

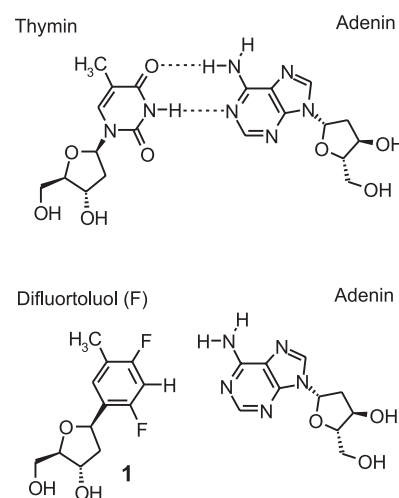
Selektivität der DNA-Replikation: Basenpaargeometrie wichtiger als Wasserstoffbrücken

Ulf Diederichsen*

Von den vielen Proteinen, die an der Replikation von DNA beteiligt sind, ist die Polymerase das zentrale Enzym. Sie ist verantwortlich für die Selektion und Verknüpfung der zu einem Templatstrang komplementären Nucleotide sowie für die nachträgliche Korrektur auftretender Basenfehlstellen. Eine hohe Selektivität ist Voraussetzung für die Integrität des Genoms über die Generationen.^[1] Die Wasserstoffbrückenbildung zwischen der zu übersetzenden Nucleobase und ihrem Nucleotidkomplementär ist eine informationsübertragende Wechselwirkung und scheint auf den ersten Blick die Selektivität zu bestimmen. Angesichts der vielen Kombinationsmöglichkeiten, die Nucleobasen für die Bildung von zwei oder drei Wasserstoffbrücken zur Verfügung stehen, und einer Fehlerhäufigkeit in der Duplikation eines *Escherichia coli*-Genoms von nur 10^{-9} – 10^{-10} pro Base kann die Basenpaarung nicht der alleinige Grund dieser Selektivität sein. Die Übertragungsgenauigkeit wird nicht nur von der hier zu besprechenden Auswahl der passenden Nucleotide, sondern auch von Exonuclease- und postreplikativen Mismatch-Reparaturprozessen bestimmt. Die in der ersten Stufe vollzogene Verknüpfung der Nucleotide erfolgt mit nur einer Mutation pro 10^3 – 10^5 eingebauter Nucleotide.^[2] Neben der Basenerkennung durch Wasserstoffbrückenbildung müssen für die hohe Selektivität folgende Faktoren diskutiert werden: 1. Basenstapelung, 2. Polarität der Basen und damit verbunden deren Solvation, 3. Geometrie der Erkennung (Paarungsmodus und Form der Basen), 4. DNA-Protein- und Protein-Substrat-Wechselwirkungen (dNTP-Substratbindung, geometrische Selektion, Phosphordiester-Bindungsbildung), 5. Enzymkinetik, 6. sequentielle Faktoren. Da noch nicht erwiesen ist, nach welchem Mechanismus die Nucleotide ausgewählt und eingebaut werden, gilt es, die Bedeutung der einzelnen Faktoren zu erfassen. Arbeiten aus der Gruppe von E. Kool beschreiben In-vitro-Replikationsexperimente, in denen an Stelle von Thymin das isostere Nucleobasen-Analogon Difluortoluol angeboten wird, dessen Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrücken weitgehend eingeschränkt ist.^[3–5] Da aber die Replikationsgenauigkeit bei Verwendung des Thymidin-

Mimetikums weitgehend erhalten bleibt, scheinen Formerkennung, Stapelung und Solvation bisher als Faktoren für die Nucleotidselektivität unterschätzt.

Der experimentelle Ansatz beruht auf Nucleosid **1**, das an Stelle des Thymins die isostere Pseudobase Difluortoluol (F) enthält.^[6] Eine Carboxamid-Funktionalität isoster durch eine Fluoroethylen-Einheit zu ersetzen, ist bereits in der Peptidchemie als Mimetikum und zur Konformationskontrolle etabliert.^[7] Tatsächlich konnte durch Kristallstrukturanalysen und NMR-Spektroskopie die strukturell hohe Übereinstimmung zwischen Nucleosid **1** und Thymidin gesichert werden (Schema 1).^[6a] Die C–F...H–N-Wasserstoffbrücke ist schwächer und eine C–H...N-Wechselwirkung deutlich schwächer



Schema 1. Difluortoluol (F) kann als Thymin-Isoster geometrisch in idealer Weise den Pyrimidin-Partner einer Watson-Crick-Paarung ersetzen. Die Tendenz zur Wasserstoffbrückenbildung ist für F deutlich herabgesetzt.

als die entsprechenden C=O...H–N- bzw. N–H...N-Wasserstoffbrücken.^[8] Eine Wechselwirkung von Difluortoluol mit Adenin wurde nicht einmal in Chloroform beobachtet,^[4] und ein A–F-Mismatch in der Mitte eines Dodecamer-Doppelstranges bewirkt im Vergleich zur A–T-Paarung eine Destabilisierung um 18 K.^[9] Das auf eine vernachlässigbare Wasserstoffbrückenbildung von Difluortoluol hindeutet. Es bleibt zu bedenken, daß der Arylrest des Isosters **1** nach ab-initio-

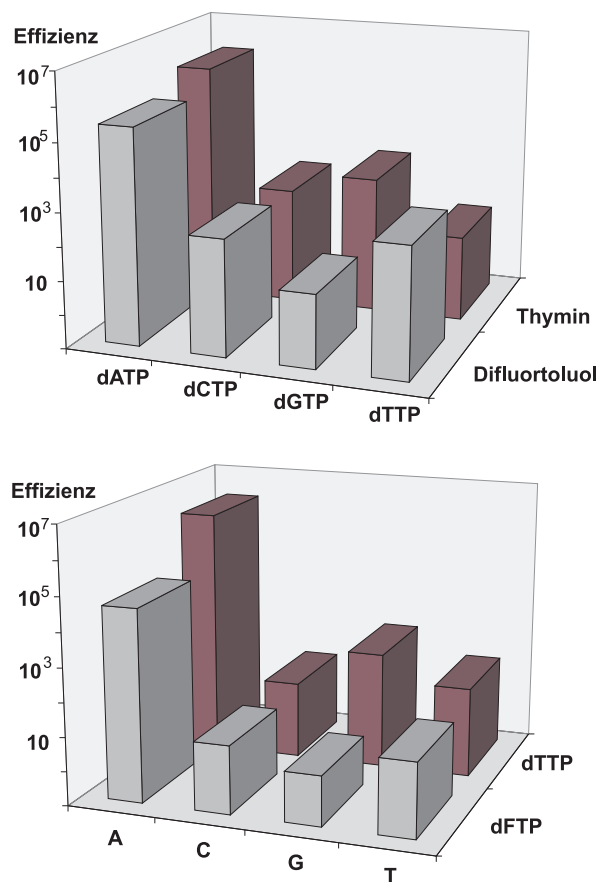
[*] Dr. U. Diederichsen
Institut für Organische Chemie und Biochemie
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, D-85747 Garching
Fax: (+ 49) 89-2891-3210
E-mail: ud@linda.org.chemie.tu-muenchen.de

Rechnungen (6-31G**) eine ähnliche Ladungsverteilung und Elektronendichte aufweist wie Thymin.^[10] Wasserstoffbrückenbildung ist insbesondere in enzymatischer Umgebung nicht auszuschließen, in der eine Ausrichtung der Protonendonoren und -acceptoren erzwungen werden kann. Für diesen Fall wird angenommen, daß eine F...H-X-Wechselwirkung nahezu die Hälfte des Beitrags einer O...H-X-Bindung erreicht.^[8c]

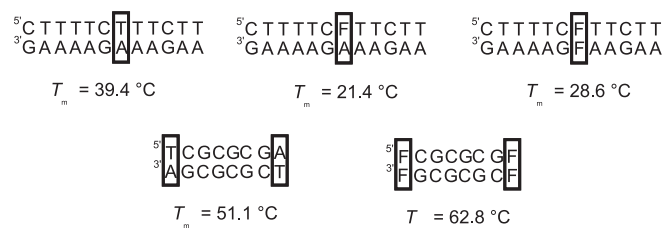
Durch Vergleich der Replikationsgenauigkeit von DNA-Templaten, die an Stelle eines Thyminrests die Pseudobase Difluortoluol enthalten, wurde die Bedeutung der Wasserstoffbrückenbildung mit dem komplementären Nucleotidtriphosphat untersucht.^[3] Die Replikation wurde beginnend an einer templatgebundenen Primer-Sequenz mit Hilfe des Klenow-Fragments aus DNA-Polymerase I durchgeführt und die Selektivität des Einbaus von dATP, dGTP, dTTP oder dCTP studiert.^[4] Für Difluortoluol und für Thymin zeigt sich eine ähnlich gute Selektivität hinsichtlich des Einbaus von dATP (Schema 2 oben). In beiden Fällen wird das Adenosinnucleotid als Komplementär mit einer über 1000fach höheren Effizienz als die übrigen Nucleotide eingebaut. Ein ganz ähnliches Bild ergibt sich für die Selektivität, in der die Nucleotidtriphosphate dTTP und dFTP in Abhängigkeit von ihrem Templatkomplementär erkannt und eingebaut werden (Schema 2 unten).^[5] Daß die Selektivitäten überraschend

ähnlich ausfallen, obwohl bei Difluortoluol von einer deutlich geringeren Tendenz zur Wasserstoffbrückenbildung als bei Thymin ausgegangen werden darf, deutet auf einen geringfügigen Beitrag der Wasserstoffbrücken für die Erkennung der komplementären Einheit hin. Wichtige Auswahlkriterien für die Polymerase scheinen vielmehr die in beiden Fällen sehr ähnliche Form der Arylreste sowie ähnliche Vorzugskonformation und Ladungsverteilung zu sein. Dieses Ergebnis ist in Einklang mit der von Echols und Goodman vorgeschlagenen „geometrischen Selektion“ als wichtigem Parameter für die Insertionsspezifität.^[11] Auswahlkriterium ist danach die Basenpaargeometrie, die durch den Paarungsmodus gegeben ist und sich in den Abständen der anomeren Zentren und den Bindungswinkeln widerspiegelt.

Welche Bedeutung haben Solvation und Stapelung für die Eignung von Nucleosid **1** als isosteres Mimetikum? Der Vergleich von Stabilitäten regulärer Doppelstränge mit Duplexen, die A-F- oder F-F-Mismatch-Positionen enthalten, belegt den grundsätzlichen Einfluß beider Faktoren (Schema 3):^[9] Der Ersatz eines A-T-Basenpaares durch einen A-F-Mismatch destabilisiert den Doppelstrang stark (die Schmelz-



Schema 2. Oben: Effizienz (v_{\max}/K_m), mit der die kanonischen Nucleotidtriphosphate als Komplementäre zu Thymin oder Difluortoluol eingebaut werden.^[4] Unten: Vergleich der Effizienz des Einbaus von dTTP und dFTP gegenüber den A-, C-, G- oder T-Templatbasen.^[5]



Schema 3. Auswirkung von Difluortoluol-Fehlpaarungen auf die Doppelstrangstabilitäten von DNA-Dodecameren (1.5 μM , 100 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM Na-PIPES, pH 7) und -Octameren (6 μM , 1M NaCl, 10 mM Na-Phosphat, pH 7).^[9]

temperatur T_m sinkt um 18 K), während ein F-F-Mismatch T_m nur um 11 K sinken läßt, was wesentlich auf Solvations- und Stapelungsbeiträgen beruhen dürfte. Difluortoluol ist in wäßriger Lösung weder im Einzel- noch im Doppelstrang stark solvatisiert, im A-T-Basenpaar wird die Solvation durch Basenpaarung kompensiert, während ein Doppelstrang mit Adenin im A-F-Mismatch seine Wasserstoffbrücken zum Wasser ohne entsprechenden Ausgleich verliert. Die Bedeutung der Stapelung zeigt sich anhand von Modifikationen der terminalen Positionen des Doppelstranges:^[9] Das Oktamer mit zwei F-F-Mismatch-Positionen ist wesentlich stabiler (T_m steigt um 12 K) als das Oligomer, das terminal A-T gepaart ist; dies zeigt eindrucksvoll, daß Difluortoluol einen höheren Stapelungsbeitrag aufweist als Adenin.^[12]

Polymerasen scheinen in hohem Maße die Form der Basen, deren Polarität und die Erfüllung der Watson-Crick-Geometrie zur Selektion heranzuziehen. Dieses Resultat steht in vollkommener Übereinstimmung mit den kürzlich von Doublé et al.^[13] und Kiefer et al.^[14] publizierten Ergebnissen zweier Strukturanalysen von Cokristallisaten der DNA-Polymerase mit einem DNA-Templat-Primer-Doppelstrang.^[15] Einerseits konnte durch das Fehlen der terminalen 3'-Hydroxygruppe des Primers der ternäre Komplex im Kristall mit einem Nucleotidtriphosphat stabilisiert werden,^[13] andererseits

konnte gezeigt werden, daß selbst im Kristall der Polymerase-Templat-Primer-Komplex seine katalytische Aktivität und Selektivität gegenüber dem Basenkomplementär behält.^[14] Ohne im einzelnen auf die Kristallstrukturen und den Mechanismus der Phosphordiester-Bindungsbildung einzugehen, sollen drei Merkmale mit Auswirkung auf die Selektivität herausgestellt werden:

1. Das eintretende Nucleotidtriphosphat wird im aktiven Zentrum durch streng konservierte Aminosäuren in einer engen Tasche gehalten, so daß es gegenüber der komplementären Nucleobase in Watson-Crick-Orientierung gelangt. Die Templatbase wird dabei durch Stapelung mit der benachbarten Nucleobase und auf der anderen Seite mit einem Tyrosinrest oder durch van-der-Waals-Kontakt mit Glycin fixiert.

2. Es gibt für den DNA-Doppelstrang neben der unspezifischen Erkennung des polyanionischen Rückgrats eine weitere sequenzunabhängige Wasserstoffbrücken-Erkennung der ersten vier oder fünf an das aktive Zentrum anschließenden Basenpaare auf der der kleinen Furche zugewandten Seite. Aminosäuren mit Protonendonator-Eigenschaft erkennen die Acceptorpositionen N3 im Purin und O2 im Pyrimidin (Schema 4). Das A-T- und das G-C-Paar weisen beide dieses

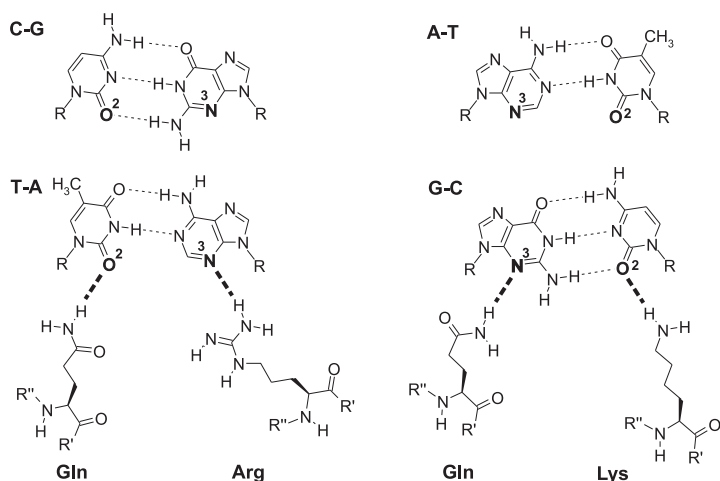
grundsätzlich wichtig für das Entlanggleiten des Doppelstranges in der Enzymtasche mit fortlaufender Synthese.

3. Daß die Funktionsfähigkeit und Selektivität der Polymerase im Kristall erhalten bleibt, unterstreicht, wie exakt die beteiligten Moleküle ausgerichtet sein müssen.

Im Ergebnis gilt als Bedingung für Pseudobasen, die an Stelle einer kanonischen Nucleobase mit ähnlicher Selektivität eingebaut werden sollen, daß die entsprechenden Nucleotidtriphosphat-Analoga zu dNTP isoster mit möglichst ähnlicher Konformation sein sollten und einen Arylrest als Basenersatz aufweisen müssen, der sich durch gute Stapelwechselwirkungen sowie durch Acceptorfunktionalitäten in der Pseudo-N3- und O2-Position auszeichnet. Das Difluorotoluol-Nucleosid **1** erfüllt diese Ansprüche, so daß es folgerichtig von Polymerase als Watson-Crick-Paarungsmimetikum erkannt und mit hoher Selektivität eingebaut wird.

Stichwörter: Basenstapelung • DNA-Replikation • Geometrische Selektion • Isostere Nucleobasen • Wasserstoffbrücken

- [1] a) D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, VCH, Weinheim, **1992**; b) P. Strazewski, C. Tamm, *Angew. Chem.* **1990**, *102*, 37–59; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, *29*, 36–67.
- [2] A. L. Loeb, T. A. Kunkel, *Annu. Rev. Biochem.* **1982**, *52*, 429–457.
- [3] D. Liu, S. Moran, E. T. Kool, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 919–926.
- [4] S. Moran, R. X.-F. Ren, S. Rumney IV, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2056–2057.
- [5] S. Moran, R. X.-F. Ren, E. T. Kool, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10506–10511.
- [6] a) K. M. Guckian, E. T. Kool, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2942–2959; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2825–2828; b) X.-F. Ren, B. A. Schweitzer, C. J. Sheils, E. T. Kool, *ibid.* **1996**, *108*, 834–837 bzw. **1996**, *35*, 743–746.
- [7] a) T. Allmendinger, E. Felder, E. Hungerbühler, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 7301–7304; b) L. G. Boros, B. De Corte, R. H. Gimi, J. T. Welch, Y. Wu, R. E. Handschumacher, *ibid.* **1994**, *35*, 6033–6036; c) P. A. Bartlett, A. Otake, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 3107–3111.
- [8] a) J. A. K. Howard, V. J. Hoy, D. O'Hagan, G. T. Smith, *Tetrahedron* **1996**, *52*, 12613–12622; b) G. R. Desiraju, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2541–2558; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2311–2327; c) W. L. Jorgensen, D. L. Severance, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4768–4774.
- [9] B. A. Schweitzer, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1863–1872.
- [10] T. A. Evans, K. R. Seddon, *Chem. Commun.* **1997**, 2023–2024.
- [11] a) M. F. Goodman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10493–10495; b) H. Echols, M. F. Goodman, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, *60*, 477–511.
- [12] Zur Stapelung von Arenen vergleiche auch: K. M. Guckian, B. A. Schweitzer, R. X.-F. Ren, C. J. Sheils, P. L. Paris, D. C. Tahmassebi, E. T. Kool, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 8182–8183.
- [13] S. Doublié, S. Tabor, A. M. Long, C. C. Richardson, T. Ellenberger, *Nature* **1998**, *291*, 251–258.
- [14] J. R. Kiefer, C. Mao, J. C. Braman, L. S. Beese, *Nature* **1998**, *291*, 304–307.
- [15] Für eine weitere Kristallstrukturanalyse eines ternären Komplexes aus DNA-Polymerase, DNA-Templat-Primer und dCTP vergleiche: H. Pelletier, M. R. Sawaya, A. Kumar, S. H. Wilson, J. Kraut, *Science* **1994**, *264*, 1891–1903; siehe auch den Kommentar: T. A. Steitz, *Nature* **1998**, *291*, 231–232.
- [16] N. C. Seeman, J. M. Rosenberg, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, *73*, 804–808.



Schema 4. O2 bei Pyrimidinen und N3 bei Purinen sind Protonenacceptoren und weisen in DNA-Doppelsträngen in die kleine Furche. Sie unterscheiden sich kaum in ihrer Wasserstoffbrückenakzeptanz und sind im Basenpaar quasi symmetrisch angeordnet. Die Erkennung von O2 und N3 durch Asn, Gln, Arg, His oder Lys ist selektiv für Watson-Crick-Paarung.

Doppelacceptor-Muster auf, und zwar unabhängig davon, ob Purin oder Pyrimidin als Templat fungiert.^[16] Diese Wechselwirkung kann den Watson-Crick-Paarungsmodus von allen übrigen Paarungsgeometrien unterscheiden. Entsprechende Wasserstoffbrücken der Polymerase in der großen Furche, in der jedes Basenpaar ein individuelles Donor/Acceptor-Muster aufweist, gibt es nicht. Die unspezifische Erkennung ist