

265. Nucleoside und Nucleotide. Teil 16. Verhalten von 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidinon-5'-triphosphat, 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)pyridinon-5'-triphosphat und 4-Amino-1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridinon-5'-triphosphat gegenüber DNA-Polymerase¹⁾

von Michael Wachtl, Peter Kohler und Christoph Tamm²⁾

Institut für Organische Chemie der Universität, St. Johannis-Ring 19, CH-4056 Basel

(8.IX.80)

Nucleosides and Nucleotides. Part 16. The Behaviour of 1-(2'-Deoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidinone-5'-triphosphate, 1-(2'-Deoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridinone-5'-triphosphate and 4-Amino-1-(2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridinone-5'-triphosphate towards DNA Polymerase

Summary

The behaviour of nucleotide base analogs in the DNA synthesis *in vitro* was studied. The investigated nucleoside-5'-triphosphates 1-(2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidinone-5'-triphosphate (pppM_d), 1-(2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridinone-5'-triphosphate (pppP_d) and 4-amino-1-(2'-deoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1H)-pyridinone-5'-triphosphate (pppZ_d) can be considered to be analogs of 2'-deoxy-cytidine-5'-triphosphate. However, their ability to undergo base pairing to the complementary guanine is decreased. When pppM_d, pppP_d or pppZ_d are substituted for pppC_d in the enzymatic synthesis of DNA by DNA polymerase no incorporation of these analogs is observed. They exhibit only a weak inhibition of the DNA synthesis. The mode of the inhibition is uncompetitive which shows that these nucleotide analogs cannot serve as substrates for the DNA polymerase.

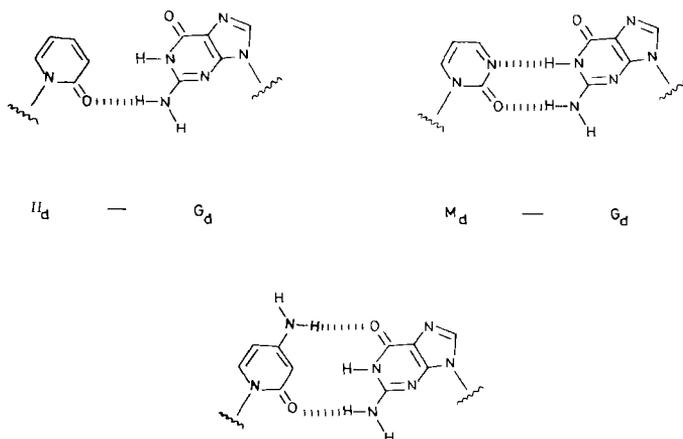
1. Einleitung. – Im Jahre 1958 haben *Bessman et al.* [2] zum ersten Mal gezeigt, dass es möglich ist, bestimmte Nucleotid-Analoga, deren Basen modifiziert sind, in eine Desoxyribonucleinsäure (DNA) mit Hilfe der DNA-Polymerase einzubauen. Dabei ist die Art der Modifikation von entscheidender Bedeutung. Bestimmte Strukturveränderungen der Base an Stellen, die an der Ausbildung der Wasserstoffbrücken gemäss dem *Watson-Crick* Modell [3] nicht beteiligt sind, verursachen keine Änderung des Verhaltens dieser Nucleotide bzw. Nucleosid-5'-triphosphate gegenüber dem Enzym; es akzeptiert sie als Substrate. An C(5) substituierte Uridine

¹⁾ Teil 15, s. [1].

²⁾ Korrespondenz-Autor.

und Cytidine erwiesen sich als gute Substrate der DNA-Polymerase und dienen als interessante Modelle für die Untersuchung der DNA-Synthese *in vitro* [4]. Dagegen zeigten Purin-nucleosid-5'-triphosphate, die an der Base eine verminderte Fähigkeit der Wasserstoffbrückenbildung aufweisen, nur schlechte oder gar keine Substrateigenschaften für die DNA-Polymerase [2]. Im weiteren konnte 4-Thio-2'-desoxyribosylthymine-5'-triphosphat, bei dem die Substitution des O-Atoms durch ein S-Atom eine Schwächung der Wasserstoffbrücken zum komplementären Adenosin hervorrufen sollte, unter bestimmten Bedingungen in eine DNA eingebaut werden [6]. Aufgrund dieser Befunde schein es uns interessant, das Verhalten der drei Nucleosid-5'-triphosphate pppM_d , $\text{ppp}\Pi_d$ und pppZ_d ³⁾ mit den Basen 2(1*H*)-Pyrimidinon, 2(1*H*)-Pyridinon und 4-Amino-2(1*H*)-pyridinon, die als Analoge von Cytosin anzusehen sind, gegenüber DNA-Polymerase zu untersuchen. Die Veränderung der Struktur der Base durch das Fehlen der Aminogruppe in der 4-Stellung und/oder durch den Austausch des N-Atoms in der 3-Stellung des heterocyclischen Rings sollte die Ausbildung von nur einer bzw. zwei Wasserstoffbrücken zum komplementären Guanosen erlauben (*Schema*). Wir prüften deshalb, ob diese Verbindungen Substrate oder Inhibitoren der DNA-Polymerase sind. Die Resultate dieser Untersuchungen werden im folgenden beschrieben.

Schema



2. Einbauversuche. – Wie erwähnt, können pppM_d , $\text{ppp}\Pi_d$ und pppZ_d strukturell mit pppC_d verglichen werden. In den Einbauversuchen ersetzen wir deshalb pppC_d durch die modifizierten Triphosphate. So wurden zum Enzym und der aktivierten Thymus-DNA (Matrize) die notwendigen Substrate 2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (pppA_d), 2'-Desoxyribosylthymine-5'-triphosphat (pppT_d , radioaktiv und 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat (pppG_d) zugegeben, und an Stelle des 2'-Desoxy-

³⁾ M_d = 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyrimidinon, Π_d = 1-(2'-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridinon und Z_d = 4-Amino-1-(2'-desoxy- β -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridinon.

cytidin-5'-triphosphats (pppC_d) trat pppN_d^4) in steigender Konzentration. Als Enzyme wurden die DNA-Polymerase I aus *Escherichia coli* und die DNA-Polymerase aus *Micrococcus luteus* verwendet (die micrococcale DNA-Polymerase verfügt über kleinere Nucleaseaktivität als diejenige aus *E. coli*).

Nach Inkubation des Gemischs während 30 Minuten bei 37° wurde die Reaktion mit EDTA-Lösung unterbrochen und das entstandene Produkt mit 5proz. Trichlor-essigsäure gefällt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, gründlich gewaschen und getrocknet. Die anschliessende Messung der Einbaurrate des radioaktiven pppT_d ist ein Maßstab für die DNA-Syntheserate. Folgende Resultate wurden erhalten: Die DNA-Synthese blieb auch bei zunehmender Konzentration von pppN_d auf demselben Niveau stehen, das erreicht wurde, wenn nur die drei natürlichen Nucleosidtriphosphate (ohne pppC_d) inkubiert wurden. Das bedeutet, dass die Synthese nur so lange verläuft, bis das erste Guanosin auf der Matrize erscheint. Da das komplementäre pppC_d fehlt, bricht dort die Synthese ab (vgl. Fig. 1).

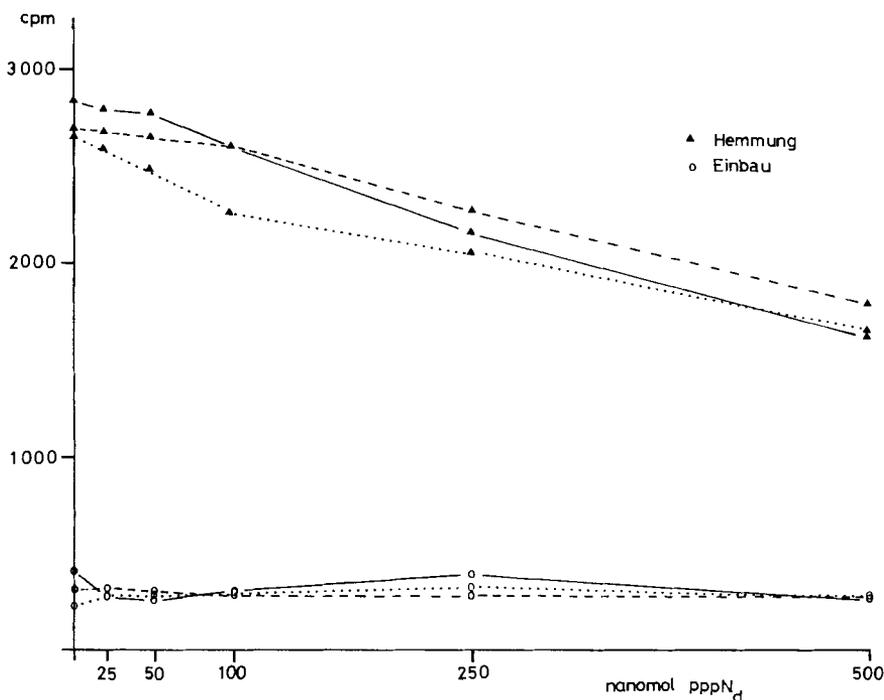


Fig. 1. Einbau- und Hemmungsversuche mit pppN_d (. pppM_d , - - - - - pppI_d , ————— pppZ_d) unter Verwendung von Thymus-DNA als Matrize

Es wäre denkbar, dass zwar pppN_d in die DNA eingebaut wird, die Synthese danach aber abbricht. Dass dies nicht der Fall ist, wurde durch folgende Versuche gezeigt: Zur Inkubationslösung, welche die drei natürlichen Nucleosidtriphosphate

⁴) pppN_d bedeutet pppM_d , pppI_d oder pppZ_d .

und pppN_d enthielt, wurde nach 30 Minuten Inkubationszeit pppC_d gegeben. Dann wurde während 30 Minuten weiter inkubiert. Es wurde beobachtet, dass nach der Zugabe von pppC_d die DNA-Synthese wieder einsetzte und im Verlauf der Inkubation praktisch das gleiche Niveau erreichte wie bei der Inkubation mit den vier natürlichen Nucleosidtriphosphaten. Damit war bestätigt, dass pppN_d nicht eingebaut wird. Dabei verhielten sich die beiden Polymerasen völlig identisch.

Es ist bekannt, dass ein Nucleotid-Analoges in eine künstliche Matrize eingebaut werden kann, auch wenn die Inkorporation in natürliche DNA nicht stattfindet. So wurde z. B. 4-Thio-2'-desoxyribosylthymidin-5'-triphosphat in eine Poly[d(A-T)]-Matrize mit Hilfe der DNA-Polymerase I eingebaut, obwohl dessen Einbau in eine Thymus-DNA ausblieb [5]. Die Ursache für dieses Phänomen ist unbekannt, seine Aufklärung könnte jedoch zu weiteren Erkenntnissen über die Wirkungsweise der DNA-Polymerase führen.

Deshalb haben wir uns entschlossen, zusätzliche Einbauversuche mit einer künstlichen DNA als Matrize durchzuführen. Als Matrize wurde Poly[d(G-C)] gewählt. Die Versuchsanordnung war ähnlich wie bei der Verwendung der Thymus-DNA als Matrize, wobei an ihre Stelle Poly[d(G-C)] trat und pppT_d und pppA_d nicht eingesetzt wurden. pppC_d wurde jeweils durch die Nucleosidtriphosphate pppZ_d , pppI_d oder pppM_d ersetzt. Auch bei zunehmender Konzentration dieser Verbindungen wurde jedoch kein Einbau beobachtet (vgl. Fig. 2). Die Synthese

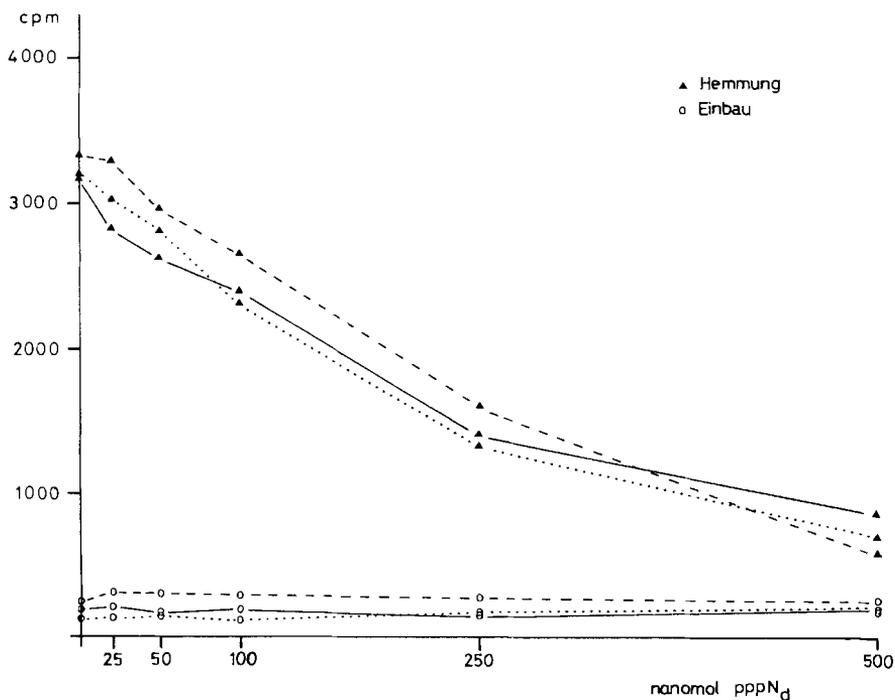


Fig. 2. Einbau- und Hemmungsversuche mit pppN_d (. pppM_d , - - - - - pppI_d , ——— pppZ_d) unter Verwendung von Poly [d(G-C)] als Matrize

blieb immer auf dem gleichen Niveau stehen, das auch erreicht wurde, wenn nur pppG_d (radioaktiv) zum Einsatz kam.

3. Hemmungsversuche. – Der Befund, dass pppM_d , pppI_d und pppZ_d nicht in die DNA-Synthese eingebaut wurden, schliesst nicht aus, dass sie die DNA-Synthese zu hemmen vermögen. Zur Untersuchung einer eventuellen Hemmwirkung wurde zum Gemisch von DNA-Matrize (Thymus-DNA oder Poly[d(G-C)]), Enzym (DNA-Polymerase aus *Micrococcus luteus*) und den vier natürlichen Nucleosid-5'-triphosphaten pppN_d in steigenden Mengen gegeben. Damit sollte die Hemmwirkung in Abhängigkeit der Konzentration von pppN_d sichtbar werden. Die Inkubation, Isolierung und Auszählung der entstandenen Produkte wurde unter den gleichen Bedingungen wie beim Einbau durchgeführt. Wie den *Figuren 1* und *2* zu entnehmen ist, trat tatsächlich eine Hemmung der DNA-Synthese auf. So wurde durch einen 50fachen Überschuss an pppN_d gegenüber den natürlichen Nucleosid-5'-triphosphaten eine etwa 50- (mit Thymus-DNA als Matrize) bzw. 70prozentige (mit Poly[d(G-C)]) Hemmung der DNA-Synthese beobachtet. In Anbetracht des grossen Überschusses von pppN_d gegenüber den natürlichen Substraten ist die Hemmwirkung aber sehr klein.

Für die Untersuchung der Hemmungsart von pppM_d , pppI_d bzw. pppZ_d wurde folgende Versuchsanordnung gewählt. Zur DNA-Matrize (Thymus-DNA) und zum Enzym wurden drei natürliche Nucleosid-5'-triphosphate in konstanter Menge,

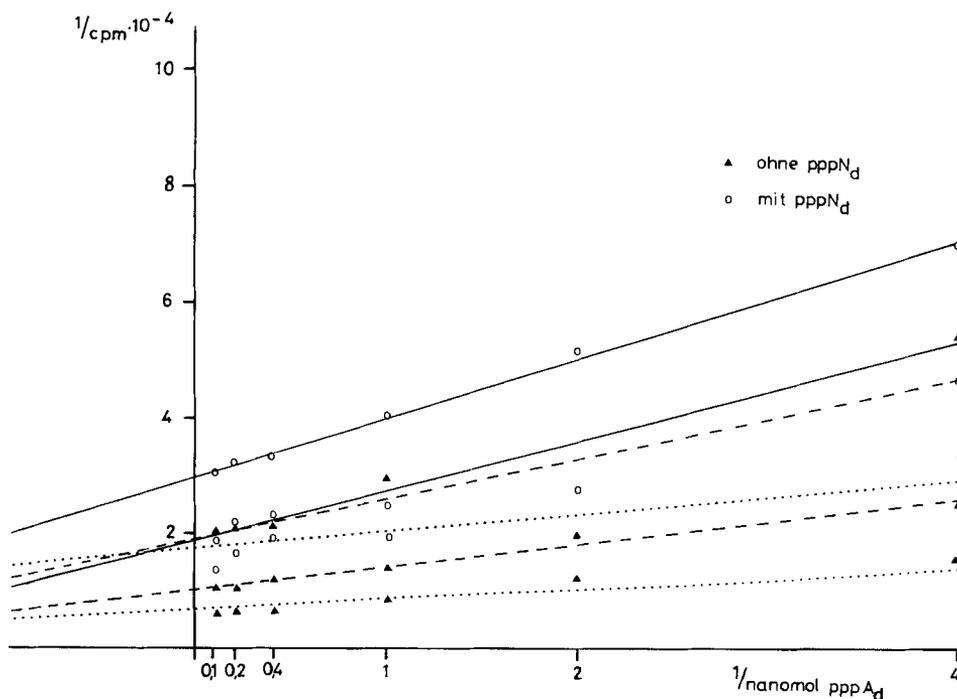


Fig. 3. Hemmwirkung des pppN_d (. pppM_d , - - - - - pppI_d , ——— pppZ_d) in Abhängigkeit von pppC_d nach Lineweaver-Burke

das vierte jedoch in steigenden Mengen zugefügt. Damit konnte eine Abhängigkeit der DNA-Synthese von der Substratkonzentration erhalten werden. Diese Abhängigkeit wurde einmal ohne Inhibitor und einmal mit Inhibitor untersucht. Als viertes Nucleosid-5'-triphosphat wurde pppC_d und pppA_d verwendet.

Bei allen Versuchen ergaben sich praktisch identische Resultate. Die Geschwindigkeit der DNA-Synthese stieg steil an und näherte sich mit zunehmender Substratkonzentration v_{\max} . Die Versuche mit Zugabe der Inhibitoren zeigten das gleiche Bild, wobei der Wert von v_{\max} nur noch etwa 50% betrug.

Die Darstellung der Resultate nach *Lineweaver & Burke* [5] (Fig. 3 und 4) lassen erkennen, dass es sich um eine unkompetitive Hemmung handelt. Allerdings wurden die Geraden in den *Figuren 3 und 4* mittels einer linearen Regression errechnet. Obwohl der Korrelationsfaktor oft relativ schlecht ist, kann doch mit Sicherheit eine kompetitive Hemmung ausgeschlossen werden. Somit kann das Enzym DNA-Polymerase die unnatürliche Nucleosid-5'-triphosphate pppM_d , pppI_d und pppZ_d als Substrate nicht erkennen.

4. Schlussfolgerungen. – Aus den enzymatischen Versuchen geht hervor, dass pppM_d , pppI_d und pppZ_d nicht in die DNA eingebaut werden. Diese Nucleosid-5'-triphosphate vermögen jedoch die DNA-Synthese zu hemmen. Der Vergleich ihrer Hemmwirkung mit jener von kompetitiven Inhibitoren zeigt, dass hier die Wirkung der Hemmung wesentlich geringer ist. So hemmt das 5-Fluoro-2'-desoxyuridin-5'-phosphat das Enzym Thymidylatsynthetase kompetitiv schon bei einer

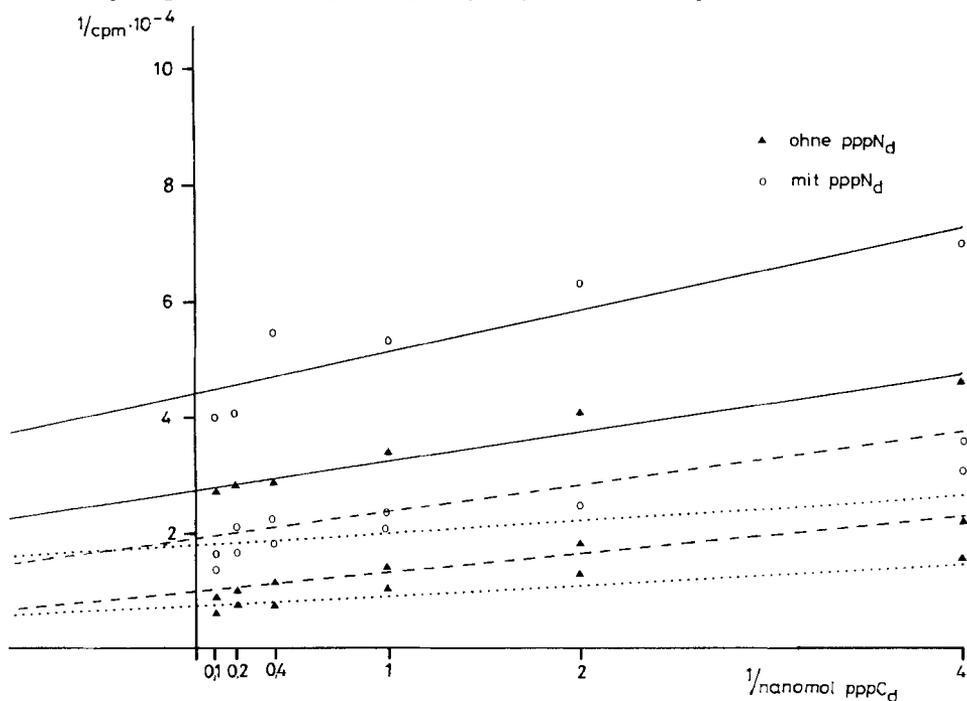


Fig. 4. Hemmwirkung des pppN_d (. pppM_d , - - - - - pppI_d , ——— pppZ_d) in Abhängigkeit von pppA_d nach Lineweaver-Burke

Konzentration von 10^{-8}M [6]. Die DNA-Synthese wird im weiteren von pppM_d , pppI_d und pppZ_d mit Sicherheit nicht kompetitiv gehemmt. Damit kann auch ausgeschlossen werden, dass sie sich an das aktive Zentrum der DNA-Polymerase binden können. Weder pppM_d noch pppI_d und pppZ_d sind somit Substrate für das Enzym. Die Befunde zeigen, dass die Substratspezifität der DNA-Polymerase solche Änderungen der Struktur in der Basenpaarungsregion des Cytosins nicht erlaubt. Somit ist ein weiterer Hinweis dafür geliefert, dass die verminderte Fähigkeit zur Ausbildung der Wasserstoffbrücken zwischen komplementären Basenpaaren die DNA-Synthese *in vitro* verunmöglicht.

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für die finanzielle Unterstützung (Projekte Nr. 2.435.0.75, 2.629.0.76 und 2.158.0.78).

Experimenteller Teil

1. *Allgemeines.* Die Synthese von pppM_d , pppI_d und pppZ_d wurde in [1] beschrieben. Die natürlichen Nucleosid-5'-triphosphate stammten von der Firma *Sigma*, Saint Louis, Missouri, U.S.A. Von der gleichen Firma bezogen wir die Kalb-Thymus-DNA. Von der Firma *Boehringer*, Mannheim, stammte die Poly[d(G-C)] sowie die DNA-Polymerase I aus *Escherichia coli* MRE 600 (E.C.2.7.7.7). Die DNA-Polymerase aus *Micrococcus luteus* wurde von *P. L. Biochemical Inc.*, Milwaukee, Wisconsin, U.S.A., und die radioaktiven Nucleosid-5'-triphosphate (mit $\alpha - ^{32}\text{P}$) wurden von *The Radiochemical Centre*, Amersham, England, bezogen. Die Auszählung der radioaktiven Produkte wurde mit einem *Packard*, Tric-Carb. Liquid-Scintillation-Spektrometer, Model 574 oder Model 2425, vorgenommen. Die Auswertung der Versuche erfolgte auf einem *Hewlett-Packard* Rechner, Model 9830 A.

Alle Versuche wurden nach den von *Lehman et al.* [7] beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Je nach Ziel des Versuchs wurden bestimmte Änderungen vorgenommen. Die Enzymversuche wurden in der Abteilung Mikrobiologie des Biozentrums der Universität Basel (*Dr. V. Pirotta*) und im *Friedrich-Miescher* Institut der *Ciba-Geigy AG*, Basel, (*Prof. Dr. M. Staehelin* und *Dr. W. Wehrli*) durchgeführt. Wir danken den genannten Herren für ihre grosszügige Hilfe.

2. *Substratlösungen.* Das modifizierte Nucleosidtriphosphat pppZ_d wurde als Ammoniumsalz, die Nucleosidtriphosphate pppI_d , pppM_d sowie die natürlichen Nucleosidtriphosphate pppC_d , pppA_d , pppG_d und pppT_d als Natriumsalze verwendet. Es wurden jeweils Lösungen der Konzentration $10\ \mu\text{mol/ml}$ hergestellt, die bei -20° aufbewahrt wurden.

Von den beiden markierten Nucleosidtriphosphaten 2'-Desoxyribosylthymine-5'-[$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]- und 2'-Desoxyguanosin-5'-[$\alpha\text{-}^{32}\text{P}$]triphosphat ($250\ \text{Ci/mmol}$, $1\ \text{mCi/ml}$, Triäthylammoniumsalze) wurde jeweils eine wässrige Lösung hergestellt, die die Aktivität von *ca.* $30'000\ \text{cpm}/\mu\text{l}$ aufwies.

Die als Matrize verwendete Thymus-DNA wurde auf folgende Weise aktiviert: $5\ \text{ml}$ DNA ($1\ \text{mg/ml}$ Wasser, mit Phenol vorbehandelt), $1\ \text{ml}$ «Tris-HCl-Puffer» ($1\ \text{M}$, $\text{pH}\ 7,5$), $0,04\ \text{ml}$ DNase ($0,25\ \mu\text{g/ml}$) wurden $30\ \text{Min.}$ bei 37° inkubiert und dann *ca.* $10\ \text{Min.}$ bei 70° gehalten. Es resultierte eine Gebrauchslösung von $2,4\ \text{mg/ml}$. Die als zweite Matrize verwendete Poly[d(G-C)] wurde als Gebrauchslösung in der Konzentration $0,5\ \text{mg/ml}$ in $1\ \text{M}$ «Tris-HCl-Puffer» verwendet. Beide Lösungen wurden bei 0° aufbewahrt.

3. *Enzymlösungen.* Die DNA-Polymerase aus *M. luteus* ($200\ \text{U/ml}$) und die DNA-Polymerase I aus *E. coli* ($500\ \text{U}/0,16\ \text{ml}$) wurden vor jedem Versuch zu einer Gebrauchslösung von $20\ \text{U/ml}$ verdünnt. (Verdünner: $0,05\ \text{M}$ «Tris-HCl-Puffer», $\text{pH}\ 8$; $0,01\ \text{M}$ Mercaptoäthanol und $2\ \text{mg}$ bovine serum albumin (BSA)/ $1\ \text{ml}$ Wasser).

4. *Ansatz:* Ein Gemisch von $10\ \mu\text{l}$ $1\ \text{M}$ «Tris-HCl-Puffer» ($\text{pH}\ 7,5$), $1\ \mu\text{l}$ $1\ \text{M}$ MgCl_2 , $1\ \mu\text{l}$ $1\ \text{M}$ 2-Mercaptoäthanol, $25\ \mu\text{l}$ aktivierter Thymus-DNA-Gebrauchslösung⁵⁾, je $1\ \mu\text{l}$ $0,01\ \text{M}$ pppA_d , pppC_d , pppG_d , pppT_d und $2\ \mu\text{l}$ $\text{ppp}[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{T}_d$ oder $2\ \mu\text{l}$ $\text{ppp}[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{G}_d$ wurde auf $0,125\ \text{ml}$ mit bidest. Wasser aufgefüllt. Dazu wurden $0,1\ \text{U}$ DNA-Polymerase gegeben und das Gemisch wurde $30\ \text{Min.}$ bei 37° inkubiert. Die Reaktion wurde mit $20\ \mu\text{l}$ $0,5\ \text{M}$ EDTA gestoppt, mit $50\ \mu\text{l}$ BSA-Lösung ($1\ \text{mg/ml}$

⁵⁾ In den Versuchen mit Poly[d(G-C)] als Matrize wurde diese anstatt der Thymus-DNA angesetzt. Als Substrate wurden nur pppC_d und pppG_d (radioaktiv) verwendet.

Wasser) versetzt und mit 3 ml 5proz. TCA (Trichloressigsäure) gefällt. Nach 1 Std. wurde der Niederschlag auf einen Glasfilter *Whatman* GF/C abgenutscht und mit 2proz. TCA-Lösung ausgiebig gewaschen. Die Filter wurden 1 Std. bei 60° getrocknet. Dann wurde ihre Aktivität in Kunststofffläschchen mit 10 ml Toluol im Scintillationszähler gemessen.

5. *Einbau*. Anstelle von pppC_a wurde zum Versuchsansatz pppZ_a, pppI_a oder pppM_a in steigenden Mengen von 1, 5, 10, 25 und 50 μ l gegeben. Die Inkubationsdauer wurde für alle Proben genau gleich gehalten und alle Versuche wurden mindestens 2mal in doppelter Ausführung durchgeführt.

6. *Hemmung*. Zum Versuchsansatz, der alle 4 bzw. 2 natürlichen Nucleosidtriphosphate als Substrate enthielt, wurde in steigenden Mengen von 1, 5, 10, 25 und 50 μ l das pppZ_a, pppI_a oder pppM_a gegeben.

7. *Art der Hemmung*. Die Inkubationsdauer wurde auf 15 Min. verkürzt. Zum Versuchsansatz, der je 1 μ l der 3 natürlichen Substrate und 50 μ l pppZ_a enthielt, wurde in steigenden Mengen pppC_a bzw. pppA_a (25 μ l 10⁻⁵M; 5, 10, 25 μ l 10⁻⁴M; 5 μ l 10⁻³M und 1 μ l 10⁻²M) gegeben.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] P. Kohler, M. Wachtl & Ch. Tamm, *Helv. 63*, 2488 (1980).
- [2] M. J. Bessman, I. R. Lehman, I. Adler, S. B. Zimmermann, E. S. Simms & A. Kornberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **44**, 633 (1958).
- [3] J. D. Watson & F. H. C. Crick, *Nature* **171**, 964 (1953).
- [4] R. B. Inman, *J. Mol. Biol.* **9**, 624 (1964); R. B. Inman & R. L. Baldwin, *ibid.* **5**, 172 (1962).
- [5] Vgl. A. G. Lezius & K. H. Scheit, *Eur. J. Biochem.* **3**, 85 (1967).
- [6] K. U. Hartmann & C. Heidelberger, *J. Biol. Chem.* **236**, 3006 (1961).
- [7] I. R. Lehmann, M. J. Bessman, E. S. Simms & A. Kornberg, *J. Biol. Chem.* **233**, 163 (1958).