

Selektivität von DNA-Polymerasen: hochselektive Nucleotide zur Untersuchung von Wechselwirkungen mit dem Zucker**

Daniel Summerer und Andreas Marx*

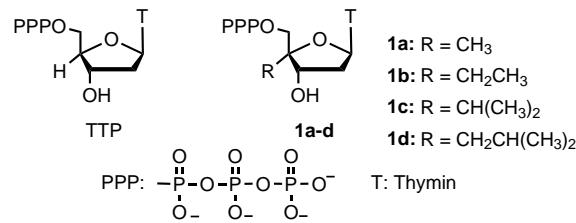
Eine Voraussetzung für das Überleben jedes Organismus ist die Konservierung seines Genoms und dessen exakte Verdopplung vor der Zellteilung. Die gesamte DNA-Synthese in der DNA-Reparatur, -Rekombination und -Replikation hängt von der Fähigkeit der DNA-Polymerasen ab, eine Matrize zu erkennen und komplementäre Nucleotide selektiv zu inkorporieren. Gemäß einem aktuellen Modell wird diese Selektivität durch die Selektion von Nucleobasen richtiger Größe und Gestalt durch DNA-Polymerasen erreicht.^[1] Dieses Modell wird weiter durch Kristallstrukturanalysen von DNA-Polymerasen gestützt, welche die Bildung von Nucleotid-Bindungstaschen vermuten lassen, die ausschließlich Watson-Crick-paarende Nucleotide akzeptieren.^[2] Um die Mechanismen, die zur fehlerhaften DNA-Synthese führen, besser verstehen zu können, wären Kristallstrukturanalysen ternärer Komplexe von DNA-Polymerasen mit einem nichtkanonischen Triphosphat sehr hilfreich. Solche Strukturanalysen wurden bisher nicht beschrieben, sodass sich Untersuchungen zur Funktionalität von DNA-Polymerasen mit Nucleotid-Analoga als sehr nützlich zum besseren Verständnis dieser komplexen Prozesse herausgestellt haben.^[1] Da sich bisherige Studien zur Funktion meist auf die Untersuchung von Prozessen der Basenerkennung konzentrierten,^[1] ist über den Beitrag von Wechselwirkungen zwischen DNA-Polymerasen und der 2'-Desoxyriboseeinheit zur Selektivität wenig bekannt. Auf der Basis einiger Kristallstrukturanalysen von DNA-Polymerasen und Untersuchungen mit Enzymmutanten wird angenommen, dass die Zuckereinheit eines eintretenden Nucleosidtriphosphats in der Nucleotidbindungstasche eingebettet ist und essentielle Wechselwirkungen mit dem Enzym eingeht.^[1a,2] Wir beschreiben im Folgenden eine Strategie zur Erfassung von sterischen Wechselwirkungen zwischen DNA-Polymerasen und der Zuckereinheit eines eintretenden Nucleosidtriphosphats. Wir fanden, dass neuartig modifizierte Nucleotide Substrate für eine DNA-Polymerase sind, die im Vergleich zu ihrem natürlichen Gegenstück mit signifikant höherer Selektivität eingebaut werden. Durch Verwendung dieser hochselektiven Nucleotide in Untersuchungen zur Funktion konnten wir zeigen, dass Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und dem Zucker die Selektivität einer DNA-Polymerase mitbestimmen.

[*] Dr. A. Marx, Dipl.-Chem. D. Summerer
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Universität Bonn
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)
Fax: (+49) 228-73-5388
E-mail: a.marx@uni-bonn.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert. Wir danken Herrn Professor Dr. Michael Famulok für seine Unterstützung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

Um diese Wechselwirkungen erfassen zu können, führten wir Alkylsubstituenten als Sonden an der 4'-Position der 2'-Desoxyribose in der Art ein, dass sie Wasserstoffbrückenbindungen sowie die Nucleobasenpaarung und -stapelung nicht behindern. Wir entwarfen die sterischen Sonden **1a–d** durch Substitution des 4'-Wasserstoffatoms von Thymidintriphosphat (TTP) durch Alkylgruppen unterschiedlicher Größe (Schema 1).

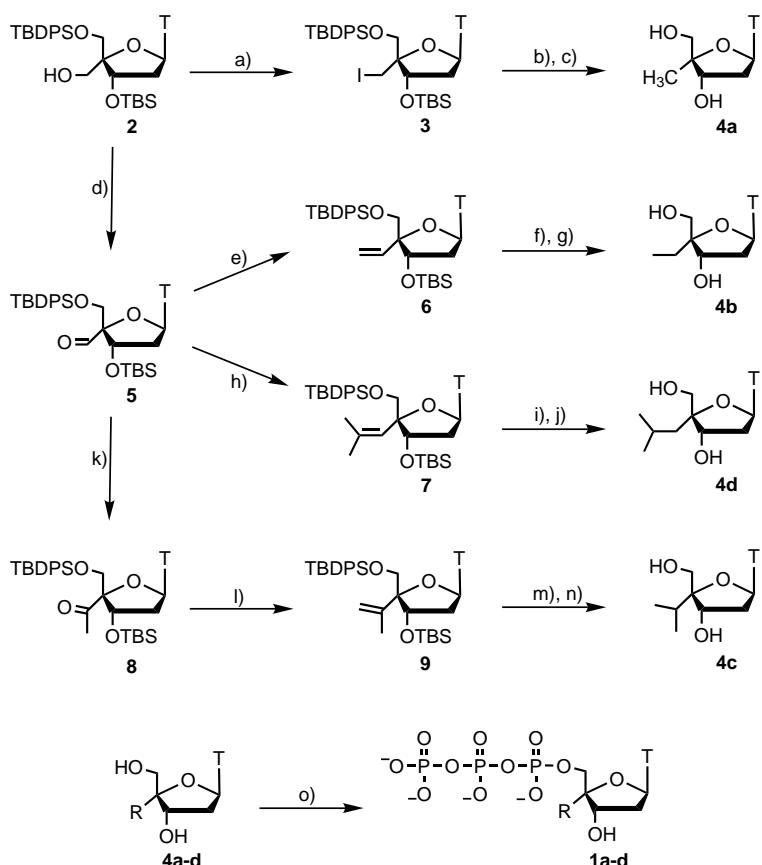


Schema 1. Thymidin-5'-triphosphat (TTP) und die sterischen Sonden **1a–d**.

Die Nucleoside **4a** und **4b** (siehe Schema 2) wurden bereits nach unterschiedlichen Synthesestrategien hergestellt.^[3, 4] Diese Methoden sind jedoch nicht für die Synthese aller gewünschten Verbindungen geeignet. Ferner traten bei der Synthese von **4a** unerwünschte Nebenprodukte auf.^[3] Daher entwickelten wir einen geeigneteren Zugang zu den Zielverbindungen. Unsere Synthese beginnt mit dem bekannten, leicht zugänglichen Alkohol **2**.^[5] Dieser wurde durch Funktionsgruppenumwandlungen in methyliertes Thymidin **4a** überführt (Schema 2). Die alkylierten Nucleoside **4b–d** wurden ausgehend von bekannten Verbindungen^[5] durch Wittig-Reaktion, Desilylierung und Reduktion der aliphatischen Doppelbindungen erhalten. Anschließend wurden die Nucleoside **4a–d** nach Standardverfahren in die gewünschten Triphosphate **1a–d** überführt.^[6] Um Einblicke in den Einfluss der Modifikationen auf die Zuckerkonformation erhalten zu können, führten wir eine ¹H-NMR-Konformationsanalyse nach bekannten Methoden durch,^[7] die nur geringe Unterschiede zwischen **1a–d** und natürlichem TTP ergab. Dies lässt auf ähnliche Zuckerkonformationen der Thymidine in Lösung schließen (siehe Hintergrundinformationen).

Wir untersuchten den Effekt der Sonden **1a–d** auf das Klenow-Fragment von *E. coli*-DNA-Polymerase I (*exo*⁻-Mutante; KF^-), einem Enzym, das sehr häufig als Modell zur Untersuchung der intrinsischen Mechanismen und Funktionen von DNA-Polymerasen verwendet wird.^[1] Zur Verfolgung der DNA-Polymerasereaktion verwendeten wir ein Gelanalyse-Testsystem,^[8] in dem ein Adeninrest in der Nachbarschaft zum 3'-Primerende den Einbau eines Thymidin-Derivates kodiert.^[9] Abbildung 1A zeigt das Einbaumuster, welches durch den KF^- -katalysierten Einbau von TTP und **1a–d** erhalten wurde. Den Ergebnissen zufolge werden **1a–d** als Substrate mit unterschiedlichen Effizienzen verwendet.

Um diese Befunde zu quantifizieren, bestimmten wir die Einbaueffizienzen (v_{max}/K_M ; v_{max} = Maximalgeschwindigkeit der Enzymreaktion, K_M = Michaelis-Konstante) der Thymidin-Derivate durch Untersuchung des Einbaus eines einzel-



Schema 2. Synthese von **1a-d**. a) Ph_3P , I_2 , Imidazol, C_6H_6 , 50°C , 85%; b) Pd/C , H_2 , EtOH , EtOAc , NEt_3 ; c) TBAF, THF, 79% (beide Schritte); d) Oxidation^[5]; e) $\text{CH}_3\text{PPh}_3\text{Br}$, $n\text{BuLi}$, THF, -78 bis 25°C , 99%; f) TBAF, THF; g) Pd/C , H_2 , CH_3OH , 88% (beide Schritte); h) $(\text{CH}_3)_2\text{CHPPh}_3\text{I}$, $n\text{BuLi}$, THF, -78 bis 25°C , 83%; i) TBAF, THF; j) Pd/C , H_2 , CH_3OH , 94% (beide Schritte); k) Alkylierung und Oxidation^[5]; l) $\text{CH}_3\text{PPh}_3\text{Br}$, $t\text{BuOK}$, THF, 25°C , 91%; m) TBAF, THF; n) Pd/C , H_2 , CH_3OH , 84% (beide Schritte); o) POCl_3 , 1,8-Bis(dimethylamino)naphthalin, $(\text{CH}_3\text{O})_2\text{PO}$, 0°C , dann $(n\text{Bu}_3\text{NH})_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$, $n\text{Bu}_3\text{N}$, DMF, dann 0.1M wässr. $(\text{Et}_3\text{NH})\text{HCO}_3$, 23–68%. TBS = *tert*-Butyldimethylsilyl, TBDPS = *tert*-Butyldiphenylsilyl, TBAF = Tetrabutylammoniumfluorid.

nen Nucleotids bei verschiedenen Nucleotidkonzentrationen unter Single-completed-hit- und Steady-state-Bedingungen wie kürzlich beschrieben.^[8, 10–12] Die quantitative Analyse ergab, dass KF^- **1a** und **1b** mit nahezu der gleichen Effizienz einbaut wie unmodifiziertes TTP (Tabelle 1). Die 4'-Methyl- und die 4'-Ethylgruppe können demzufolge gut in der

Tabelle 1. Kinetische Analyse unter Steady-State-Bedingungen für den Einbau kanonischer Nucleosidtriphosphate. Die aufgeführten Daten sind Durchschnittswerte aus zwei oder drei gleichartig durchgeführten Experimenten. Weitere experimentelle Einzelheiten siehe Hintergrundinformationen.

Nucleosid-triphosphat	K_M [μM]	v_{\max} [min ⁻¹ 10 ⁻³]	v_{\max}/K_M [M ⁻¹ min ⁻¹]
TTP	0.11 ± 0.05	20 ± 3	180 000
1a	0.40 ± 0.01	58 ± 4	150 000
1b	0.21 ± 0.01	29 ± 5	140 000
1c	47 ± 4	85 ± 5	1 800
1d	241 ± 22	76 ± 1	320

Nucleotid-Bindungstasche von KF^- aufgenommen werden. Die sterisch anspruchsvolleren Sonden **1c** und **1d** wurden signifikant schlechter eingebaut. Der durchgeführten Konformationsanalyse zufolge ist dies hauptsächlich auf den größeren sterischen Anspruch der Modifikationen zurückzuführen.

Da das Verhältnis der Effizienzen des Nucleotid-einbaus gegenüber einer komplementären und gegenüber einer nichtkomplementären Nucleobase ein Maß für die Selektivität einer DNA-Polymerase ist, untersuchten wir als Nächstes die Fähigkeit von KF^- , die Bildung von nicht Watson-Crick-gepaarten Nucleobasen zu katalysieren. Wir prüften hier lediglich **1a** und **1b**, da nur diese mit ähnlicher Effizienz wie TTP von KF^- zur kanonischen Basenpaarbildung verwendet werden. Diese Sonden sollten daher ideal geeignet sein, unterschiedliche Enzymwechselwirkungen beim Einbau und Fehleinbau anzuzeigen. Untersuchungen des Nucleotideinbaus gegenüber von G, T und C ergaben, dass KF^- TTP und **1a**, **1b** gegenüber von G mit der höchsten Effizienz einbaut.^[9, 13] Schon aus den in Abbildung 1B gezeigten Ergebnissen wird ersichtlich, dass **1a** und **1b** eine wesentlich geringere Fehleinbau-Effizienz haben. Quantitative Untersuchungen ergaben eine ungefähr 100fach geringere Effizienz des Fehleinbaus bei Verwendung der 4'-alkylierten Sonden **1a**, **1b** im Vergleich mit TTP (Tabelle 2).

Die Analoga **1a** und **1b** werden auch gegenüber von T oder C mit geringerer Effizienz als nichtmodifiziertes TTP eingebaut (siehe Hintergrundinformationen). Dies zeigt eindeutig,

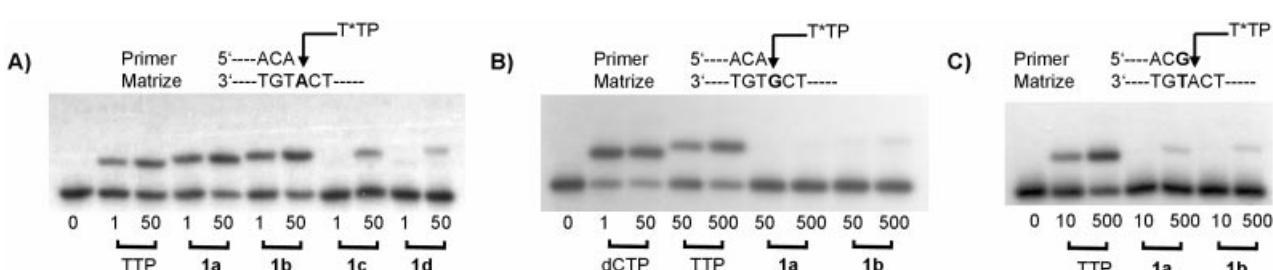


Abbildung 1. KF^- -katalysierter Einbau von Nucleosidtriphosphaten: A) Einbau kodiert durch Adenin (A) im Matrizenstrang; Bedingungen: Primer/Matrizen-Komplex (50 nm), KF^- (2 nm), 37°C , 5 min; die Nucleotidkonzentrationen [μM] sind jeweils unter den Gelbändern angegeben. B) Einbau kodiert durch Guanin (G) im Matrizenstrang; Bedingungen: Primer/Matrizen-Komplex (50 nm), KF^- (4 nm), 37°C , 5 min; die Nucleotidkonzentrationen [μM] sind jeweils unter den Gelbändern angegeben. C) Fehlpaaarungs-Verlängerung; Bedingungen: Primer/Matrizen-Komplex (50 nm), KF^- (2 nm), 37°C , 20 min; die Nucleotidkonzentrationen [μM] sind jeweils unter den Gelbändern angegeben. Weitere experimentelle Einzelheiten und die verwendeten DNA-Sequenzen sind in den Hintergrundinformationen beschrieben.

Tabelle 2. Kinetische Analyse unter Steady-State-Bedingungen für den Fehleinbau und die Fehlpaarungs-Verlängerung von Nucleosidtriphosphaten. Die aufgeführten Daten sind Durchschnittswerte aus zwei oder drei gleichartig durchgeführten Experimenten. Weitere experimentelle Einzelheiten siehe Hintergrundinformationen.

Nucleosid-triphosphat	K_M [μM]	v_{max} [min ⁻¹ 10 ⁻³]	v_{max}/K_M [M ⁻¹ min ⁻¹]
<i>Fehleinbau:</i>			
TPP	22 ± 0.2	16 ± 1	730
1a	65 ± 5	0.34 ± 0.02	5
1b	228 ± 5	1.7 ± 0.1	7
<i>Fehlpaarungs-Verlängerung:</i>			
TPP	19 ± 1	36 ± 2	1900
1a	80 ± 17	2.9 ± 0.1	40
1b	40 ± 5	4.0 ± 0.3	100

dass die Selektivität des Nucleotideinbaus durch Substitution des 4'-Wasserstoffatoms durch sterisch anspruchsvollere Alkylgruppen erhöht wird.

Die zweite wichtige Bestimmungsgröße der intrinsischen Selektivität von DNA-Polymerasen ist die Fähigkeit zur Verlängerung fehlgepaarter Primer/Matrizen-Enden.^[1a, 8, 11] **1a** und **1b** sollten auch hier ideal dazu geeignet sein, unterschiedliche Wechselwirkungen der DNA-Polymerase mit dem Zucker in Fehlpaarungs-Verlängerungen zu erfassen. Wir überprüften daher die Fähigkeit von KF⁻, fehlgepaarte 3'-Primerenden durch den Einbau von TPP oder **1a, b** zu verlängern. Wir untersuchten die Verlängerung von Matrizen-T/Primer-G, T/T sowie T/C und fanden, dass die T/G-Fehlpaarung am effizientesten verlängert wurde (die Daten für T/G sind in Abbildung 1C gezeigt).^[9, 13] Die Ergebnisse der quantitativen Analyse der T/G-Verlängerung (Tabelle 2) deuten darauf hin, dass KF⁻ T/G-fehlgepaarte Primerenden mit den Sonden **1a, b** mit signifikant geringerer Effizienz verlängert. Diese Resultate unterscheiden sich von denen, die mit kanonisch gepaarten Primerenden erhalten wurden (siehe Tabelle 1). Unsere Befunde lassen vermuten, dass Nucleobasen-Fehlpaarungen an den 3'-Enden der Primer/Matrizen-Komplexe zu ungünstigen Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Zuckereinheiten der eintretenden Nucleosidtriphosphate führen und so den unerwünschten Einbau von nichtkanonischen Basen in den entstehenden DNA-Strang verhindern. Dieser Mechanismus könnte wichtig für die Fehlkorrektur durch andere Funktionen wie eine intrinsische Exonuclease-Aktivität oder die Dissoziation des DNA-Replikationskomplexes sein.

Die Selektivität des Einbaus eines Nucleotids durch eine DNA-Polymerase kann durch modifizierte Zuckereinheiten signifikant erhöht werden. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen der DNA-Polymerase und den Zuckereinheiten so zur Selektivität der DNA-Synthese beitragen. Mit der hier beschriebenen, neuen und breit anwendbaren Methode können sterische Einflüsse in Nucleotid-Bindungstaschen von DNA-Polymerasen erfasst werden. Weitere Untersuchungen mit derartigen sterischen Sonden, sowohl auf funktioneller als auch auf struktureller Ebene, sollten neue Einblicke in die Selektivität von DNA-Polymerasen eröffnen.

- [1] Übersichten und Kommentare: a) T. A. Kunkel, K. Bebenek, *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 497–529; b) E. T. Kool, J. C. Morales, K. M. Guckian, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1046–1068; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 991–1009; c) T. A. Kunkel, S. H. Wilson, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 95–99; d) U. Diederichsen, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 1745–1747; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1655–1657; e) M. F. Goodman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10493–10495.
- [2] a) S. Doublie, S. Tabor, A. M. Long, C. C. Richardson, T. Ellenberger, *Nature* **1998**, *391*, 251–258; b) Y. Li, S. Korolev, G. Waksman, *EMBO J.* **1998**, *17*, 7514–7525; c) J. R. Kiefer, C. Mao, J. C. Braman, L. S. Beese, *Nature* **1998**, *391*, 304–307; d) H. F. Huang, R. Chopra, G. L. Verdine, S. C. Harrison, *Science* **1998**, *282*, 1669–1675; e) H. Pelletier, M. R. Sawaya, A. Kumar, S. H. Wilson, J. Kraut, *Science* **1994**, *264*, 1891–1903.
- [3] C. O-Yang, W. Kurz, E. M. Eugui, M. J. McRoberts, J. P. H. Verheyden, L. J. Kurz, K. A. M. Walker, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 41–44.
- [4] I. Sugimoto, S. Shuto, S. Mori, S. Shigeta, A. Matsuda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 385–388.
- [5] A. Marx, P. Erdmann, M. Senn, S. Körner, T. Jungo, M. Petretta, P. Imwinkelried, A. Dussy, K. J. Kulicke, L. Macko, M. Zehnder, B. Giese, *Helv. Chim. Acta* **1996**, *79*, 1980–1994.
- [6] T. Kovács, L. Ötvös, *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4525–4528; neuere Übersicht: K. Burgess, D. Cook, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 2047–2059.
- [7] L. J. Rinkel, C. Altona, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1987**, *4*, 621–648.
- [8] S. Creighton, L. B. Bloom, M. F. Goodman, *Methods Enzymol.* **1995**, *262*, 232–256.
- [9] Experimentelle Einzelheiten und die in den In-vitro-Replikations-Testsystemen verwendeten DNA-Sequenzen sind in den Hintergrundinformationen aufgeführt.
- [10] M. S. Boosalis, J. Petruska, M. F. Goodman, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 14689–14696.
- [11] M. F. Goodman, S. Creighton, L. B. Bloom, J. Petruska, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1993**, *28*, 83–126.
- [12] Quantitative Untersuchungen der Wirkung 4'-modifizierter Nucleosidtriphosphate auf HIV-1-Reverse-Transkriptase und zelluläre DNA-Polymerasen wurden kürzlich beschrieben. 4'-C-Azidothymidintriphosphat: M. S. Chen, R. T. Suttmann, E. Papp, P. D. Cannon, M. J. McRoberts, C. Bach, W. C. Copeland, T. S.-F. Wang, *Biochemistry* **1993**, *32*, 6002–6010; 4'-C-Acetylthymidintriphosphat: a) A. Marx, M. Spichty, M. Amacker, U. Schwitter, U. Hübscher, T. A. Bickle, G. Maga, B. Giese, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 111–116; b) A. Marx, M. Stucki, M. Amacker, U. Hübscher, T. A. Bickle, B. Giese, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 4063–4067.
- [13] Die Ergebnisse, die mit TPP erhalten wurden, stimmen mit publizierten Daten überein: a) C. M. Joyce, X. C. Sun, N. D. F. Grindley, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 24485–24500; b) S. S. Carroll, M. Cowart, S. J. Benkovic, *Biochemistry* **1991**, *30*, 804–813; c) K. Bebenek, C. M. Joyce, M. P. Fitzgerald, T. A. Kunkel, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 13878–13887.

Eingegangen am 14. Mai 2001 [Z17101]