest, in de aanwezigheid van MnCl_2 , van Asp-dAMP (500 μM) met wild-type DNA-polymerase Terminator™ en de drie varianten B12 (K487Q, I488M, K501R), B4 (I488M, L489P, A553P) en G4 (P410Q). Voor elk polymerase (5 $\mu\text{g/ml}$) werd er telkens na 15, 30 en 60 min incubatie bij 72 °C een staal geanalyseerd op een 20 % polyacrylamidegel. De positieve controle bestaat uit incorporatie van het natuurlijk nucleotide dATP (50 μM) voor elk polymerase en aan de negatieve controle werden geen nucleotiden toegevoegd (60 min, 72 °C). De controle is aangegeven waar de primer niet verlengd werd. Per waargenomen bandje hoger dan de onverlengde primer (P), werd er telkens een extra nucleotide ingebouwd.



Figuur IV.12: Specifieke incorporatietest, in de aanwezigheid van $MnCl_2$, van Asp-dTMP (500 µM) met wild-type DNA-polymerase ThermoPolTM en de drie varianten B12 (K487Q, I488M, K501R), B4 (I488M, L489P, A553P) en G4 (P410Q). Voor elk polymerase (5 µg/ml) werd er telkens na 15, 30 en 60 min incubatie bij 72 °C een staal geanalyseerd op een 20 % polyacrylamidegel. De positieve controle bestaat uit incorporatie van het natuurlijk nucleotide dTTP (50 µM) voor elk polymerase en aan de negatieve controle werden geen nucleotiden toegevoegd (60 min, 72 °C). De controle is aangegeven waar de primer niet verlengd werd. Per waargenomen bandje hoger dan de onverlengde primer (P), werd er telkens een extra nucleotide ingebouwd.

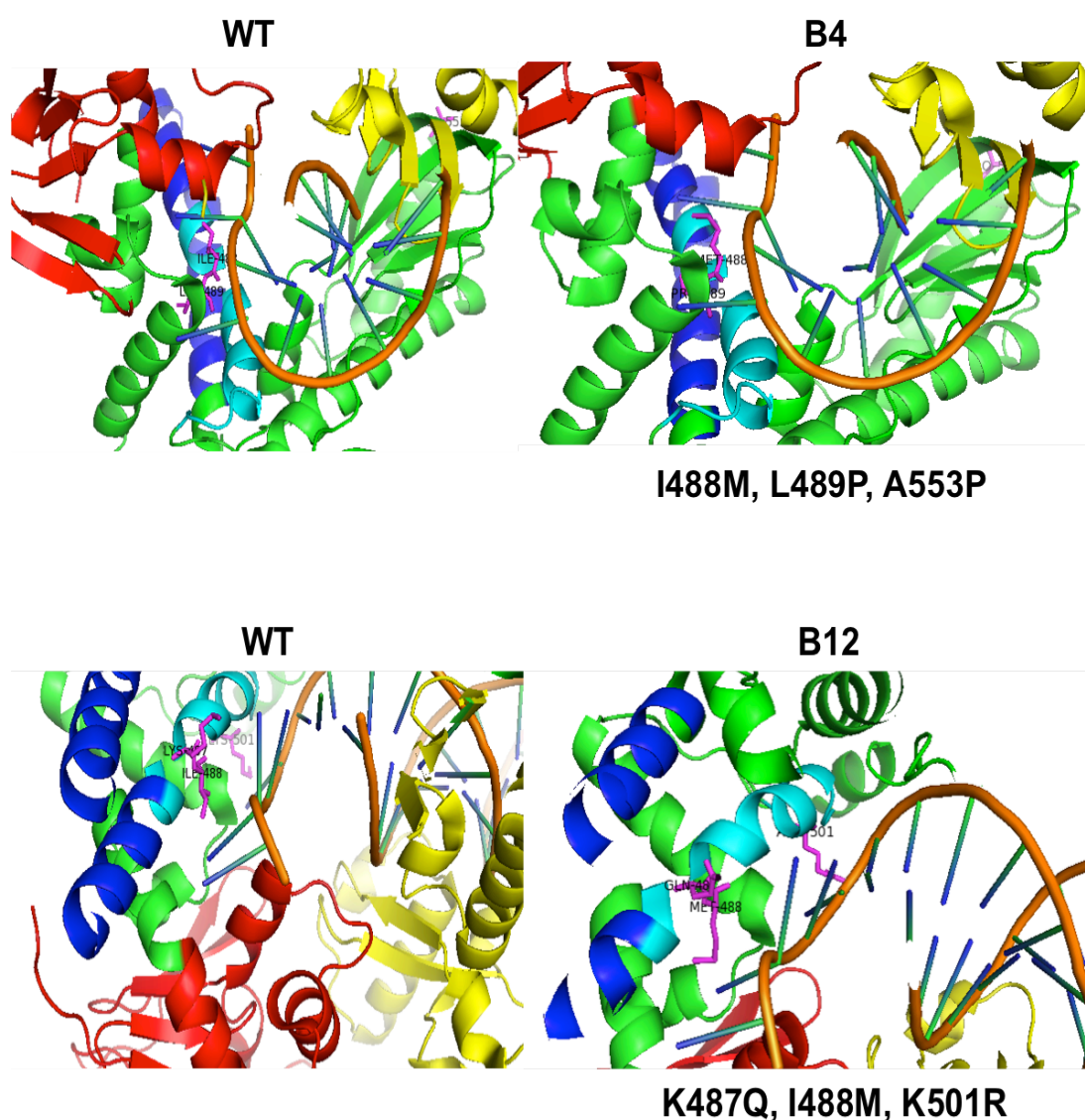
Tabel IV.5: Relatieve intensiteit van het aantal geïncorporeerde Asp-dAMP en Asp-dTMP-nucleotiden (500 µM) voor elk geselecteerd polymerase (5 µg/ml) in de aanwezigheid van $MnCl_2$.

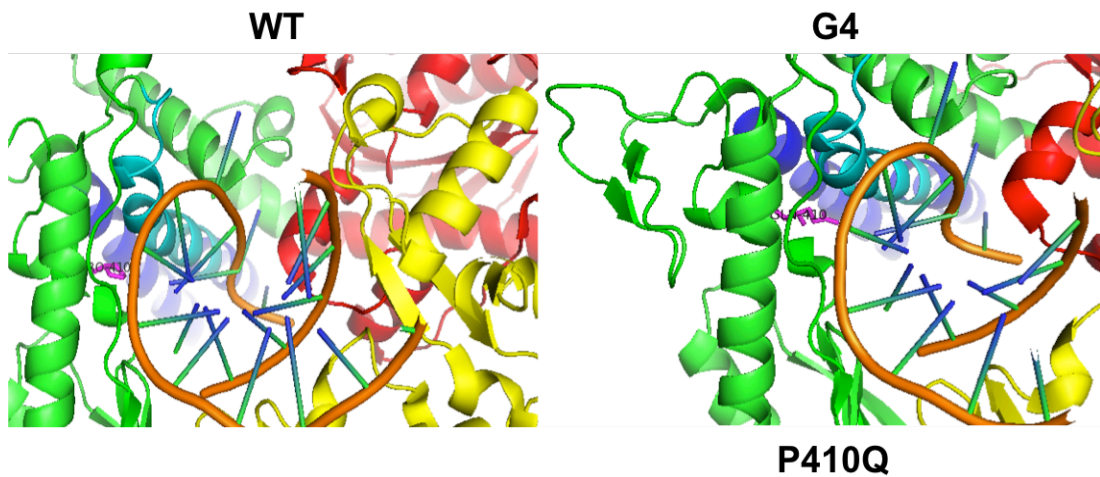
		Asp-dAMP (500 µM) in $MnCl_2$				Asp-dTMP (500 µM) in $MnCl_2$			
		Percentage (%)				Percentage (%)			
	min	P+2	P+1	P	Degraderatie	P+2	P+1	P	Degraderatie
WT	15	1,3	5,8	44,9	48	3	42,3	54,7	
	30	1,7	5,2	25,6	67,5	3,5	27,4	69,1	
	60	1,6	4,4	14,9	79,1	2,4	14,3	83,3	
	Blanco			14,3	85,7	3,9	22,5	73,6	
B12	15	2,8	8,1	79,9	9,2	4,2	87,1	8,7	
	30	2,9	8,3	78,5	10,3		83,2	12	
	60	3,2	8,8	75,3	12,7	1,4	6,9	75	16,7
	Blanco			80,6	19,4	5,6	76,2	18,2	
B4	15		5,9	87,5	6,6		95,7	4,3	
	30		6,3	85	8,7		94,7	5,3	
	60		7,4	79,9	12,7		93,4	6,6	
	Blanco			91,8	8,2		90,1	9,9	
G4	15	2,3	7,7	80,2	9,8		91,9	8,1	
	30	1,8	7,6	81,5	9,1		90,2	9,8	
	60	2,1	6,8	77	14,1		88,2	11,8	
	Blanco			81,3	18,7	5,7	78,5	15,8	

Aan het blanco staal werden geen nucleotiden toegevoegd en dit staal werd geanalyseerd na incubatie op 72 °C gedurende 60 min.

In de aanwezigheid van mangaanionen verliep de extensie van de primer efficiënter voor elk geselecteerd polymerase (uitzonderd B4) met twee Asp-dAMP-nucleotiden, vergeleken met extensie zonder toegevoegde mangaanionen. Er is echter wel een verhoogde (ongewenste) degradatie waar te nemen in de aanwezigheid van mangaanionen.

Van de drie varianten van vingerdomeinbibliotheek F, geselecteerd voor incorporatie-activiteit voor Asp-dAMP en Asp-dTMP, werd een model opgesteld met PyMol (**figuur IV.13**). Zo kon de mogelijke interactie van de mutatie met het intredende nucleotide onderzocht worden. De waargenomen mutaties kwamen logischerwijze steeds voor in de nabijheid van de te verlengen DNA-streng. De kleuren in het model komen overeen met de verschillende domeinen van het DNA-polymerase Terminator™, besproken in **figuur I.9**.





Figuur IV.13: Hypothetisch opgestelde modellen met PyMol voor elke geselecteerde variant van het DNA-polymerase Therminator™ voor de incorporatie van Asp-dAMP en Asp-dTMP. De variant van het DNA-polymerase Therminator™ werd telkens vergeleken met het wild-type polymerase. Bij het wild-type werd het oorspronkelijk residu steeds weergegeven in magenta, dat rechts bij de variant telkens gemuteerd werd, ook weergegeven in magenta. Het palmdomein is weergegeven in groen, het duimdomein in geel, het non-functionele exonucleas domein (exo⁻-variant) in rood en grijs is het interdomein. In blauw is het vingerdomein weergegeven met in het lichtblauw het deel van het vingerdomein dat van interesse is voor dit project, waarin mutanten gegenereerd werden, genaamd bibliotheek F. In oranje is tot slot de te verlengen DNA-helix weergegeven (PDB ID. 4K8X).

V. DISCUSSIE EN TOEKOMSTPERSPECTIEVEN

OPTIMALISATIE CST-PROCEDURE

Ondanks optimalisatie van de CST-procedure om eerder vastgestelde problemen te omzeilen, dient er toch nog steeds voorzichtig omgesprongen te worden met conclusies. Immers, incorporatie van cellulaire nucleotiden kan niet worden uitgesloten, ook niet bij gewijzigde celbereiding. Dit kan vals-positieve resultaten geven. Een methode om deze cellulaire nucleotiden uit te putten dient verder onderzocht te worden. De wasstap met een lage zoutconcentratie en toegevoegd formamide is kritisch voor de selectie. De combinatie van lage ionische sterkte en formamide als denaturant maakt de zwakgebonden plasmiden los van de *beads*. Zo verlaagt de achtergrond van plasmiden gebonden aan de *beads* via een onverlengde primer. In verschillende wasstappen gradueel de concentratie formamide verhogen, zorgt voor een aanrijking van polymerasen met een hoge synthetase-activiteit (Pinheiro *et al.* 2014), maar dient mogelijk nog verhoogd te worden voor efficiëntere selectie. De amplificatie van geselecteerde varianten met *High Fidelity PCR Enzyme Mix* geeft voldoende en betrouwbaar resultaat, geschikt voor de herkloning en transformatie.

Bij experimentele CST van vingerdomeinmutanten voor incorporatie van aspartaat-gemodificeerde nucleotiden was na enkele CST-rondes *carry-over* van plasmide uit de controleconditie waar te nemen. Hiervoor kunnen verscheidene oorzaken aan de basis liggen, zoals gecontamineerde pipetten, werkoppervlakken, handschoenen en/of reagentia, gecombineerd met de hoge gevoeligheid van PCR bij amplificatie van gebonden plasmiden. Dit kan resulteren in vals-positieve resultaten of onnauwkeurige resultaten. Om dit in de toekomst te vermijden, kan de voorbereiding van PCR getroffen worden onder een *flow* om contaminatie te vermijden, kunnen filtertips gebruikt worden en het aantal pipetteerstappen gereduceerd worden tot het minimum.

GESELECTEERDE VARIANTEN

OPZUIVERING

Het wild-type DNA-polymerase TerminatorTM en de drie geselecteerde en opgezuiverde varianten B12, B4 en G4 zijn correct tot expressie gebracht, aangezien deze vier polymerasen elk bij activiteitstesten de natuurlijke nucleotiden dATP en dTTP efficiënt kunnen incorporeren (zie **figuur IV.9** en **figuur IV.10**). Om

sporen van contaminerende proteïnen, waargenomen in **figuur IV.8**, in de preparaten te verminderen, kunnen met een ÄKTA[®]purifier (GE Healthcare Lifesciences), in plaats van manuele opzuivering, mogelijks volledig zuivere proteïnen bekomen worden. Specifiek voor DNA-polymerase Terminator[™] (en zijn varianten) wordt ook hier gekozen voor een hars met nikkelionen, met een hoge affiniteit voor de 6xHistidine-Tag. Dit in combinatie met gelfiltratie, kan mogelijks zuiverdere proteïnen geven en een hogere eiwitopbrengst. Manueel kan tijdens de opzuivering de lysis efficiëntie verhoogd worden door het gebruik van een French Press.

WILD-TYPE DNA-POLYMERASE THERMINATOR[™] EN VARIANTEN

Als eerste is waargenomen dat de primer tegenover de matrijs langer verlengd werd met het aanwezige type van natuurlijke nucleotiden, wat de versoepelde activiteit van het DNA-polymerase Terminator[™] bevestigt (Ichida *et al.* 2012). Een duidelijk voorbeeld hiervan is weergegeven in **figuur IV.10**, waarbij wild-type polymerase en varianten B12 en G4 al vanaf 30 minuten een incorporatie van meer dan tien dTTP-nucleotiden vertoonden. Dit wijst op versoepelde specificiteit van het polymerase, aangezien de matrijs T47 (tabel III.1) codeert voor de incorporatie van slechts zeven opeenvolgende dTTP's. Elk getest polymerase incorporeert dus blijkbaar ook dTTP-nucleotiden tegenover de drie laatste niet-A-nucleotiden (GCC) van de matrijs, die niet gecorrigeerd kunnen worden wegens de afwezigheid van het 3'>5'-exonucleasedomein. Het wild-type polymerase en de twee varianten B12 en G4 kunnen zelfs nog meer nucleotiden incorporeren, voorbij het 5'-uiteinde van de aanwezige matrijs.

De incorporatie met aspartaat-nucleotiden door elk polymerase verliep echter niet zo vlot. Enkele jaren geleden is reeds aangetoond dat DNA-polymerase Terminator[™] twee tot drie Asp-dAMP-nucleotiden kon incorporeren, waarna het polymerase stopt (Herdewijn en Marlière, 2012). De reden voor deze pauzering is niet gekend. In onze experimenten is echter waar te nemen dat het wild-type DNA-polymerase Terminator[™] slechts één Asp-dAMP-nucleotide kon incorporeren, en dit in beperkte mate (**figuur IV.9**). In de aanwezigheid van mangaanionen, kon het wild-type polymerase in beperkte mate tot twee Asp-dAMP-nucleotiden incorporeren. In de aanwezigheid van mangaanionen is er echter meer (ongewenst) degradatieproduct waar te nemen, om een onduidelijke reden, aangezien het 3'>5'-exonucleasedomein uitgeschakeld werd in zowel het wild-type als de varianten van het DNA-polymerase Terminator[™].

De incorporatie van één Asp-dAMP-nucleotide door zowel het wild-type DNA-polymerase als de varianten bleek, uit de berekende intensiteitspercentages (tabel

IV.4 en tabel IV.5), iets efficiënter dan de incorporatie van één Asp-dTMP-nucleotide. Dit bevestigt de vaststelling in de literatuur dat de efficiëntie voor de incorporatie van nucleotiden met aspartaat als uittredende groep base-afhankelijk is (Terrazas *et al.* 2008).

Na CST en na polymerase-activiteitstesten (PAA) werden drie varianten van DNA-polymerase Terminator™ weerhouden voor verdere karakterisatie met een radioactiviteitsgebaseerde incorporatietest, namelijk B4 (I488M, L489P, A553P), B12 (K487Q I488M, K501R) en G4 (P410Q). Een eerste vaststelling bij het bekijken van PyMol-modellen (**figuur IV.13**) is de mutatie I488M die voorkwam bij twee verschillende mutanten, waaruit deze mutatie belangrijk lijkt voor de incorporatie van Asp-dAMP en/of Asp-dTMP. Methionine heeft een langere zijketen vergeleken met isoleucine. De aanwezigheid van zwavel in de zijketen van methionine zorgt echter voor een knik in de zijketen (**figuur IV.13**), waardoor het uiteinde (methylgroep) van het residu wegwijst van de actieve *site* en waarschijnlijk bijgevolg geen zichtbaar effect heeft op de binding van nucleotiden met aspartaat als uittredende groep. De tweede mutatie bij variant B4 is de mutatie van leucine naar het minder flexibele proline-residu. Doordat het proline-stikstofatoom deel uitmaakt van een vijfkring, verstoort deze mutatie secundaire structuren in het polymerase. Bij meerdere activiteitsmetingen (**figuur IV.9**, **figuur IV.10**, **figuur IV.11** en **figuur IV.12**) was waar te nemen dat variant B4 meer moeilijkheden vertoonde voor de incorporatie van natuurlijke nucleotiden, vergeleken met wild-type en de andere varianten van het polymerase. Ook vertoonde B4 een zeer lage activiteit voor de incorporatie van zowel Asp-dAMP als Asp-dTMP. De mutatie naar proline lijkt dus niet zo zeer een meerwaarde voor het verbeteren van de incorporatie-activiteit. Hetzelfde geldt voor de derde mutatie A553P, waarschijnlijk ook een toevallige mutatie, want is gelegen in het palmdomein (palm2, **figuur III.1**) en niet in het beoogde vingerdomein.

In het vingerdomein zijn positief geladen residu's nodig voor de interactie met de fosfaatgroepen, of met de carboxylgroepen van Asp-dAMP en Asp-dTMP, van het intredend nucleotide voor een goede positionering in het polymerase tegenover de DNA-matrijs. Bij variant B12 werden twee positief geladen residu's, namelijk twee lysine-residu's, gemuteerd naar glutamine en arginine. Deze mutaties lijken voordelig voor de variant, aangezien variant B12 de primer kan verlengen met twee Asp-dAMP-moleculen, zowel in de aan- als afwezigheid van mangaanionen. De mutatie naar glutamine maakt de zijketen van het residu korter en kan eventueel voordelig zijn voor een betere positionering van Asp-dAMP en/of Asp-dTMP in de

aanwezigheid van mangaanionen. Mangaanionen reduceren de substraatspecificiteit van het polymerase, ook voor nucleotiden met modificaties in het fosfaatgedeelte (Tabor en Richardson, 1989). Mangaan is een groter ion dan magnesium, en kan daardoor het intredend nucleotide mogelijks beter positioneren, aangezien de configuratie van de magnesiumionen met de carboxylgroepen van aspartaat als uitredende groep mogelijks sterische hinder veroorzaken (Tabor en Richardson, 1989). Het gebruik van een groter ion, zoals mangaan, kan mogelijks de sterische hinder in het metaal-substraat-complex reduceren. Daardoor is waarschijnlijk de incorporatie van twee Asp-dAMP-nucleotiden door zowel variant B12 en G4, als wild-type, in aanwezigheid van mangaanionen, te verklaren (**figuur IV.11**). De mutatie naar arginine in variant B12 geeft twee extra aminogroepen in de zijketen en dit geeft in biologische omstandigheden een meer positief geladen residu. Echter, de mutatie K501R ligt op de grens tussen het vingerdomein en palmdomein en wijst weg van de actieve *site*. Deze mutatie is bijgevolg wellicht niet voordelig voor een verbeterde positionering van het intredend nucleotide in het polymerase tegenover de DNA-matrijs.

Variant G4 bevat een toevallige mutatie die niet gelegen is in het beoogde vingerdomein, maar in het palmdomein (palm1, **figuur III.1**), het actief gedeelte van het polymerase waar de incorporatiereactie plaatsvindt (Hübscher *et al.* 2010). In het palmdomein is er bij deze variant een mutatie van proline naar glutamine, in de nabijheid van het vingerdomein, wat het residu meer flexibel maakt en mogelijks kan zorgen voor een betere interactie en positionering van het intredend nucleotide, doordat de zijketen dichter gepositioneerd is bij de DNA-helix. Dit verklaart mogelijks de verlenging van de primer in de aanwezigheid van mangaanionen met twee Asp-dAMP-moleculen door deze variant (**figuur IV.11**).

TOEKOMSTPERSPECTIEVEN

Uit de uitgevoerde experimenten is van geen van de geselecteerde varianten van DNA-polymerase TerminatorTM gebleken dat ze een uitgesproken verbeterde activiteit vertoonden voor de incorporatie van Asp-dAMP en/of Asp-dTMP, vergeleken met het wild-type DNA-polymerase TerminatorTM. In tegenstelling tot de specifieke incorporatietest, bleek uit PAA-analyse met de opgezuiverde varianten van het polymerase (**figuur IV.7**) zowel variant B4 als variant G4 een verhoogde efficiëntie voor incorporatie van Asp-dAMP te vertonen, vergeleken met het wild-type DNA-polymerase TerminatorTM. Bijgevolg lijkt de huidige PAA-analyse niet helemaal betrouwbaar. Bijkomstig kan de incorporatie van aspartaat-nucleotiden in een polymerase-activiteitstest ook plaatsvinden in de aanwezigheid van mangaanionen, om de selectie-condities van CST na te bootsen.

Om actieve vingerdomeinmutanten van DNA-polymerase Terminator™ te selecteren, kan bibliotheek F in de toekomst meer dan drie selectierondes met CST ondergaan, waarbij elke CST-ronde uitgevoerd wordt volgens de eerder vermelde voorzorgsmaatregelen om *carry-over* te vermijden. Met een gemiddelde aanrijdingsfactor van 50 per CST-ronde, zou de primaire vingerdomeinbibliotheek F van 10 miljoen onafhankelijke klonen theoretisch vier tot vijf CST-rondes dienen te ondergaan om een unieke kloon aan te rijken tot een detecteerbaar niveau. Een PAA-screening kan de selectie aanvullen of ten dele vervangen, op voorwaarde dat een oplossing gevonden wordt voor het ongewenst inbouwen van cellulaire nucleotiden aanwezig in de gebruikte cellysaten.

Hoewel het logischerwijs moeilijker is artificiële nucleotiden te incorporeren t.o.v. natuurlijke nucleotiden, kan het zijn dat nucleotiden met aspartaat als uittredende groep mogelijk een inhibitor voor het polymerase zijn aangezien slechts één, hooguit twee nucleotiden consecutief blijken te worden ingebouwd, zelfs al is het product DNA. Hiervoor moeten de interacties tussen Asp-dAMP en Asp-dTMP in het polymerase onderzocht worden tijdens de incorporatie, waarbij chemische modificaties van de uittredende groep structurele verschillen kunnen veroorzaken in de actieve *site* (Herdewijn en Marlière, 2012). Artificiële nucleotiden met aspartaat als uittredende groep kunnen via de aspartaatgroep mogelijk te sterk gebonden zijn aan het polymerase, waardoor deze nucleotiden of het aspartaat-residu ook gebonden blijven in het polymerase. Zo wordt een obstructie gevormd voor een nieuw intredend nucleotide. Dan is er sprake van ‘enzyminhibitie’ (Adelfinskaya *et al.* 2007). Dit is niet met zekerheid te concluderen, aangezien het wild-type en varianten B12 en G4 van het DNA-polymerase Terminator™ incorporatie van twee Asp-dAMP-nucleotiden (in de aanwezigheid van mangaanionen, **figuur IV.11**) vertonen. Het mogelijks inhibitoreffect van Asp-dAMP moleculen kan getest worden in een competitie experiment, waarbij mengsels met verschillende dATP/Asp-dAMP verhoudingen gebruikt worden voor incorporatietesten om de mogelijke inhibitie van Asp-dAMP-moleculen na te gaan (Garrett, Grisham, 2009).

Eens een set van mutanten met de gewenste verhoogde activiteit is bekomen, zouden in de toekomst de verschillende mutaties met elkaar kunnen gehercombineerd worden. Ook de combinatie met voordelige mutaties in andere domeinen van het DNA-polymerase Terminator™ (zoals duim en palm) kunnen een verbeterde activiteit geven voor de incorporatie van Asp-dAMP en Asp-dTMP. Een mogelijke, robuuste methode om dit te verwezenlijken is *Golden Gate Shuffling* (Engler *et al.* 2009).

REFERENTIES

Adelfinskaya O, Herdewijn P, 2007. Amino Acid Phosphoramidate Nucleotides as Alternative Substrates for HIV-1 Reverse Transcriptase. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46: 4356-4358.

Adelfinskaya O, Terrazas M, Froeyen M, Marlière P, Nauwelaerts K, Herdewijn P, 2007. Polymerase-catalyzed synthesis of DNA from phosphoramidate conjugates of deoxynucleotides and amino acids. *Nucleic Acids Res.* 35 (15): 5060-5072.

Berg J, Tymoczko J, Stryer L (2002) – *Biochemistry – Fifth Edition*. W.H. Freeman, New York, 1050 pp.

Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, Marillonnet S, 2009. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type IIs restriction enzymes. *PLoS ONE* 4(5).

Delespaul W, Peeters Y, Herdewijn P, Robben J, 2015. A novel helper phage for HaloTag-mediated co-display of enzyme and substrate on phage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 460: 245-249.

Fa M, Radeghieri A, Henry A, Romesberg F, 2004. Expanding the Substrate Repertoire of a DNA-polymerase by Directed Evolution. *J. AM. CHEM. SOC.* 126: 1748-1754.

Garrett R, Grisham C (2009) - *Biochemistry - Fifth Edition*. Brooks/Cole Publishing Company CENGAGE Learning, Pacific Grove, 1169 pp.

Ghadessy F, Ong J, Holliger P, 2001. Directed evolution of polymerase function by compartmentalized self-replication. *PNAS* 98: 4552-4557.

Giraut A, Song XP, Froeyen M, Marlière P, Herdewijn P, 2010. Iminodiacetic-phosphoramidates as metabolic prototypes for diversifying nucleic acid polymerization in vivo. *Nucleic Acids Res.* 38 (8): 2541-2550.

Herdewijn P, Marlière P, 2009. Toward Safe Genetically Modified Organisms through the Chemical Diversification of Nucleic Acids. *Chemistry & Biodiversity* 6: 791-807.

Herdewijn P, Marlière P, 2012. Redesigning the leaving group in nucleic acid polymerization. *FEBS Letters* 586: 2049-2056.

Herman BD, Schinazi RF, Zhang H, Nettles JH, Stanton R, Detorio M, Obikhod A, Pradère U, Coats SJ, Mellors JW, Sluis-Cremer N, 2012. Substrate mimicry: HIV-1 reverse transcriptase recognizes 6-modified-3'-azido-2',3'-dideoxyguanosine-5'-triphosphates as adenosine analogs. *Nucleic Acids Res.* 40(1): 381-390.

Hübscher U, Spadari S, Villani G, Maga G (2010) – *DNA-polymerases – Discovery, Characterization and Functions in cellular DNA Transactions*. World Scientific, Singapore, 321 pp.

Ichida JK, Horhota A, Zou K, McLaughlin LW, Szostak JW, 2012. High fidelity TNA synthesis by Terminator polymerase. *Nucleic Acids Res.* 33 (16): 5219–5225.

Joyce CM, Steitz TA, 1994. Function and structure relationships in DNA-polymerases. *Annu Rev Biochem* 63: 777-822.

King A, Teertstra W, Van der Vliet P, 1997. Processive proofreading by the adenovirus DNA-polymerase. Association with the priming protein reduces exonucleolytic degradation. *Nucleic Acids Res.* 25 (9): 1745-1752.

Loakes D, Holliger P, 2009. Polymerase engineering: towards the encoded synthesis of unnatural biopolymers. *Chem. Commun.* 31: 4619-4631.

Maiti M, Knies C, Dumbre S, Lescrinier E, Rosemeyer H, Ceulemans A, Herdewijn P, 2015. Xylonucleic acid: synthesis, structure, and orthogonal pairing properties. *Nucleic Acids Res.* 43 (15): 7189-7200.

Pinheiro V, Arangundy-Franklin S, Holliger P, 2014. Compartmentalized Self-Tagging for In Vitro-Directed Evolution of XNA Polymerases. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*.

Pinheiro V, Taylor A, Cozens C, Abramov M, Renders M, Zhang S, Chaput J, Wengel J, Peak-Chew S, McLaughlin S, Herdewijn P, Holliger P, 2012. Synthetic Genetic Polymers Capable of Heredity and Evolution. *Science* 336: 341-344.

Pinheiro V, Taylor A, Cozens C, Abramov M, Renders M, Zhang S, Chaput J, Wengel J, Peak-Chew S, McLaughlin S, Herdewijn P, Holliger P, 2012. Synthetic Genetic Polymers Capable of Heredity and Evolution. *Science* 336: Supplementary materials (Materials and methods, figures, tables and full reference list).

Schmidt M, 2010. Xenobiology: A new form of life as the ultimate biosafety tool. *BioEssays* 32: 322-331.

Shevelev IV, Hübscher U, 2002. The 3' 5' exonucleases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 364-376.

Steitz TA, 1999. DNA-polymerases: Structural diversity and common mechanisms. *J Biol Chem.* 274 (25): 17395-17398.

Tabor S, Richardson C, 1989. Effect of manganese ions on the incorporation of dideoxynucleotides by bacteriophage T7 DNA polymerase and *Escherichia coli* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4076 – 4080.

Terrazas M, Marlière P, Herdewijn P, 2008. Enzymatically Catalyzed DNA Synthesis using L-Asp-dGMP, L-Asp-dCMP, and L-Asp-dTMP. *Chemistry and biodiversity* 5: 31-39.

Ussery D, 2002. DNA Structure: A-, B- and Z-DNA Helix Families. *Encyclopedia of Life Sciences*: 7 pp.

Watson J, Crick F, 1953. Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature* 171: 737-738.

Watt G, 2005. Modified nucleic acids on display. *Nature Chemical Biology*. [Http://www.nature.com](http://www.nature.com).

Yang S, Herdewijn P, 2011. Polymerase-dependent DNA synthesis from phosphoramidate-activated nucleotides. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 30: 597-608.

Yang S, Froeyen M, Lescrinier E, Marlière P, Herdewijn P, 2011. 3-phosphono-L-alanine as pyrophosphate mimic for DNA synthesis using HIV-1 reverse transcriptase. *Org. Biomol. Chem.* 9: 11-119.

Yang Z, Sismour M, Benner S, 2007. Nucleoside alpha-thiotriphosphates, polymerases and the exonuclease III analysis of oligonucleotides containing phosphorothioate linkages. *Nucleic Acids Res.* 35(9): 3118–3127.

Biologisch gezien wordt er veilig gewerkt tijdens dit project, aangezien *E. coli*-cellen tot risicoklasse 1 behoren en deze dus geen ziekte kunnen veroorzaken bij mensen, dieren of planten.

Anderzijds zijn er wel chemische risico's verbonden aan dit project. Bij transformatie wordt er gebruik gemaakt van het antibioticum ampicilline, dat tot risicoklasse E2 behoort en ontvlambaar is en schadelijk kan zijn voor de ogen. Anhydrotetracycline geeft gevaar op explosie na verhitting en kan ernstige brandwonden veroorzaken (risicoklasse E3). Het risico van zowel ampicilline als AHTC is beperkt in dit project, aangezien er telkens met kleine hoeveelheden gewerkt wordt.

Tijdens het uitvoeren van een CST, is DTT irriterend voor de huid (risicoklasse E1), veroorzaakt triton-X-100 oogletsel (risicoklasse E2) en zuiver formamide kan het ongeboren kind schaden (risicoklasse E4). De emulsie breken met diethylether gebeurt onder de trekkast, aangezien diethylether behoort tot risicoklasse E4 en zowel ontvlambaar is als duizeligheid kan veroorzaken. De wasstappen bevatten ook formamide, weliswaar in verdunning waardoor het gevaar licht afneemt. Tris(hydroxy)aminomethaan hydrochloride en EDTA (beiden risicoklasse E1), aanwezig in BWBS, kunnen verantwoordelijk zijn voor oogirritatie.

In aanraking komen met zuiver DNA, zoals primers, nucleotiden en vectoren, is niet gevaarlijk, wel als er gewerkt wordt met DNA dat codeert voor cellulaire oncogenen, wat in dit onderzoek niet van toepassing is. Ook het bekomen van recombinant DNA is niet schadelijk.

Aan gelelektroforese en visualisatie met ethidiumbromide zijn een aantal gevaren verbonden. De aangebrachte DNA-ladder (Thermo Scientific) kan huidirritatie veroorzaken (E1). Met de afzonderlijke componenten in 50x TAE-buffer (afvalcategorie 3) moet voorzichtig omgegaan worden, want tris(hydroxy)aminomethaan en EDTA veroorzaken huidirritatie (E1) en (geconcentreerd) azijnzuur kan explosief zijn na verhitting en ernstige brandwonden veroorzaken (E3). De verdunde 1x TAE-buffer is weinig schadelijk. Ethidiumbromide is zeer gevaarlijk (E4 met vrijgave) en behoort tot afvalcategorie 5. Dit is extreem ontvlambaar en verdacht van het veroorzaken van genetische schade (carcinogeen en schadelijk voor vruchtbaarheid). Bovendien is blootstelling aan UV-licht bij visualisatie van DNA schadelijk en kan best vermeden worden (UV-scherm en bril). Bij gelextractie moet

er rekening gehouden worden dat kristalviolet behoort tot risicoklasse E4 (afvalcategorie 4, gehalogeneerd organisch afvalvloeistoffen) zonder vrijgave en dus ook extreem ontvlambaar is, mogelijks carcinogeen en schadelijk voor de vruchtbaarheid.

Digestie en ligatie zijn niet gevaarlijk, toch moet er met voorzichtigheid gehandeld worden, aangezien de bewaarcondities van zowel de restrictie-enzymen en buffer 0 als T4 DNA-ligase en 10x T4 DNA-ligase-buffer tot risicoklasse E1 behoren (Tris-HCl en DTT, beiden E1). Pure ethanol (afvalcategorie 3) tijdens ethanolzoutprecipitatie kan echter ernstige brandwonden veroorzaken.

Bij de polymerase-activiteitstest behoort NaOH tot risicoklasse E3 en kan ernstige brandwonden en oogletsel veroorzaken, net als HCl, om de kleuring te stoppen. HCl kan bovendien ook nog irritatie aan de luchtwegen veroorzaken.

Bij proteïne opzuivering behoort triton-X-100 tot risicoklasse E2 en veroorzaakt oogletsel. Imidazool kan irritatie veroorzaken en Ni^{2+} -NTA is ontvlambaar. SDS, DTT, Tris-HCl en PageRuler Unstained behoren tot risicoklasse E1 en veroorzaken irritatie. DTT wordt verwijderd in afvalcategorie 5, terwijl SDS in afvalcategorie 3 (niet-gehalogeneerd organische afvalvloeistoffen). Isopropanol, TEMED en APS behoren tot risicoklasse E3. Deze reagentia kunnen brandwonden, irritatie en slaperigheid of duizeligheid veroorzaken. Ze zijn bovendien licht ontvlambaar en APS is oxiderend. Acrylamide/bisacrylamide behoort tot risicoklasse E4 (zonder vrijgave) en is giftig, carcinogeen, irriterend, kan de vruchtbaarheid en organen schaden en kan genetische schade veroorzaken. Het moet verwijderd worden in afvalcategorie 3. Deze gevaren zijn ook van toepassing bij het bereiden van een 20 % ureum gel, waarbij extra rekening moet gehouden worden met het gebruik van een silylatie reagens, dat zeer corrosief en vluchtig is. Hiermee moet snel gehandeld worden en handschoenen moeten na gebruik onmiddellijk verwijderd worden.

Verder zijn er nog enkele risico's verbonden aan de kits waarmee gewerkt wordt. De *QIAquick Gel Extraction* Kit bevat QG en PE-buffer die behoren tot risicoklasse E2, elutiebuffer dat behoort tot risicoklasse E1 en ethanol en isopropanol die behoren tot risicoklasse E3. Bij de *GeneJet PCR purification* kit behoren ethanol, isopropanol en azijnzuur tot risicoklasse E3. Gevaarlijker is de bindingsbuffer, die guanidinium thiocynaat bevat, behorend tot risicoklasse E4 zonder vrijgave. De *plasmid DNA miniprep* kit tenslotte bevat resuspensie en elutiebuffer (beiden risicoklasse E1), lysis-, neutralisatie- en wasoplossing die behoren tot risicoklasse E2 en ethanol (E3).

Naast teveel blootstelling aan UV-licht te voorkomen, is het voor de fysische veiligheid ook belangrijk om handschoenen te dragen bij enerzijds producten te nemen uit de -80 °C vriezer als anderzijds bij het verhitten en verdelen van agarosegel in TAE-buffer. Ook het aanleggen van een elektrisch veld voor gelelektroforese vereist enige voorzichtigheid. Bij sonicatie is het belangrijk om handschoenen, oog- én oorbescherming te dragen. Bij de incorporatietesten met behulp van radioactiviteit (^{33}ATP , 3000 Ci/mmol), dient er steeds achter de plastieken schermen gewerkt te worden en met twee paar handschoenen.

De onderzoeken vinden plaats in een L1-laboratorium en het dragen van handschoenen, labo- en bril is verplicht om de eigen veiligheid (en die van anderen) te garanderen. Voor de gevaarlijke producten (risicoklasse E4) worden speciale maatregelen genomen door onder een trekkast te werken, met eventueel twee paar handschoenen.

BIJLAGE B

SELECTIE VOOR INCORPORATIE VAN ASP-DAMP EN ASP-DTMP MET VINGERDOMEINMUTANTEN VAN DNA-POLYMERASE THERMINATOR™

PAA-ANALYSE MET 88 LYSATEN NA DRIE CST-RONDES

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0674	0,0693	0,0636	0,9154	0,0652	0,0605	0,0665	0,0634	0,0659	0,1577	0,0714	0,0708
B	0,0646	0,0751	0,0676	0,1169	0,0576	0,0622	0,0634	0,0642	0,0636	0,0634	0,0645	2,1818
C	3,0904	0,0676	0,5476	0,0679	0,0665	0,0590	0,0602	0,0654	0,0608	0,0647	0,0709	0,0818
D	3,0182	0,0786	0,0748	0,0721	0,0641	0,0720	0,0666	0,1945	0,0723	0,0761	0,0789	0,0817
E	0,2445	0,0816	0,0664	0,0642	0,0645	0,0630	0,0673	0,0621	0,0731	0,0734	0,0740	0,0879
F	0,4082	0,0806	0,0560	0,0761	0,0865	0,0607	0,0610	0,0593	0,0720	0,0708	0,0681	0,0780
G	0,1141	0,0957	0,0628	0,0643	0,0602	0,0619	0,0638	0,0567	0,0760	0,0733	0,0775	0,0859
H	0,3391	0,0926	0,0680	0,0687	0,0681	0,0850	0,0719	0,0598	0,0736	0,0750	0,1236	0,0992

Figuur 1: Absorbantie gemeten bij 450 nm na een polymerase-activiteitstest voor incorporatie van Asp-dAMP (100 µM), dTTP, dGTP en dCTP (elk 100 µM) door 88 lysaten, afkomstig van 88 willekeurig gekozen individuele kolonies van vingerdomeinbibliotheek F na drie selectierondes met CST. In het geel zijn de varianten geselecteerd die een verbeterde incorporatie voor Asp-dAMP en/of Asp-dTMP (figuur 2) vertoonden (zie tekst voor details van selectie), vergeleken met het wild-type DNA-polymerase Terminator (rood). In het groen is een negatieve controle weergegeven waaraan geen polymerase werd toegevoegd en in het blauw zijn de resultaten na PAA weergegeven met het commercieel DNA-polymerase Terminator™ (2U) als polymerase.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0669	0,0705	0,0843	0,0788	0,0780	0,0720	0,0755	0,0742	0,0718	0,0905	0,066	0,0655
B	0,0665	0,0695	0,0695	0,2081	0,0704	0,0637	0,0828	0,0721	0,0649	0,0673	0,0662	0,1659
C	2,2857	0,0818	0,3095	0,0910	0,0714	0,0728	0,0833	0,0779	0,0670	0,0716	0,0765	0,0767
D	2,043	0,0824	0,0887	0,1082	0,0876	0,0748	0,0934	0,1355	0,0804	0,0749	0,0703	0,0862
E	0,1155	0,0818	0,0831	0,0825	0,1003	0,0776	0,1106	0,0998	0,0861	0,0793	0,0732	0,0733
F	0,1285	0,1006	0,0680	0,0862	0,0928	0,0876	0,0892	0,0887	0,0705	0,0814	0,0706	0,0696
G	0,1218	0,0754	0,081	0,1149	0,0962	0,1128	0,0898	0,0763	0,0694	0,0676	0,0686	0,0649
H	0,1190	0,0673	0,0710	0,0846	0,133	0,1469	0,0919	0,0928	0,0707	0,0737	0,0902	0,0724

Figuur 2: Absorbantie gemeten bij 450 nm na een polymerase-activiteitstest voor incorporatie van Asp-dTMP (100 µM), dATP, dGTP en dCTP (elk 100 µM) door 88 lysaten, afkomstig van 88 willekeurig gekozen individuele kolonies van vingerdomeinbibliotheek F na drie selectierondes met CST. In het geel zijn de varianten geselecteerd die een verbeterde incorporatie voor Asp-dAMP (figuur 1) en/of Asp-dTMP vertoonden (zie tekst voor details van selectie), vergeleken met het wild-type DNA-polymerase Terminator (rood). In het groen is een negatieve controle weergegeven waaraan geen polymerase werd toegevoegd en in het blauw zijn de resultaten na PAA weergegeven met het commercieel DNA-polymerase Terminator™ (2U) als polymerase.

PAA-ANALYSE MET 88 LYSATEN NA TWEE CST-RONDES

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0736	0,2076	0,0881	0,0849	0,0800	0,1337	0,0891	0,0767	0,1267	0,1012	0,2033	0,0681
B	0,0886	0,1074	0,0799	0,0877	0,0883	0,2128	0,4367	0,0944	0,1303	0,0941	0,0855	0,0715
C	2,2264	0,094	0,0783	0,0954	0,1041	0,1145	0,0806	0,0842	1,3557	0,1005	0,0704	0,0786
D	2,4174	0,2297	0,0867	0,1080	0,0934	0,1284	0,0930	0,127	0,2356	0,1189	0,0851	0,0900
E	0,6953	0,3919	0,1006	0,1262	0,0921	0,1085	0,0982	0,1657	0,4177	0,1479	0,0832	0,1280
F	1,4795	1,0174	0,1495	0,2006	0,3018	0,1398	0,1661	0,2392	0,4555	0,3885	0,1276	0,2316
G	2,1963	1,6793	0,1785	1,9735	0,1315	0,1409	0,1053	0,2949	0,9491	0,7046	0,2050	0,3662
H	2,9140	3,2848	0,2622	0,4234	0,2529	0,1952	0,0638	0,5548	1,4527	1,3874	0,5028	0,7230

Figuur 3: Absorbantie gemeten bij 450 nm na een polymerase-activiteitstest voor incorporatie van Asp-dAMP (100 µM), dTTP, dGTP en dCTP (elk 100 µM) door 88 lysaten, afkomstig van 88 willekeurig gekozen individuele kolonies van vingerdomeinbibliotheek F na twee selectierondes met CST. In het geel zijn de varianten geselecteerd die een verbeterde incorporatie voor Asp-dAMP en/of Asp-dTMP (figuur 4) vertoonden (zie tekst voor details van selectie), vergeleken met het wild-type DNA-polymerase Terminator (rood). Het WT polymerase vertoonde een relatief grote variatie en hiervoor is een gemiddelde OD₄₅₀-waarde van 1,8212 berekend. In het groen is een negatieve controle weergegeven waaraan geen polymerase werd toegevoegd en in het blauw zijn de resultaten na PAA weergegeven met het commercieel DNA-polymerase Terminator™ (2U) als polymerase.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,0993	0,1901	0,0804	0,0794	0,0744	0,0804	0,1042	0,0777	0,127	0,0828	0,0731	0,1349
B	0,0842	0,0915	0,0974	0,0855	0,0792	0,091	0,1051	0,0765	0,0803	0,0827	0,0891	0,0983
C	1,6925	0,0869	0,0834	0,0924	0,0834	0,0929	0,0909	0,0833	0,2081	0,0781	0,0797	0,0868
D	1,5605	0,0919	0,0917	0,0948	0,0888	0,0950	0,1161	0,0812	0,0888	0,0884	0,0936	0,0970
E	0,0911	0,0896	0,1112	0,0838	0,0818	0,0919	0,1356	0,0781	0,0882	0,0922	0,0921	0,0840
F	0,0922	0,0868	0,1325	0,0783	0,0875	0,0935	0,1983	0,0762	0,0911	0,121	0,1021	0,0959
G	0,108	0,0922	0,2383	0,3395	0,0784	0,1036	0,1859	0,0788	0,0889	0,1769	0,1016	0,0897
H	0,1272	0,1422	0,5357	0,1086	0,094	0,1070	0,2654	0,0831	0,1023	0,2886	0,1857	0,1232

Figuur 4: Absorbantie gemeten bij 450 nm na een polymerase-activiteitstest voor incorporatie van Asp-dTMP (100 µM), dATP, dGTP en dCTP (elk 100 µM) door 88 lysaten, afkomstig van 88 willekeurig gekozen individuele kolonies van vingerdomeinbibliotheek F na twee selectierondes met CST. In het geel zijn de varianten geselecteerd die een verbeterde incorporatie voor Asp-dAMP (figuur 3) en/of Asp-dTMP vertoonden (zie tekst voor details van selectie), vergeleken met het wild-type DNA-polymerase Terminator (rood). In het groen is een negatieve controle weergegeven waaraan geen polymerase werd toegevoegd en in het blauw zijn de resultaten na PAA weergegeven met het commercieel DNA-polymerase Terminator™ (2U) als polymerase.

BIOCHEMIE, MOLECULAIRE EN SYNTHETISCHE BIOLOGIE

Celestijnenlaan 200G bus 2413

3001 LEUVEN, BELGIË

tel. + 32 16 32 73 16

fax + 32 16 32 72 15

www.kuleuven.be

