

# Replikationsexperimente mit Nucleotidbasen-Analoga

Von Peter Strazewski und Christoph Tamm\*

Die Prinzipien der Replikationsgenauigkeit von Genomen werden auch heute noch nicht ganz verstanden. Für die Basen der Desoxyribonucleotide gilt die Regel nach Watson und Crick; sie erklärt, warum die Paarung der Basen Guanin und Cytosin sowie Adenin und Thymin thermodynamisch etwa hundertmal günstiger ist als die Bildung aller anderen Kombinationen. In vitro verringern Polymerasen die Bildung von Basenpaaren, die nicht den Watson-Crick-Regeln entsprechen, auf ca.  $10^{-6}$  pro Watson-Crick-Basenpaar. In vivo lässt sich die Replikationsgenauigkeit auf eine Mutationswahrscheinlichkeit von ca.  $10^{-10}$  erhöhen, wenn dank Polymerisations-Hilfsproteinen und DNA-Reparaturenzymen optimale Bedingungen für die DNA-Synthese vorliegen. Die genauerer Ursachen der Fehlpaarungen sind gegenwärtig Gegenstand vieler Diskussionen. Man ist sich zwar einig, daß ein templatgesteuertes Ablesen des H-Substitutionsmusters der heterocyclischen Basen entscheidend für die korrekte Basenpaarung während der DNA-Synthese ist, doch ist noch unklar, welche Art des falschen Ablesens zu einer Fehlpaarung führt. Diskutiert werden das fehlerhafte Ablesen aufgrund einer Nicht-Watson-Crick-Basenpaarbildung und aufgrund einer Änderung des H-Substitutionsmusters, die aber noch zu Watson-Crick-ähnlichen Basenpaaren führt. Die überraschende Entdeckung einer selektiven und quantitativen, durch DNA-Polymerase katalysierten Bildung eines Pyrimidin-Pyridin-Basenpaares (bei Verwendung eines Pyridin-Nucleotidbasen-Analogs) weist darauf hin, daß seltene tautomere Formen im Templat-DNA-Strang zu Watson-Crick-ähnlichen fehlerhaften Basenpaaren führen können, die kaum vom Korrektursystem der Polymerase erkannt werden. Diese Beobachtung zeigt neue Wege für Substitutionsmutationen auf (replikationsabhängige DNA-Punktmutationen) und lässt auf einen neuen Mutagenitätsotyp *in vivo* schließen.

## 1. Einführung

### 1.1. Essentielle Kontakte

Lebende Materie konnte sich auf der Erde entwickeln, weil sie Strukturen hervorbrachte, die vier Voraussetzungen erfüllten: 1) Die Strukturen mußten genügend komplex und stabil sein, um eine aufgeprägte genetische, d. h. vererbare Information zu speichern. 2) Ihre Oberfläche mußte für ein templatgesteuertes Lesen zugänglich sein, so daß die Information korrekt auf die Nachkommen übertragen werden konnte (Replikation). 3) Die Strukturen mußten fähig sein, ihre „unbelebte“ Umgebung für ihre eigene Reproduktion auszunutzen, anders ausgedrückt: Sie mußten über eine biologische Aktivität verfügen, die ihre unmittelbare Umgebung in einen Phänotyp umzuwandeln vermochte. Eine so beherrschte Umgebung würde den Strukturen helfen, sich gegen eine große Vielfalt replizierender Strukturen mit anderer genetischer Information zu behaupten (Selektion). 4) Die Strukturen mußten metastabile Informationseinheiten enthalten, die eine Evolution ihrer Träger unter dem Einfluß der natürlichen Selektion zuließen (Anpassung durch Mutation).

Der Informationsträger ist Desoxyribonucleinsäure (DNA). Man kann den Träger in DNA-Abschnitte unterteilen, die die Aminosäuresequenz von Proteinen codieren

(Exons), und in nicht-codierende Abschnitte. Codierende DNA-Sequenzen, die vermutlich bei den meisten DNAs nur einen kleinen Teil ausmachen, können ihre Information über *DNA-Ribo(mono)nucleotid*-Kontakte, unter Mithilfe von Transkriptionsproteinen auf den Phänotyp übertragen. Nach der Transkription in eine „aktive Form“, deren Träger nun Ribonucleinsäure (RNA) ist, bewirken sowohl *RNA-RNA*-Kontakte (Codon-Anticodon-Paarung zwischen der DNA-Abschrift-Messenger-RNA und dem Aminosäureträger Transfer-RNA) als auch *RNA-Protein*-Kontakte (selektive, enzymatische Aminoacylierung der passenden Transfer-RNA) eine Übertragung der Information auf die Proteine. Die erstgenannten Kontakte, zu denen Proteine und ribosomale RNA (in den Ribosomen) beitragen, werden durch den universellen genetischen Code mit seinen Triplet-Codons geregelt. Die Natur der letztgenannten Kontakte, vor kurzem als sekundärer genetischer Code<sup>[1]</sup> bezeichnet, ist noch nicht genügend erforscht. Codierende und nicht-codierende DNA-Sequenzen können den Phänotyp auch durch direkte *DNA-Protein*-Kontakte beeinflussen. Diese eröffnen die Möglichkeit, die Expression von codierenden Sequenzen zu regulieren, bewirken Änderungen der DNA-Topologie und erlauben auch eine dichte Packung der DNA in den Chromosomen. *DNA-DNA*-Kontakte werden für die chemische Stabilisierung der DNA durch die Bildung von Doppelsträngen benötigt. Diese Kontakte sind auch beim Austauschen von DNA-Fragmenten während der genetischen Rekombination wesentlich, die ja die Grundlage der sexuellen Reproduktion bildet. Schließlich ermöglichen *DNA-Desoxyribo(mono)nucleotid*-Kontakte – unter Mithilfe von Replikationsproteinen – das Kopieren der gesamten genetischen Information, so daß die Replikation der DNA gewährleistet ist.

[\*] Prof. Dr. C. Tamm

Institut für Organische Chemie der Universität  
St.-Johanns-Ring 19, CH-4056 Basel (Schweiz)

Dr. P. Strazewski  
University Chemical Laboratory  
Lensfield Road, GB-Cambridge CB2 1 EW (UK)

## 1.2. Verschiedene Arten von Basen-Basen-Wechselwirkungen

Von all den lebenswichtigen Kontakten (Abschnitt 1.1) sind diejenigen zwischen den Nucleotiden am besten bekannt, weil lediglich vier Informationseinheiten beteiligt sind. Die Information wird durch die vier heterocyclischen Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil/Thymin codiert. Trotz der relativ einfachen Konstitution (verglichen mit den 20 Aminosäureseitenketten) gibt es viele verschiedene Kontaktmöglichkeiten zwischen diesen Basen (Abb. 1). Am häufigsten sind Kontakte (via Wasserstoffbrücken) zwischen zwei Einheiten. Basenpaare nach den Watson-Crick-Regeln<sup>[2]</sup> (Abb. 1 a) entstehen bei der Bildung von antiparallelen Doppelsträngen aus DNA- und/oder RNA-Einzelsträngen. Watson-Crick-Basenpaare enthalten stets eine Purinbase (Guanin, Adenin) und eine Pyrimidinbase (Cytosin, Uracil/Thymin); dabei sind Guanin mit Cytosin und Adenin mit Uracil (in RNA) oder Thymin (in DNA) gepaart. Diese Anordnungen sowie die Strukturen der Hoogsteen-Paare, bei denen die Purinbase die ungewöhnliche *syn*-Konformation bezüglich der Glycosidbindung einnimmt (Abb. 1 b), und die der „Wobble“-Paare, bei denen die  $C_2$ -Pseudosymmetrie der Watson-Crick-Paare fehlt (Abb. 1 c), sind durch Röntgen-Strukturanalyse gesichert. Hoogsteen- und Wobble-Paare spielen eine wichtige Rolle als alternative Basenpaare in der RNA- und in der DNA-Mutagenese. Eine andere Art von Basen-Basen-Kontakten bilden die „invertierten“ Basenpaare, bei denen zwei parallel orientierte Stränge vorliegen dürfen (Abb. 1 d), sowie Basentriplets in DNA-Dreifachsträngen (Abb. 1 e). Diese beiden Strukturen (Abb. 1 d, e) sind unter Berücksichtigung der Kombinationsmöglichkeiten von Protonen-Donoren und -Acceptoren konstruiert; sie sind noch nicht bewiesen. Es wird vermutet, daß parallele Stränge in ungewöhnlichen Sekundärstrukturen der DNA und RNA existieren<sup>[3]</sup>. Dreifachsträngige DNA-Sequenzen stabilisieren eine ungewöhnliche Sekundärstruktur, welche scharfe Biegungen in den DNA-Doppelsträngen induziert (H-DNA)<sup>[4]</sup>. Ebenso soll dreifachsträngige DNA in der Anfangsphase von Rekombinationsvorgängen von Bedeutung sein.

All diese Basenpaare können sich unter dem Einfluß der genetischen Information der DNA in korrekter oder nicht korrekter Weise bilden. Die fehlgepaarten Basen, die Mutanten-

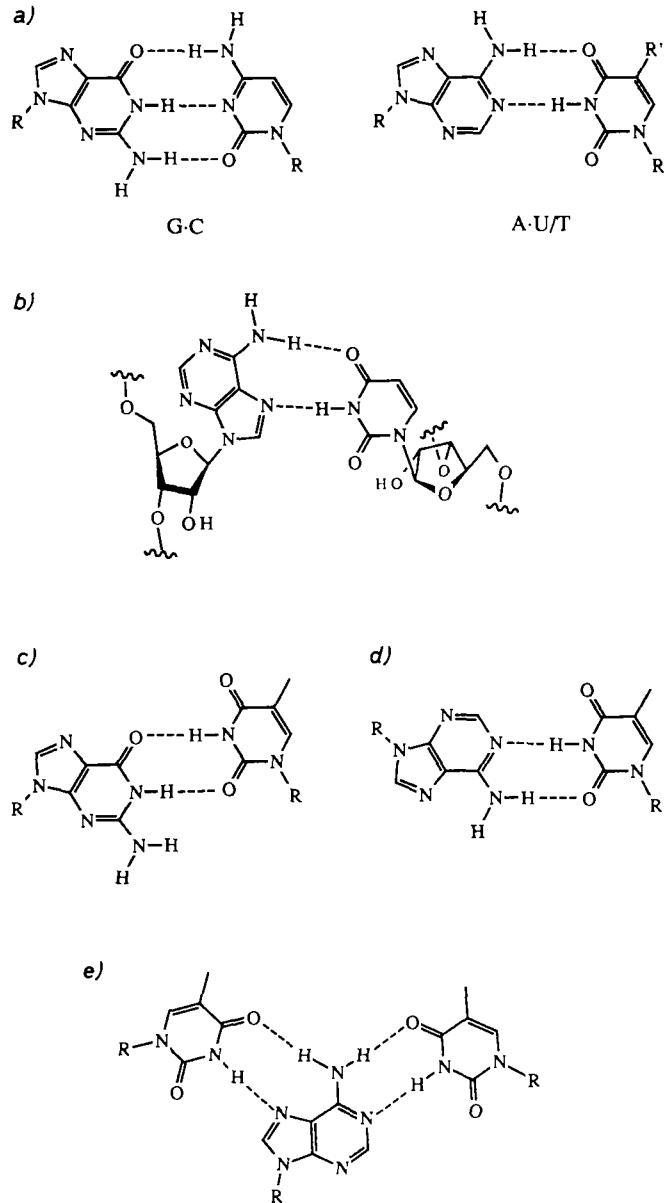
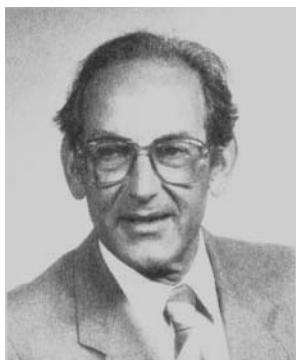


Abb. 1. Arten der Basenpaarung zwischen Nucleotiden. R =  $\beta$ -D-Ribofuranosyl oder 2'-Desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl, R' = H oder  $\text{CH}_3$ . a) Watson-Crick-Basenpaare G-C und A-U (R = Ribosyl, R' = H) oder A-T (R = Desoxyribosyl, R' =  $\text{CH}_3$ ). b) Hoogsteen-Paare, z. B. A(*syn*)-U. c) Wobble-Paare, z. B. G-T(wobble). d) Invertierte Basenpaare, z. B. A- $\perp$  (oder V-T). e) Basentriplets, z. B. T-A-T.



*Christoph Tamm wurde 1923 in Basel geboren. Das Studium an den Universitäten Genf und Basel schloß er 1948 mit der Promotion bei Tadeus Reichstein in Basel ab. Von 1949 bis 1952 war er Postdoc bei Oskar P. Wintersteiner, Squibb Institute for Medical Research, New Brunswick, NJ, und bei Erwin Chargaff, Columbia University, New York. Nach der Habilitation 1953 in Basel und einer Tätigkeit in der Pharmazeutischen Forschungsabteilung (chemische Mikrobiologie) der Sandoz AG, Basel, (1957–1961) setzte er seine Hochschulkarriere an der Universität Basel fort, ab 1961 als außerordentlicher und ab 1966 als ordentlicher Professor. Tamm ist Mitglied zahlreicher forschungs- und hochschulpolitischer Gremien. Seine Arbeitsgebiete sind Struktur, Synthese und Biosynthese von bioaktiven mikrobiellen Stoffwechselprodukten, stereoselektive Reaktionen mit Enzymen sowie Synthese von Nucleosiden und Polynucleotiden.*

*Peter Strazewski wurde 1958 in London geboren. Er studierte an der Universität Basel, promovierte dort 1986 bei Christoph Tamm und ist seit 1988 Postdoc bei Olga Kennard, University Chemical Laboratory, Cambridge (GB). Er arbeitet über die Synthese von Naturstoffen sowie die Synthese und Röntgenstrukturanalyse von Oligonucleotiden.*

tionen von DNA, RNA oder Proteinen verursachen können, finden zur Zeit großes Interesse, weil man ihre Entstehung noch nicht so gut versteht wie die der Watson-Crick-Paare. Mutationen sind die Konsequenz unüblicher Kontakte, natürlich nicht nur zwischen Nucleotidbasen, sondern auch zwischen Proteinen und DNA oder RNA. Am gefährlichsten, d. h. für die Zelle am schädlichsten, sind aber Mutationen der DNA, weil nur diese vererbar sind und zu zahlreichen mutierten Produkten führen können. Deshalb werden wir uns im folgenden auf korrekte und fehlerhafte Basenpaarungen, die während der DNA-Replikation entstehen, konzentrieren.

### 1.3. Wasserstoff-Substitutionsmuster von Nucleotidbasen

Nucleotide (Desoxyribonucleotide werden in diesem Artikel der Kürze halber als Nucleotide bezeichnet) sind chemisch relativ stabil, da sie in der DNA miteinander kovalent als Phosphorsäurediester verknüpft sind. Ein Schutz vor chemischen Modifizierungen ist zudem die recht stabile Sekundärstruktur: Die Basen sind im Innern der Doppelhelix verborgen. Dennoch scheinen Nucleotide in der DNA bezüglich der Replikation metastabil (mutationsanfällig) zu sein. Der Grund dafür liegt in der Möglichkeit zur Bildung falscher Basenpaare, die nicht den Watson-Crick-Regeln gehorchen. Deshalb sollte man eigentlich die Basenpaare in der DNA und nicht die Nucleotide in Einzelsträngen als Informationsträger betrachten.

In einem engeren Sinne trägt nur ein besonderer Teil der Nucleotidbase die genetische Information, nämlich das H-Substitutionsmuster des Heterocyclus, d. h. das Verteilungsmuster von H-Acceptor- und -Donorstellen an der exponierten Seite der Base. Wenn sich das Muster dort – und nur dort – vor der Replikation änderte, könnte die Base immer noch eine andere Nucleotidbase normal binden, aber nach der Replikation resultierte ein veränderter Informationsinhalt.

Wie kann sich nun ein H-Substitutionsmuster verändern? Abbildung 2 zeigt vier Wege, wie das Verteilungsmuster von drei Donoren/Acceptoren in einer verankerten Ebene (Informationsebene) verändert werden kann, analog der Anordnung von H-Atomen und nichtbindenden Elektronenpaaren in einer heterocyclischen Nucleotidbase. Die einfachste Veränderung wird durch Deprotonierung oder Protonierung bewirkt, was zu einer Ladung in der Ebene führt (Abb. 2a). Diese Ladung kann entweder durch Rückreaktion oder durch Zufügen bzw. Entfernen eines anderen Protons neutralisiert werden; dabei entsteht ein Tautomer des ursprünglichen Musters (Abb. 2b). Basenpaare, deren H-Substitutionsmuster auf diese beiden Arten verändert werden, können eine Geometrie vom Watson-Crick-Typ (wie die üblichen Watson-Crick-Paare) aufweisen, haben jedoch einen anderen Informationsinhalt und können deswegen Mutationen bewirken. Eine weitere Möglichkeit, das Muster zu verändern, ist das Verschieben des Leserahmens aus der Informationsebene (nach dem Prinzip „keine Information ist auch eine Information“) (Abb. 2c). In der Natur ist dies möglich, weil die verlorengegangene Information durch das Lösungsmittel ersetzt werden kann, das ein enormes Reservoir leicht anzupassender H-Donoren und -Acceptoren ist. Wobble-Paare sind Basenpaare mit verschobenem Leserahmen. Auch sie weisen einen veränderten Informationsgehalt

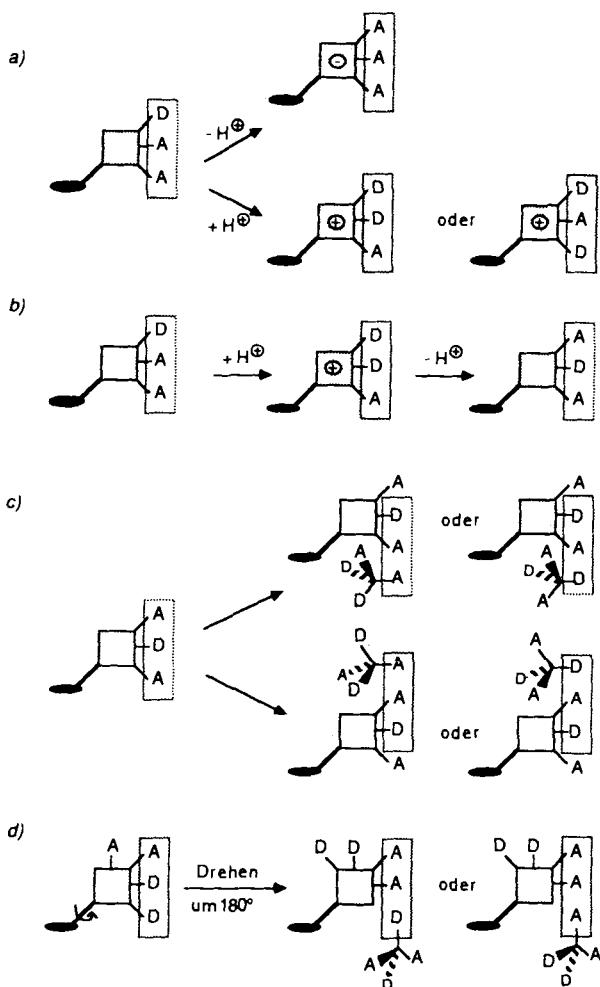


Abb. 2. Möglichkeiten zur Änderung des H-Donor-/Acceptor-Substitutionsmusters einer Nucleotidbase. Quadratische Flächen: verankerte Informationsebenen (schematisierte Nucleotide). D = H-Donor, A = H-Acceptor,  $D_2A_2 = H_2O$ , gepunktete Linien: Leserahmen. a) Deprotonierung bzw. Protonierung; b) Tautomerisierung; c) Verschiebung des Leserahmens; d) Präsentation eines alternativen Substitutionsmusters.

auf und können demzufolge Mutationen verursachen. Schließlich wissen wir, daß gewisse natürliche Informationsebenen, die Purinbasen, über H-Atome und Elektronenpaare verfügen, die auf der gesamten Ebene verteilt sind. Wenn sich der Leserahmen auf die andere Seite der Informationsebene verschiebt, kann wiederum ein verändertes Muster resultieren. Diese Verschiebung kann einfach durch Rotation der verankerten Informationsebene um 180° erreicht werden (Abb. 2d). Hoogsteen-Basenpaare (vgl. Abb. 1b) sind so verknüpft, daß ein anderer Teil der Purinbase als bei Watson-Crick-Paaren den Ablesebereich bildet. Einige Hoogsteen-Basenpaare verursachen Mutationen. Die Kombination dieser Prinzipien bietet noch weitere Möglichkeiten für eine Veränderung des H-Substitutionsmusters. Basen mit derart veränderten H-Substitutionsmustern könnten z. B. protonierte Hoogsteen-Paare oder tautomere Wobble-Paare bilden.

### 1.4. Nucleotidbasen-Analoga

Welcher Typ des fehlerhaften Ablesens in einer DNA-Polymerase vorkommen kann, läßt sich gut mit Nucleotid-

basen-Analoga untersuchen, deren Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffsbrücken mit natürlichen Nucleotiden eingeschränkt oder verändert ist. Das Verhalten solcher Nucleosidtriphosphat-Analoga während der DNA-Synthese gäbe einen Einblick, welche Art von H-Substitutionsmuster einer eintretenden Nucleotidbase von der Polymerase toleriert wird. Die Anwendung solcher Analoga als Templat-Nucleotide würde auch Aufschluß über die H-Bindungen geben, die für die korrekte DNA-Synthese nötig sind.

Die modifizierten Nucleoside, die für diesen Zweck ausgesucht wurden, können als Strukturanaloga von Desoxycytidin betrachtet werden (Abb. 3). 1-(2'-Desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridon **1** und -pyrimidon **2** sowie 4-Amino-1-(2'-desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridon **3**. Die H-Acceptor- und H-Donorstellen sind durch Pfeile markiert. Die Klammern um H-3 in **1**, **4**, **3** und **6** deuten die abstoßenden (sterischen) Wechselwirkungen mit dem Iminoproton an N-3 von Thymidin oder dem Iminoproton an N-1 von Desoxyguanosin während einer Watson-Crick-ähnlichen Basenpaarung an. Unten: Übliche Numerierung von 2'-Desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl und den Pyrimidin- und Purin-Nucleosidbasen.

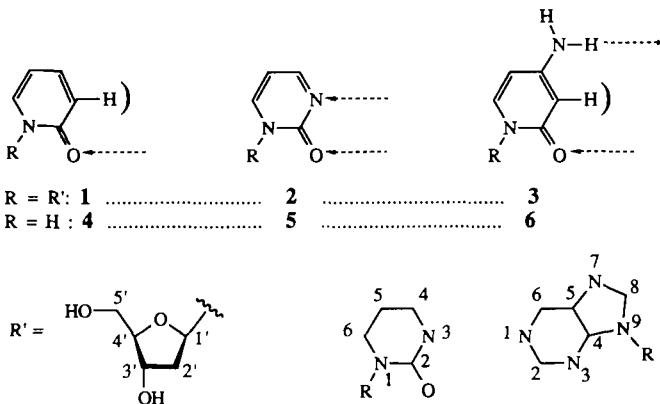


Abb. 3. Nucleosidbasen-Analoga 1-(2'-Desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridon **1** und -pyrimidon **2** sowie 4-Amino-1-(2'-desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridon **3**. Die H-Acceptor- und H-Donorstellen sind durch Pfeile markiert. Die Klammern um H-3 in **1**, **4**, **3** und **6** deuten die abstoßenden (sterischen) Wechselwirkungen mit dem Iminoproton an N-3 von Thymidin oder dem Iminoproton an N-1 von Desoxyguanosin während einer Watson-Crick-ähnlichen Basenpaarung an. Unten: Übliche Numerierung von 2'-Desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl und den Pyrimidin- und Purin-Nucleosidbasen.

nosyl)-2(1*H*)-pyridon **1** ist ein Nucleosid-Analogon, das lediglich eine einzige H-Brücke (mit dem Carbonylsauerstoff von C-2) bilden kann. Zudem werden die Nucleoside Desoxyguanosin (dG) und Thymidin (dT), die ein Imino-H-Atom enthalten, wegen sterischer Abstoßung zwischen H-3 des Analogons und den Iminoprotonen an N-1 und N-3 von dG bzw. dT daran gehindert, mit **1** ein Basenpaar zu bilden (Numerierung der Purin- und Pyrimidinnucleoside vgl. Abb. 3). Es kann erwartet werden, daß in Basenpaaren anziehende Wechselwirkungen zwischen H-3 und einem H-Acceptor wie N-3 von Desoxycytidin (dC) oder N-1 von Desoxyadenosin (dA) auftreten, die jedoch wesentlich schwächer als normale H-Brücken zwischen zwei N-Atomen sind.

1-(2'-Desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyrimidon **2** ist ein dC-Analogon, das nicht mehr über die 4-Aminogruppe verfügt, die der einzige H-Donor von dC ist („4-Desamino-2'-desoxycytidin“, Abb. 3). Im Gegensatz zu **1** könnte **2** ein Basenpaar mit dG (zwei H-Brücken) und mit dT (eine H-Brücke) bilden. Zudem fehlt in **2** ein Proton, das die Entstehung eines Basenpaares mit dC oder dA ermöglichen könnte. Bei den beiden letztgenannten Nucleosiden bestehen aber keine Bedenken gegen eine Basenpaarbildung mit der N-3-protonierten Form von **2** in der Polymerase.

H-3 in 4-Amino-1-(2'-desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl)-2(1*H*)-pyridon **3** („3-Desaza-2'-desoxycytidin“, Abb. 3) wird (wie in **1**) das Analogon daran hindern, sich mit dG oder dT zu

paaren. Ebenso scheint eine Paarung mit dC oder dA recht ungünstig, da alle Basen an N-4 einen H-Donor enthalten (die Rotation aromatischer Aminogruppen aus der  $\pi$ -Konjugationsebene ist gehindert), und es ist weiter anzunehmen, daß die Wechselwirkungen zwischen H-3 von **3** und N-3 von dC oder N-1 von dA sehr schwach sind (wie in **1**).

Es ist nur dann sinnvoll, die obengenannte Bildung von Basenpaaren zwischen den Analoga **1**–**3** und den natürlichen Nucleosiden zu erwarten oder zu vermuten, wenn während der Polymerisationsreaktion im Enzym beide Basen ungeladen und vollständig in ihrer bevorzugten tautomeren Form vorliegen und zudem eine Watson-Crick-ähnliche Anordnung aufweisen. Falls demnach beim enzymatischen in-vitro-Experiment, das die Basenpaarbildung mit Analoga ermöglicht, eines der unerwarteten Basenpaare entsteht, müßte entweder eine Base protoniert sein oder in einer seltenen tautomeren Form vorliegen (Änderung des Musters wie in Abb. 2 a oder 2 b dargestellt), oder eine Base müßte gegenüber dem Leserahmen verschoben sein (Abb. 2 c und 2 d).

Die enzymatischen Testreaktionen erfordern eine effiziente Synthese der modifizierten Basen, ihre stereochemisch definierte Glycosylierung und eine brauchbare 5'-Triphosphorylierung. Die Verwendung von Nucleosid-Analoga als Templat-Nucleotide in einem DNA-Oligomer verlangt, abgesehen von der Monophosphorylierung, daß die Reaktionsbedingungen der chemischen DNA-Synthese und die Bedingungen während der enzymatischen DNA-Kettenverlängerung von den modifizierten Basen ertragen werden, die empfindlicher als die natürlichen Basen sind.

## 2. Synthese von Nucleosid- und Nucleotidbasen-Analoga

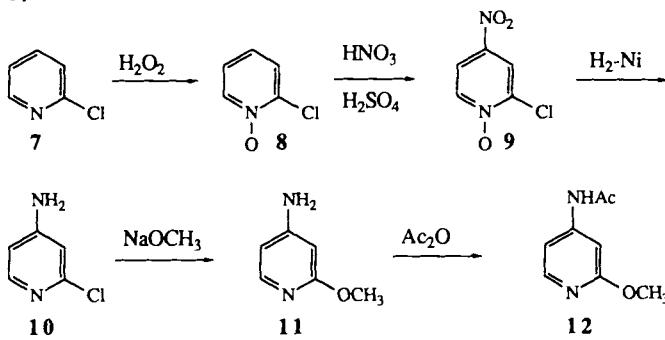
### 2.1. Modifizierte Mononucleotide

#### 2.1.1. Synthese von Nucleosid-Analoga

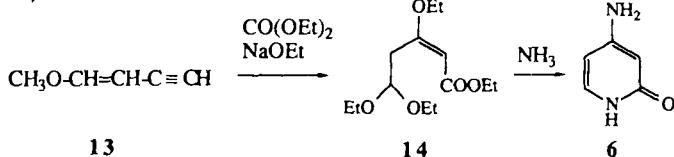
Das 2-Pyridon **4** und das 2-Pyrimidon **5** sind im Handel erhältlich; das 4-Amino-2-pyridon **6** mußten wir selbst herstellen. Unser erster Syntheseweg (Schema 1 a) baute auf publizierten Synthesen der frühen sechziger Jahre auf. Aus 2-Chlorpyridin **7** wurde zuerst das *N*-Oxid **8** erzeugt, welches in die Nitroverbindung **9** übergeführt wurde. Hydrierung zu **10** und anschließende Methanolyse lieferten Verbindung **11**, deren Aminogruppe durch Acetylierung zu **12** geschützt wurde. **12** ließ sich anstelle von **6** für die Glycosylierung zu **3** verwenden. Später wurde **6** von Currie et al.<sup>[5]</sup> auf einem einfacheren Weg hergestellt (Schema 1 b). Sie setzten 1-Methoxy-1-buten-3-in **13** zum Ester **14** um, der schließlich durch Aminolyse Verbindung **6** ergab.

Die Glycosylierung zu den Nucleosid-Analoga **1**–**3** gelang durch die bekannte Reaktion des 1-Chlor-2-desoxyribofuranose-Derivates **15** mit einer aktivierten Form des Heterocyclus (Schema 2 a). Die Basen **4** und **5** wurden als Quecksilber(II)-Salze **16** bzw. **17** aktiviert; die Base **12** war bereits eine geeignete aktivierte Form von **6**. Kondensation von **16**, **17** und **12** mit Verbindung **15** in einem inertnen Lösungsmittel führte, in damals befriedigender Ausbeute, zu **18**, **19** bzw. **20** als Gemisch der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomere<sup>[6–10]</sup>. Die erwünschten  $\beta$ -Anomere ließen sich jeweils durch Chromatographie an Kieselgel oder Aluminiumoxid abtrennen.

a)



b)

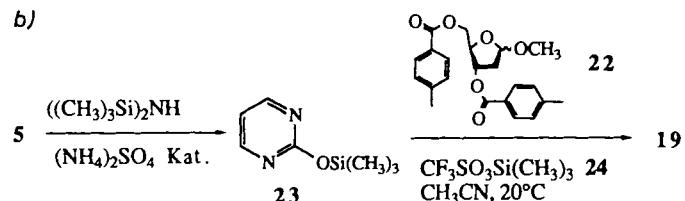
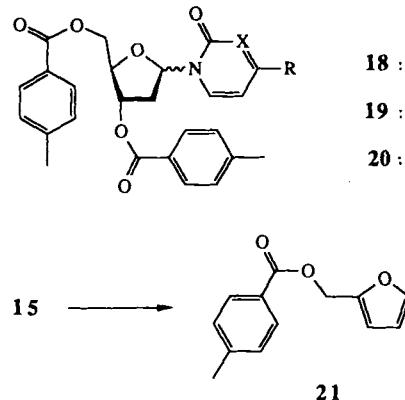
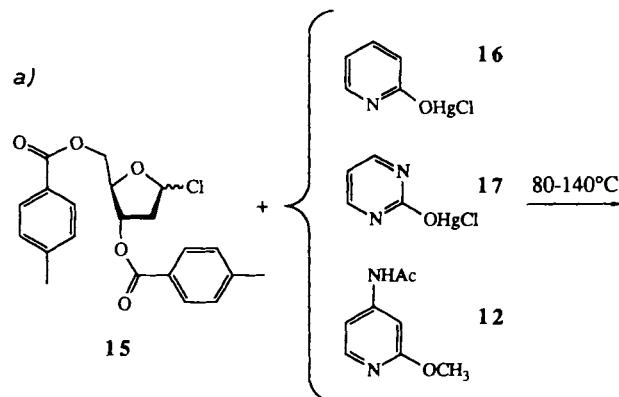


Schema 1. Synthese der Basen-Analoga a) 12 und b) 6.

Ein Nachteil der oben beschriebenen Glycosylierung war die geringe thermische Stabilität von 15; unter den gewählten Bedingungen ging es zu einem großen Teil in das Eliminierungsprodukt 21 über. Diese Reaktion ließ sich jedoch durch Verwenden des stabileren Methylglycosids 22 und durch geeignete Aktivierung der Base vermeiden (Schema 2b). Die Base 5 wurde als Trimethylsilylderivat 23 aktiviert und in Gegenwart von Trifluormethansulfonsäure (zur Entfernung der Methoxygruppe) mit 22 glycosyliert<sup>[11]</sup>.

Als weiterer Nachteil erwiesen sich die oft bescheidenen Ausbeuten der erwünschten  $\beta$ -Anomere. Um diese zu verbessern, bot sich die Desoxygenierungsmethode nach Barton et al.<sup>[12]</sup> an. Normalerweise reagieren 2-Desoxyribofuranose-Derivate unspezifisch an C-1, sofern nicht die Epimerisierung bei der Herstellung der anomererenreinen 1 $\alpha$ -Chlor-2-desoxyribose-Derivate  $\alpha$ -15 und bei der Glycosylierung durch besondere Maßnahmen unterdrückt wird (vgl.<sup>[13, 14]</sup>). Geeignete Ribofuranose-Derivate lassen sich aufgrund der Nachbargruppenbeteiligung einer 2 $\alpha$ -Tosyl-<sup>[15]</sup> oder einer 2 $\alpha$ -Benzoylgruppe<sup>[5, 16]</sup> selektiv in die 1 $\beta$ -Anomere überführen. Die besten Bedingungen für Glycosylierungen sind Raumtemperatur unter Verwendung handelsüblicher und stabiler 1-O-Acetyl-2,3,5-O-tribenzoyl- $\beta$ -D-ribofuranose 25<sup>[5]</sup> oder 1,2,3,5-Tetra-O-acetyl- $\beta$ -D-ribofuranose<sup>[17a]</sup>, pertrimethylsilylierter Basen und einer Lewis-Säure wie Trifluormethansulfonsäuretrimethylsilylester 24 oder Zinntrichlorid als 1-Desacetoxylierungsreagens. Ein Beispiel der von uns gegenwärtig bevorzugten Herstellungsmethode des 2'-Desoxy- $\beta$ -ribofuranosides 34 findet sich in Schema 3. Die aktivierte Base 26 wird durch zweifaches Silylieren des Amiopyridons 6 hergestellt und in situ mit 25 in Gegenwart von Zinntrichlorid zum Nucleosid-Analogon 27 glycosyliert<sup>[5]</sup>. Das anomererenreine Produkt wird dann zuerst zu 28 N-acetyliert, selektiv zu 29 debenzoyliert und in 3'- und 5'-Stellung mit 1,3-Dichlor-1,1,3,3-tetraisopropylsiloxan 30 zum Ribosederivat 31 bisilyliert. Diesen gewöhnlich mit hohen Ausbeuten durchführbaren Reaktionen folgt eine zweistufige Desoxygenierung<sup>[18]</sup>. Zuerst wird eine radik-

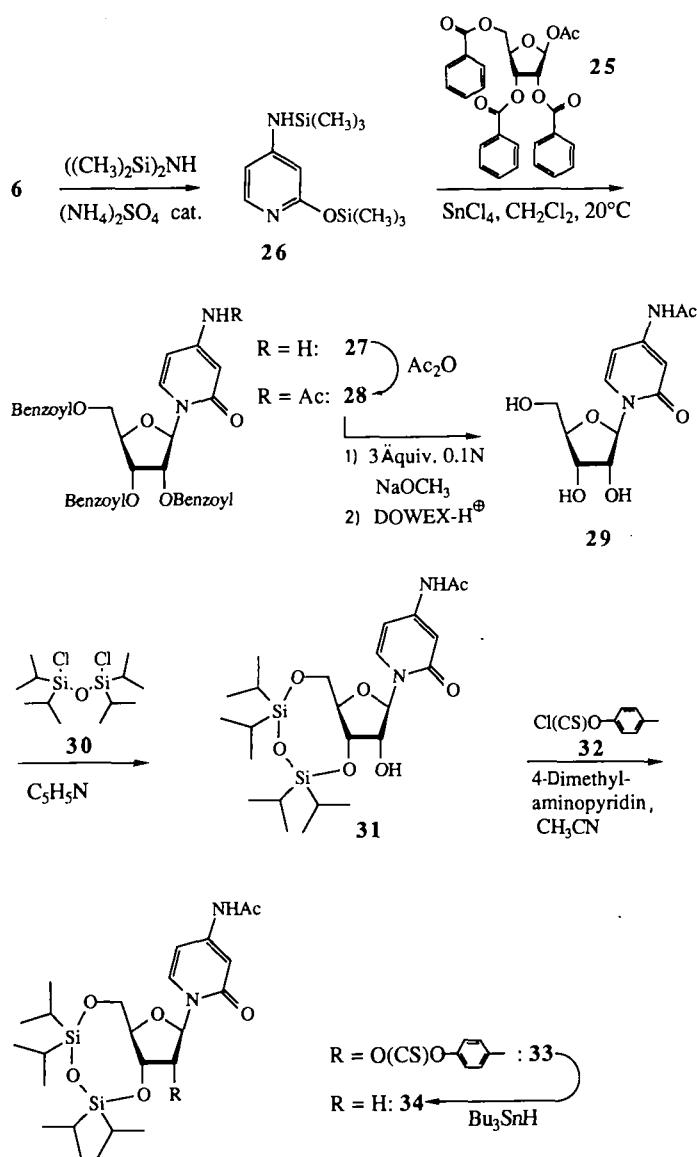
phile funktionelle Gruppe (Thiocarbonat oder Xanthogenat) in 2'-Position eingeführt. Routinemäßig verwenden wir hier den Chlorthioameisensäure-p-tolyester 32. Das chromatographierbare, stabile Thiocarbonat 33 kann entweder in guter Ausbeute isoliert oder in situ mit Tributylzinnhydrid in das 2'-Desoxyderivat 34 überführt werden<sup>[17b]</sup>.



Schema 2. Glycosylierung unter Verwendung von a) 15 und b) 22.

### 2.1.2. Phosphorylierungen

Im Hinblick auf die Verwendung der phosphorylierten Produkte wurden mehrere Phosphorylierungsverfahren geprüft. Als erstes wurde das Pyridon-Nucleosid 1 phosphoryliert. Reaktionen mit Bis(2,2,2-trichlorethyl)phosphorchloridat, einem wegen seiner 5'-Selektivität attraktiven Phosphorylierungsreagens<sup>[19]</sup>, ließen schon früh erkennen, daß 1 labiler als die natürlichen Pyrimidon-Nucleoside dT und dC ist<sup>[16]</sup>. Als Reagens der Wahl für die 3'- und 5'-Phosphorylierung bewährte sich Pyridinium-2-cyanethylphosphat<sup>[20]</sup>, zusammen mit einem Kondensationsreagens wie Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) oder Mesitylensulfonylchlorid<sup>[21-23]</sup>. Die 2-Cyanethylgruppe ließ sich mit Ammoniak durch  $\beta$ -Eliminierung entfernen, wobei die Ammoniumsalze der Phosphorsäuremonoester entstanden.

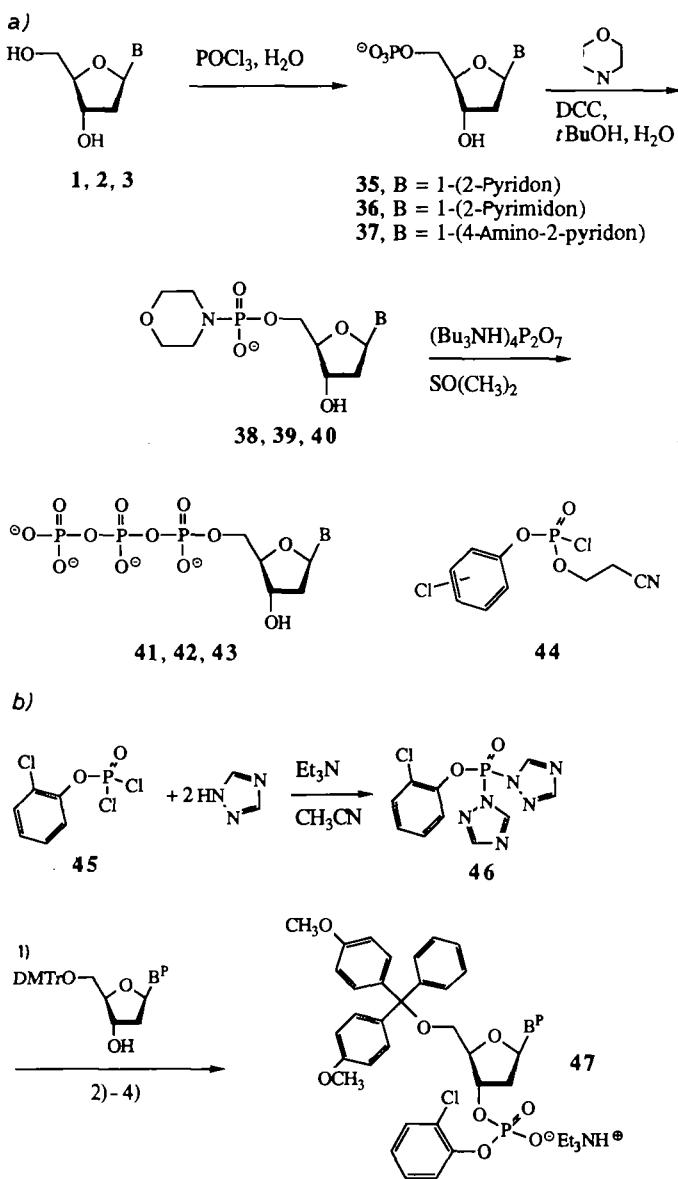


Schema 3. Glycosylierung unter Verwendung von 25.

Für eine direkte Herstellung der Nucleosid-5'-monophosphate wurde eine alternative Synthese entwickelt (Schema 4a)<sup>[24]</sup>. Behandeln der Nucleosid-Analoga 1–3 mit einem Gemisch von Phosphorsäuretrichlorid und wenig Wasser führte in hohen Ausbeuten zu den 5'-phosphorylierten Produkten 35–37<sup>[25–27]</sup>. Unter diesen Bedingungen konnte weder eine Phosphorylierung in 3'-Stellung noch eine Abspaltung der Basen beobachtet werden. Bei den drei Analoga erwies sich die Glycosylbindung im Pyrimidon-Nucleosid 2 als die labilste sowohl gegenüber Säuren als auch gegenüber Basen<sup>[25]</sup>. Deshalb war diese direkte Methode besonders für die 5'-Phosphorylierung von 2 geeignet. Die Verbindungen 35–37 wurden über die reaktiven Phosphoramidate 38–40 nach Moffat und Khorana<sup>[28, 29]</sup> in die Triphosphate 41–43 übergeführt (Schema 4a)<sup>[27]</sup>.

Andersartige Phosphate der Nucleosid-Analoga waren für die Synthese der DNA-Oligomere erforderlich. Zum Arbeiten nach der Phosphotriester-Methode wurden vollgeschützte Nucleosid-3'-monophosphatriester mit Standard-Schutzgruppen verwendet. Als intermediäre 5'-Schutzgruppen dienten säurelabile Di- oder Monomethoxytritylgruppen,

während *N*<sup>6</sup>-Benzoyl-, *N*<sup>4</sup>-Anisoyl- und *N*<sup>2</sup>-Isobutyrylamide als permanente Schutzgruppen für die Adenyl-, Cytidyl- bzw. Guanylderivate Verwendung fanden<sup>[30–32]</sup>. Die *p*- (später *o*-)Chlorphenylgruppe wurde als permanente Phosphatschutzgruppe eingesetzt; diese Gruppen ließen sich nach dem letzten Kondensationsschritt selektiv mit dem 1,1,3,3-Tetramethylguanidiniumsalz von (*E*)-4-(später 2-)Nitrobenzaldehyd oxim entfernen<sup>[33, 34]</sup>. Als Phosphorylierungsreagentien, die mit den Analoga vereinbar waren, erwiesen sich *p*- und *o*-Chlorphenyl-(2-cyanethyl)phosphorchloridat 44. Die 2-Cyanethylgruppe erhöht die Lipophilie der Bau-



Schema 4. a) Phosphorylierungen in 5'-Stellung; b) Phosphorylierungen in 3'-Stellung. B<sup>P</sup> (geschützte Basen): 9-(*N*<sup>2</sup>-Isobutyrylguanin), 1-(*N*<sup>4</sup>-Anisoylcytosin) oder 1-{*N*<sup>4</sup>-(1-Methylpyrrolidin-2-yliden)cytosin} [39] und 9-{*N*<sup>6</sup>-(1-Methylpyrrolidin-2-yliden)adenin} [40]. Keine Schutzgruppe an 1-Thymin. 1) Partiell geschütztes Nucleosid; 2) Et<sub>3</sub>N/Pyridin/H<sub>2</sub>O; 3) aq. Et<sub>3</sub>NH HCO<sub>3</sub>, in CHCl<sub>3</sub> extrahieren; 4) Chromatographie an SiO<sub>2</sub>, Fällung.

steine und ermöglicht es, sie auf Kieselgel zu chromatographieren, muß aber vor jedem Kondensationsschritt mit einer Base wie Triethylamin oder *tert*-Butylamin abgespalten werden<sup>[31, 32, 35–37]</sup>.

Kürzlich haben wir gefunden, daß sich ein Lösungsmittelgemisch (Ethylacetat/Methanol/Wasser 4:1:0.1–0.7) für die Chromatographie stark polarer Verbindungen wie etwa Aminosäuren dazu eignet, vollständig geschützte Bausteine des Typs **47** als Triethylammoniumsalz durch „Flashchromatographie“ (Kieselgel 40–65 µm) zu reinigen, ohne daß dabei die sehr säureempfindliche 5’-(Dimethoxytrityl)-Schutzgruppe abgespalten wurde. Dadurch konnten wir nicht nur auf die 2-Cyanethylphosphat-Schutzgruppe verzichten (die sich beim längeren Aufbewahren thermisch ein wenig zerstört), sondern auch das einfache *o*-Chlorphenylphosphordichloridat **45** als Phosphorylierungsreagens verwenden. Schema 4 b faßt die von uns zur Zeit bevorzugte Phosphorylierungsmethode zusammen. Sie lehnt sich an das Verfahren von *Chattopadhyaya* und *Reese*<sup>[38a]</sup> an und verwendet das in situ hergestellte Phosphordimidazolid **46** als reaktive Spezies zur Herstellung des Triesterbausteins **47**<sup>[38b]</sup>.

## 2.2. Kondensationen der Nucleotide

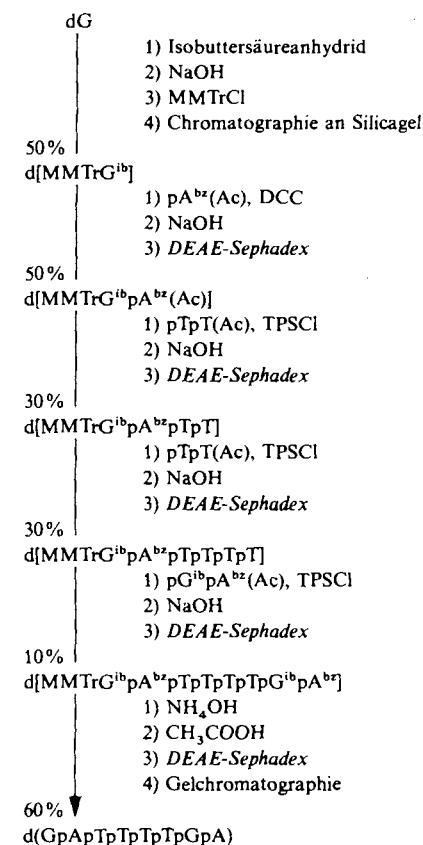
### 2.2.1. Synthese in Lösung

Zu Beginn unserer Studien (Anfang der siebziger Jahre) hatte sich noch kein Verfahren zur Synthese von Oligodesoxynucleotiden durchsetzen können. Die milden Reaktionsbedingungen, insbesondere die Verwendung von DCC als Kupplungsreagens, bei der Kondensation nach der Phosphodiestermethode von *Gilham* und *Khorana*<sup>[41]</sup> schienen auch für unsere Synthesen günstig zu sein, denn bei Versuchen mit dem Nucleosid-Analogon **1** hatte sich gezeigt, daß wir es mit instabilen Substraten zu tun hatten<sup>[6, 7]</sup>. Trotzdem verwendeten *Falk* et al.<sup>[21]</sup> in Anlehnung an *Letsinger* und *Ogilvie*<sup>[20]</sup> noch die ursprüngliche Variante der Phosphotriestermethode; bei mehreren Polythymidin-Nucleotiden schien das Diesterverfahren von *Khorana* und *Vizsolyi*<sup>[42]</sup> höhere Ausbeuten als das Phosphotriesterverfahren zu ergeben. In der Tat lieferten die Synthesen von Di- und Trinucleotiden, die das Pyridon **4** und das Pyrimidon **5** enthielten, nach der 5’ → 3’-Diestermethode vielversprechende Resultate<sup>[22, 23, 25, 26, 43, 44]</sup>. Hingegen bildeten sich interessanterweise bei der 3’ → 5’-Diestermethode nach *Weimann* und *Khorana*<sup>[45]</sup> dimere Pyrophosphate (Selbstkondensationsprodukte)<sup>[23]</sup>. Diese Ergebnisse ermöglichen uns die Entwicklung einer Synthesestrategie für den schrittweisen Aufbau größerer Oligonucleotide mit modifizierten Basen.

Der Plan zur enzymatischen Kettenverlängerung mit modifizierten Basen gliedert sich im Wesentlichen in zwei Teile, nämlich in die Synthese eines natürlichen Primerstranges und dreier Templatstränge, welche die Basen **1**, **2** bzw. **3** in definierten Positionen enthalten<sup>[46]</sup>. Als Enzym für die Replikationsexperimente wurde die DNA-abhängige *Escherichia coli*-DNA-Polymerase I (pol I, E.C.2.7.7.7.) gewählt, welche einen DNA-Templat- und einen DNA- (oder in vivo RNA)-Primerstrang in einer Länge von sieben bis neun Nucleotiden benötigt. Ferner soll die DNA doppelsträngig und der Templatstrang bei diesem Versuch etwas länger als der Primerstrang sein. Die folgenden Sequenzen wurden gewählt (Versuchsbedingungen und Resultate siehe Schema 8): ein tridecamerer Templatstrang 5’-d(TpTpNpCpGpTpCpApApApTpC)-3’, wobei N

für 1–3 steht (in der Folge als Templat **I**, **II** bzw. **III** bezeichnet), und ein octamerer Primerstrang 5’-d(GpApTpTpTpGpA)-3’. Der Primerstrang ist komplementär zum 3’-Ende des Templatstranges; fünf Nucleotide mit N in der Mitte bleiben als effektiver Templatstrang übrig.

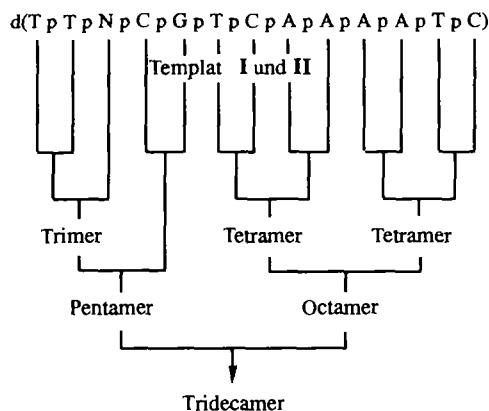
Der Primerstrang wurde durch eine Dinucleotid-Blocksynthese (Schema 5) erhalten<sup>[47]</sup>. Da bei der Diestermethode



Schema 5. Totalsynthese des Octadesoxynucleosid-heptaphosphats GATTTT-GA in Lösung nach der 5' → 3'-Phosphodiestermethode. Abkürzungen: <sup>ib</sup> = *N*<sup>2</sup>-Isobuturyl; <sup>bz</sup> = *N*<sup>6</sup>-Benzoyl; (Ac) = 3'-O-Acetyl; MMTr = 5'-O-[4-Methoxyphenyl]diphenyl-methyl (Monomethoxytritylether); p = Phosphorsäurediester; DCC = Dicyclohexylcarbodiimid; TPSCl = 2,4,6-Trisopropylbenzolsulfonylchlorid; DEAE-Sephadex = starker Anionenaustauscher.

sterisch gehinderte, relativ unreaktive sekundäre Alkohole als Nucleophile dienen, entstanden immer die unerwünschten Pyrophosphate (nicht aktivierte Phosphatgruppen konkurrieren mit 3'-OH-Funktionen). Dies führte zu niedrigen Ausbeuten der Produkte (Schema 5). Ein zweites Problem warf die anionische Natur der Reaktanten und Produkte (Phosphorsäurediester) auf, die mühsam an Ionenaustauscherharzen getrennt werden mußten. Somit hatte die Diestermethode bei der Synthese eines Octamers ihre Grenzen erreicht.

Deshalb wechselten wir zur Triestermethode über<sup>[35, 48]</sup>, führten zwei Blocksynthesen des Templat **I** durch und verglichen die Diester- mit der Triestermethode<sup>[31]</sup>. Obwohl es möglich war, einen wesentlichen Teil der Synthese durchzuführen, gaben wir die Diestermethode auf. Die Triestermethode (Schema 6) basiert auf den üblichen, vollständig geschützten Nucleosid-3'-phosphorsäuretriestern, wie sie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben sind. Das entschützte Trideca-



Schema 6. Blocksynthese von Tridecadesoxynucleosid-dodecaphosphat TTNCGTAAATC (N = 1: Templat I, N = 2: Templat II) in Lösung nach der Phosphotriestermethode.

mer wurde durch präparative Schicht- und Ionenaustauschchromatographie sowie Umkehrphasen-HPLC gereinigt. Abbau mit Phosphodiesterase I und HPLC-Analyse des Monomerengemisches bestätigten das erwartete Basenverhältnis. Das Templat II wurde im wesentlichen auf dieselbe Art hergestellt<sup>[32]</sup>. Sowohl die HPLC-Analyse des von Phosphodiesterase I hydrolysierten Oligomers als auch die Sequenzanalyse nach Maxam und Gilbert<sup>[49a]</sup> bestätigten die Nucleotidsequenz.

Die Resultate der Einbau- und Replikationsversuche (siehe Abschnitt 3.2) ermutigten uns zur Fortsetzung unserer Synthesen. Der Bedarf an recht großen Mengen sehr reiner Oligomere (50–100 mg), die durch <sup>1</sup>H-NMR-, <sup>15</sup>N-NMR- und CD-Spektroskopie sowie, falls kristallisierbar, durch Röntgenstrukturanalyse untersucht werden könnten, legt die Verwendung der Blocksynthese-Strategie und der nun bewährten Triestermethode in Lösung nahe. Zur Zeit stellen wir fünf selbstkomplementäre Oligomere her: zwei Hexa-

mere (als TZ und CZ bezeichnet), zwei Heptamere (TT und CC) und ein Octamer (TC). Die Gründe dieser Wahl werden in Abschnitt 3.3 diskutiert.

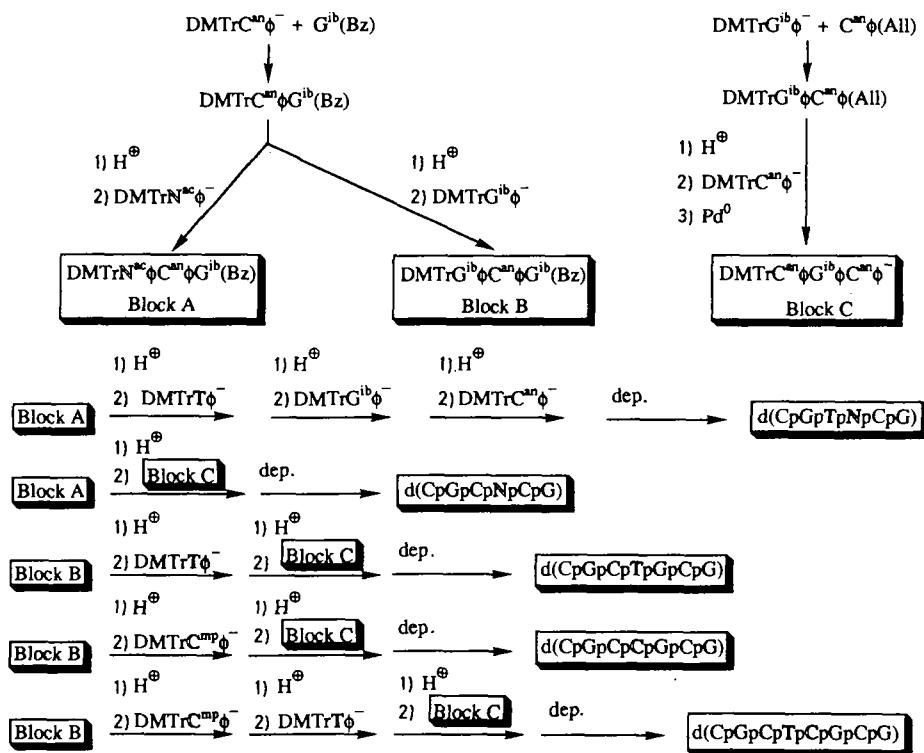


Die Trinucleotidsequenzen NCG, GCG und CGC kommen in mehreren Oligomeren vor und dienen deshalb, wie in Schema 7 gezeigt, als Blöcke A, B und C. Die zentralen Basen sind durch hochangereicherte <sup>15</sup>N-Isotope markiert. Sie wurden ausgehend von markiertem Harnstoff (für markiertes dT), Uracil und Ammoniak (für markiertes dC) und Ammoniak (für markiertes 3) gemäß Schema 1b, hergestellt<sup>[49b]</sup>. Die Synthesestrategie basiert teilweise auf einem modernen Verfahren in Lösung, der „Filtration Method“ von Chaudhuri et al.<sup>[50]</sup>.

Bei dieser Triestermethode (5' → 3'-Kettenverlängerung) werden monomere Bausteine verwendet; wir wählten die gleichen Bausteine wie in Abschnitt 2.1.2 (47, Schema 4b). Nach Angabe der Autoren liefert die Verwendung eines effizienten Kondensationsmittelgemisches so gute Ausbeuten, daß bis zu fünf Kupplungscyclen (bei unserer Synthese drei Cyclen) ohne chromatographische Reinigung der Zwischenprodukte möglich sind.

## 2.2.2. Synthese am festen Träger

Die chemische Empfindlichkeit von **1** und **2** ließ keine Synthese am festen Träger zu, da das Risiko bestand, ein Gemisch von Tridecameren mit teilweise abgespaltenen Pyridin- oder Pyrimidinbasen zu erhalten. Die zusätzliche Aminogruppe in **3** erhöht die Stabilität dieses Nucleosids wesentlich, was vermutlich auf den +M-Effekt der funktionellen



Schema 7. Triester-Blocksynthese von zwei Hexameren, zwei Heptameren und einem Octamer in Lösung. <sup>an</sup> = N<sup>4</sup>-Anisoyl; <sup>ib</sup> = N<sup>2</sup>-Isobutyryl; (Bz) = 3'-Benzoyl; Φ = 2-Chlorphenylphosphat; Φ(All) = Allyl(2-chlorphenyl)phosphat; Φ<sup>-</sup> = Triethylammonium(2-chlorphenyl)phosphat; dN<sup>a</sup> = 4-[<sup>15</sup>N]-Acetamido-1-(2'-desoxy-β-D-ribofuranosyl)-[1,3-<sup>15</sup>N]<sub>2</sub>-(1H)-pyridon; T = [1,3-<sup>15</sup>N]<sub>2</sub>-Thymidin; dC<sup>mp</sup> = N<sup>4</sup>-(1-Methylpyrrolidin-2-yliden)-[1,3,N<sup>4</sup>-<sup>15</sup>N]<sub>3</sub>-2'-desoxycytidin. – dep. = Abspaltung der Schutzgruppen.

Gruppe in *p*-Stellung zur Glycosylbindung zurückzuführen ist. Die Abspaltung der Base war also kein großes Problem mehr, so daß für die Herstellung des Templa<sup>t</sup>s III die Synthese am festen Träger geplant wurde. Damals hatte man die Wahl zwischen der raschen Phosphit-<sup>[51, 52]</sup> und der Phosphotriestermethode. Die heute meist verwendete Phosphoramiditmethode<sup>[53a]</sup> stand für Routinearbeiten noch nicht zur Verfügung. Vorversuche zeigten, daß die Kupplungsbedingungen bei der Phosphitmethode zu drastisch waren; es resultierten symmetrisch verknüpfte Nebenprodukte und eine geringere Ausbeute als bei der Triestermethode<sup>[53b]</sup>. Darüber hinaus erwies sich die letztgenannte, langsamere Methode als flexibler; so konnten z. B. di- und trimere Bausteine verwendet werden. Dank der guten Erfahrungen mit den Nucleotid-Analoga und der Triesterchemie in Lösung entschieden wir uns, bei dieser Methode zu bleiben.

Die gesamte Synthese wurde in einem manuell kontrollierten, geschlossenen System durchgeführt. Die Lösungen wurden unter schwachem Überdruck mit trockenem Stickstoff über ein Achtwegventil in die Säule, die den festen Träger enthielt, gepumpt. Da zu Beginn unserer Arbeiten das heute weitverbreitete „controlled-pore glass“ (CPG) noch unbekannt war, verwendeten wir mit 1% Divinylbenzol quervernetztes Styrol als Trägermaterial. Während der Templat-III-Synthese wurden die Reaktionsbedingungen optimiert und bei der Synthese des octameren Primers GATTTTGA getestet<sup>[10, 37]</sup>. Die Bausteine für Templat III waren Mono-, Di- und Trimere gleicher Struktur, wie sie für die Synthesen der Template I und II verwendet worden waren (vgl. Abschnitt 2.1.2). Jedoch bauten wir GATTTTGA vollständig aus monomeren Bausteinen auf.

Von mehreren geprüften Kupplungsreagentien kondensierte Mesitylensulfonyl(3-nitro-1,2,4-triazol-1-id)/1-Butylimidazol (minimale Kondensationszeit auf festem Träger: 10 min) am raschesten. Dieses Reagens lieferte auch die besten Ausbeuten. Die Überlegenheit des Katalysators 1-Butylimidazol gegenüber dem üblicherweise verwendeten 1-Methylimidazol war bereits bei der Phosphorylierung in Gegenwart von 44 beobachtet worden<sup>[31]</sup>. Dies läßt sich durch die erhöhte Nucleophilie des Butylderivats erklären, das entscheidend für den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Kupplungsreaktion ist<sup>[10]</sup>. Wesentlich nucleophile Katalysatoren wie das von Efimov et al.<sup>[54]</sup> verwendete 4-(Dimethylamino)pyridin-1-oxid führten zu beträchtlich kürzeren Kupplungszeiten (ca. 1 min), so daß die Triestermethode heute mit der raschen Phosphoramiditmethode konkurrieren kann. Entsprechend lag die durchschnittliche Kupplungsausbeute bei der optimierten Synthese des Octamers bei 98 %, womit sich die Maskierung von nicht umgesetztem Material erübrigte.

Die Methode zur Entfernung der Schutzgruppen im letzten Schritt mußte für das Templat III modifiziert werden, da sich die *N*<sup>4</sup>-Acetylgruppe unter den Standardbedingungen (conc. NH<sub>3</sub>, 55 °C) nicht vom Basen-Analogon abspalten ließ. *N*<sup>4</sup>-Acetyl-3-desaza-2'-desoxycytidylat ist ein von einem Enamin abgeleitetes Amid; die Basenschutzgruppe erwies sich bei der Ammonolyse stabiler als diejenige in einem von einem Amidin abgeleiteten Amid, z. B. in *N*<sup>4</sup>-Anisoyldeoxy-cytidylat. Nach Abspalten der permanenten Phosphatschutzgruppen und teilweiser Freisetzung des Produktes vom festen Träger durch Benzaldehydoximat und Abspalten der Benzoyl-, Anisoyl- und Isobutyrylschutzgruppe sowie

vollständiger Freisetzung vom Träger mit Ammoniak ließ sich das Basen-Analogon im Tridecamer durch Hydrolyse mit 1N NaOH innerhalb von 30 min desacetylieren. Interessanterweise genügte die Erzeugung eines Polyanions durch Benzaldehydoximat als Schutz der Phosphodiesterbindungen, die bei der anschließenden Behandlung mit starker Base nicht abgespalten wurden.

Die Reinheit der Produkte wurde durch HPLC-Analyse und im Falle des Templa<sup>t</sup>s III durch Gelektrophorese bestätigt. Die Hydrolyse der Trideca- und Octamere mit Phosphodiesterase I ergab die erwarteten Anteile an Mononucleotiden, wie die HPLC-Analyse bewies<sup>[10, 37]</sup>.

### 3. Basenpaarung mit modifizierten Nucleotiden

#### 3.1. Prokaryotische DNA-Polymerasen als Modellsystem

DNA-Polymerase I (pol I) aus *Escherichia coli* ist das prokaryotische DNA-synthetisierende Enzym, das gegenwärtig am besten charakterisiert ist<sup>[55, 56]</sup>. Es hat ein Molekulargewicht von 103 000 Da und weist drei Domänen auf (Abb. 4).

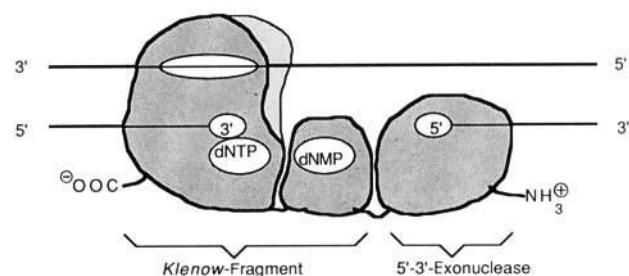


Abb. 4. Schematische Darstellung der DNA-gebundenen DNA-Polymerase I aus *E. coli* (nach Joyce und Steitz [57]).

Die Polymerase-Domäne enthält eine Templat-DNA-Bindungsstelle, eine Bindungsstelle für das DNA-3'-Ende des Primers und eine Bindungsstelle für ein Nucleosidtriphosphat (dNTP). Die 3'-5'-Exonuclease-Domäne hat eine weitere Bindungsstelle für ein 3'-Ende, die ebenso ein Nucleosid-monophosphat (dNMP) binden kann. Das Enzym schneidet frisch polymerisierte, 3'-terminale Nucleosid-5'-monophosphate aus dem Primerstrang heraus und wirkt so als Korrekturenzym. Diese Domänen werden zusammen als Klenow-Fragment oder großes (proteolytisches) Fragment bezeichnet; sein Molekulargewicht beträgt 68 000 Da. Beide Domänen benötigen Magnesium-Ionen. Das kleinere Fragment, die 5'-3'-Exonuclease-Domäne mit einem Molekulargewicht von 35 000 Da, entfernt die DNA vom wachsenden Ende der DNA-Kette<sup>[57, 58]</sup>.

Dieses enzymatische System diente uns als Modellenzym für die DNA-Synthese. Unser Ziel bestand darin abzuklären, ob unsere Analoga von der dNTP-bindenden Stelle oder der templatbindenden Stelle der Polymerase gebunden werden, und das Verhalten der Analoga mit dem der natürlichen Substrate zu vergleichen. Da bekanntlich DNA-Polymerase I von *E. coli* eine gewisse DNA-Nucleaseaktivität aufweist, wurde zusätzlich DNA-Polymerase aus *Micrococcus luteus*

getestet; dieses verwandte Enzym hat eine wesentlich geringere DNA-Nucleaseaktivität.

### 3.2. Enzymatische Reaktionen

#### 3.2.1. Durch DNA-Polymerase katalysierter Einbau in vitro unter Verwendung modifizierter Nucleosidtriphosphate<sup>[59]</sup>

Die drei Triphosphate **41**, **42** und **43** (Schema 4a) können als dCTP-Strukturanaloga angesehen werden. Sie wurden deshalb anstelle von dCTP zur Bestimmung ihrer Einbaurate in DNA verwendet. Polymerase wurde mit einem Gemisch von aktivierter DNA aus Kalbsthymus (Zufallssequenzen, die als Templat und Primer dienten), dATP, dGTP, TTP, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]TTP und zunehmenden Mengen von einem der Analoga **41**–**43** (1 bis 50 Äquivalente bezogen auf die natürlichen Triphosphate) versetzt. Nach 30 min wurde die entstandene DNA ausgefällt und gewaschen und die Einbaurate der Nucleotide durch Szintillationsmessung des (radioaktiven) Produkts bestimmt. Beide Enzyme, pol I und *M.-luteus*-DNA-Polymerase, gaben übereinstimmende Resultate, die nicht vom Zugabemodus der Analoga abhingen. Dies bedeutet entweder, daß die Polymerisation abließ, bis der Einbau des ersten dCMP fällig war und daß keines der Analoga **41**–**43** eingebaut wurde, oder aber, daß die Synthese nach dem Einbau der Analoga aufhörte. Um dies zu prüfen, wurde dCTP nach der ersten Inkubationsphase zugegeben und die Reaktion nach weiteren 30 min abgebrochen. Dabei nahm die Einbaurate zu; sie entsprach praktisch der Einbaurate, die bei Inkubation mit allen vier natürlichen Nucleosidtriphosphaten gemessen worden war. Daraus geht hervor, daß die Polymerase die Verbindungen **41**–**43** nicht in DNA einbauen kann. Der Ersatz der Thymus-DNA durch synthetische poly-d(GC) und von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]TTP durch [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dGTP bei Zugabe steigender Mengen der Analoga **41**, **42** und **43** lieferte das gleiche Resultat.

Eine mögliche Hemmung der Polymerase durch die Substrate **41**–**43** konnte nicht ausgeschlossen werden. Um eine Inhibition messen zu können, wurde ein Gemisch von *M.-luteus*-DNA-Polymerase, Thymus-DNA oder poly-d(GC) und [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]TTP bzw. [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dGTP und allen natürlichen Nucleosidtriphosphaten (mit poly-d(GC) wurden nur dGTP und dCTP verwendet) mit steigenden Mengen an **41**, **42** oder **43** inkubiert und unter denselben Bedingungen wie oben behandelt. Eine sehr schwache Hemmung resultierte in Gegenwart der beiden Template und der drei Analoga. Die DNA-Synthese wurde bei Zugabe eines 50fachen Überschusses der Substrate **41**, **42** oder **43** am natürlichen Templat um 50% und an poly-d(GC) um 70% gehemmt.

Um die Art der Hemmung durch die Verbindungen **41**–**43** zu ermitteln, unternahmen wir zusätzliche Versuche. Wir inkubierten drei natürliche Nucleosidtriphosphate in gleichbleibenden Mengen und eines – dATP oder dCTP – in steigender Menge mit einem Gemisch von *M.-luteus*-Polymerase und Thymus-DNA während 15 min. Dadurch konnte die Abhängigkeit der DNA-Synthese (d. h. die Reaktionsgeschwindigkeit  $v$ ) von der Substratkonzentration ( $[S]$ , wobei  $S$  für dATP oder dCTP steht) untersucht werden. Diese Abhängigkeit wurde einmal mit und einmal ohne einen der Inhibitoren **41**–**43** in 50fachem Überschuß bestimmt. In den Experimenten ohne Inhibitorzusatz erreichte die Geschwin-

digkeit  $v$  der DNA-Synthese mit zunehmender Konzentration an  $S$  rasch ihr Maximum  $v_{\max}$ . Dieselben Beobachtungen wurden nach Zugabe der drei Inhibitoren gemacht, jedoch mit dem Unterschied, daß lediglich ein Geschwindigkeitsmaximum erreicht wurde, das 50% unter dem ohne Inhibitorzusatz lag. Die Lineweaver-Burke-Auftragung<sup>[60]</sup> ( $1/v$  über  $1/S$ ) der Meßwerte von Experimenten mit oder ohne Inhibitorzusatz deutete darauf hin, daß die Analoga **41**–**43** eine nicht-kompetitive Hemmung ausüben.

#### 3.2.2. Durch DNA-Polymerase katalysierter Einbau in vitro unter Verwendung modifizierter Nucleotide im Templatstrang

Wie bereits in Abschnitt 2.2 beschrieben, sind drei Templatstränge, die je ein Basen-Analogon enthalten, hergestellt worden. Der Primer GATTTGA sollte enzymatisch verlängert werden (Schema 8), wobei zuerst die Eignung des Primers und der Template **I**, **II** und **III** als DNA-Matrizen für das Klenow-Fragment (pol I\*) zu überprüfen waren. Für alle weiteren Studien wurde ausschließlich das große Fragment aus *E.coli*-DNA-Polymerase I verwendet, da das Gesamt-enzym eine zusätzliche 5'-3'-Exonucleaseaktivität enthält (vgl. Abschnitt 3.1), die nach der Replikation mono- bis decamere Nucleotidfragmente aus doppelsträngiger DNA herausschneiden kann<sup>[55]</sup>; dies hätte die Interpretation der Resultate von Replikationsexperimenten sehr erschwert.

Pol I\* wurde zusammen mit den notwendigen Zusätzen (Puffer, Mg<sup>2+</sup>-Salze, etc.), [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP, dem ersten einzubauenden Nucleosidtriphosphat, einer äquimolaren Menge der Template **I**, **II** oder **III** und dem Primer 90 min inkubiert. Danach wurde an den durch HPLC getrennten Produkten die Radioaktivität bestimmt. Durch Vergleich mit Kontrollexperimenten ohne Enzym konnte der größte Anteil der Gesamtaktivität dem verlängerten Primer d(GpApTpTpTpGpA [<sup>32</sup>p]C) zugeordnet werden. Dies bestätigte das korrekte Funktionieren des Replikationssystems. Als nächstes wurde der Primerstrang am 5'-Ende durch Umsetzen mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]dATP in Gegenwart von Polynucleotid-Kinase markiert; nach HPLC-Reinigung wurde d([<sup>32</sup>p]GpApTpTpTpGpA) (P-32-Primer) erhalten<sup>[10]</sup>.

Bei den Replikationsexperimenten<sup>[61]</sup> wurden äquimolare Mengen der Template **I**, **II** oder **III**, des P-32-Primers sowie von dATP, dGTP, dCTP und TTP in einer Lösung von Puffersalzen und Additiven 5–10 min auf 60 °C erhitzt, um eventuelle unerwünschte Sekundärstrukturen zu zerstören. Dann wurde die Lösung langsam abgekühlt, was die Bildung der Primer/Templat-Doppelhelix ermöglichte. Nach Zusatz von pol I\* wurde das Gemisch 30 min inkubiert; die Replikationsprodukte ließen sich einerseits direkt durch Gelektrophorese und Radiographie und andererseits durch Sequenzanalyse und Radiographie nach Maxam und Gilbert<sup>[49a]</sup> analysieren.

Unsere Interpretation der Radiogramme der sequenzierten (Abb. 5) und nicht-sequenzierten (nicht abgebildet) Produkte geht aus Schema 8 hervor<sup>[61]</sup>. Mit dem Templat **I** wurde der P-32-Primer in ca. 90% Ausbeute verlängert. Die natürlichen Basen im Templat führten zum Einbau der korrekten Nucleotide, während das synthetische Analogon einen unspezifischen Einbau bewirkt. Die Replikation des Templat **II** ergab keine signifikante Primer-Verlängerung. Das erstaunlichste Resultat wurde mit dem Templat **III** erhalten. Der P-32-Primer wurde mit 100% Ausbeute vollständig

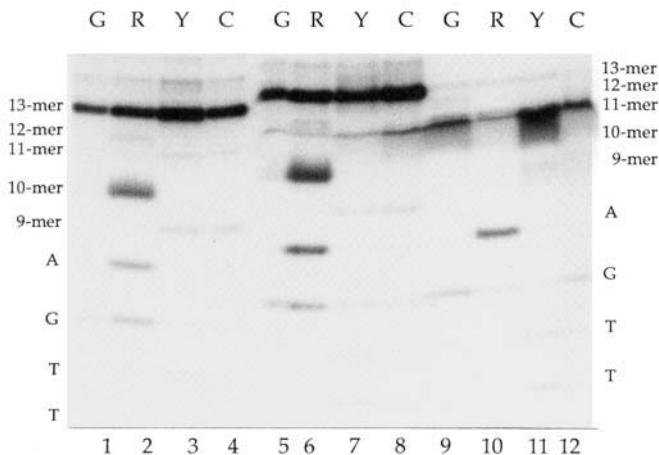
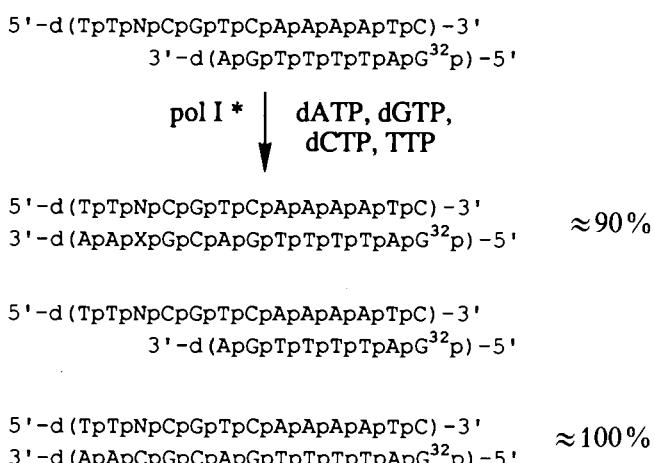


Abb. 5. Radiogramm des sequenzierten P-32-Primers nach Elongation durch pol I\* (nach *Maxam* und *Gilbert* [49 a]). Spalten 1–4: Replikation des Templa ts III. Spalten 5–8: Replikation des Templa ts I. Spalten 9–12: Replikation des Templa ts II; hier sind die Banden oberhalb des 3'-terminalen A nicht interpre tbar. G, R, C: G-, Purin-, Pyrimidin- bzw. C-spezifische strangspaltende Bedingungen.

verlängert. Es waren die korrekten Basen eingebaut; das Basen-Analogon 3 induzierte einen spezifischen Einbau von Desoxycytidylat.

I, II, III:  
P-32:



**Schema 8.** Replikationsexperimente mit den Templates I, II und III, P-32-Primer, dATP, dGTP, dCTP und TTP und dem Klenow-Fragment der *E.coli*-DNA-Polymerase I (pol I\*)

### 3.2.3. Mutagenitätstests *in vivo*

Bloch et al.<sup>[62]</sup> führten Versuche über die Wachstums-hemmung und Aktivitätstests in vivo mit 3-Desazapyrimidinribonucleosid-Analoga durch (z. B. 3-Desazauridin und 3-Desazacytidin) und fanden eine Umwandlung der Analoga in die 5'-Triphosphate, jedoch keinen Einbau in RNA oder DNA. (Nucleosid-5'-triphosphate können in vivo nicht verwendet werden, da ionische Substrate die Zellwand nicht passieren.) Unsere Einbauversuche mit 3-Desaza-2'-desoxy-cytidin-5'-triphosphat **43** in vitro bestätigten die Resultate (vgl. Abschnitt 3.2.1).

Trotzdem prüfte Bickle<sup>[63]</sup> die Mutagenität von 3 in vivo, da die Resultate mit dem Templat III (Schema 8) vermuten ließen, daß, falls 5'-Triphosphorylierung des Desoxynucleosid-Analogons 3 in vivo und Einbau in DNA gegenüber von Desoxycytidylat doch in geringstem Ausmaß stattfänden, nach einer weiteren Replikation C → G-Transversionen

bewirkt würden. Spezifische Transversionsmutagene sind sehr selten; deshalb besteht großes Interesse an einer solchen Verbindung. Leider konnte weder im Standardtest nach Ames<sup>[64]</sup> noch im empfindlicheren „Lambda-Mutatest“ nach Devoret<sup>[65]</sup> in einem weiten Konzentrationsbereich eine mutagene Aktivität von 3 festgestellt werden. Wir schlossen daraus, daß kein Einbau in die DNA erfolgte, obwohl 3 vermutlich in der Zelle 5'-triphosphoryliert worden war.

### 3.3. Interpretation der experimentellen Resultate

### **3.3.1. Strukturelle Voraussetzungen für den Einbau von Nucleotiden**

Die Triphosphate **41–43** wurden in keinem Experiment durch die DNA-Polymerase eingebaut. Wie die Erfahrungen über den Einbau zahlreicher Nucleotid-Analoga<sup>[55]</sup> und die Kenntnis der Stabilität von Komplexen zwischen Polymerase und ihren natürlichen Substraten<sup>[66]</sup> lehrt, ist die primäre Bindung eines Nucleosidtriphosphats an pol I reversibel, relativ schwach und nur wenig selektiv bezüglich der Struktur der Base.

Deshalb ist es vernünftig anzunehmen, daß alle drei mit dem natürlichen dCTP strukturell eng verwandten Verbin-

dungen sich an der Triphosphat-Bindungsstelle der Polymerase unter Komplexbildung anlagern können. Jedoch sind die Verbindungen **41**–**43** wegen ihrer beschränkten Möglichkeit zur H-Brückenbildung mit allen Basen des Templaats (Abb. 3) recht schwache Konkurrenten der gleichzeitig vorhandenen Nucleosidtriphosphate. Gemäß Abschnitt 1.4 müssen alternative Bindungsmöglichkeiten unter Beteiligung seltener Tautomere, protonierter Basenpaare oder verschobener Leserahmen für die Analoga ausgeschlossen werden, da sie ja nicht eingebaut werden.

### **3.3.2. Replikation der Template I und II**

Die Konstitution eines Nucleotid-Analogons, das 2-Pyridon enthält (z. B. I), verbietet eine Basenpaarbildung über ein Iminoproton einer Nucleotidbase (Desoxyguanylät oder Thymidylät) (vgl. Abschnitt 1.4). Der durch das Templat I dirigierte unspezifische Einbau von z. B. dGMP und TMP in

einer Position gegenüber **1** (Abb. 5) läßt eine mögliche Abspaltung von Pyridin aus dem labilen Basen-Analogon **1** vermuten; dies führte zu einer nicht-basischen Stelle. Pol I kann Spezies mit nicht-basischen Stellen replizieren, wenn auch langsam<sup>[67]</sup>.

Das Experiment mit dem Templat **II** mißlang, vermutlich wegen der außergewöhnlichen Instabilität des Analogons **2** (vgl. Abschnitt 2.1.2). Die Reihenfolge der chemischen Stabilität der Basen-Analoga ist **3 > 1 > 2**. Jedoch zeigt bereits das stabilste Templat, **III**, eine gewisse Neigung zum Strangbruch, besonders zwischen dem Nucleotid-Analogon **3** und seinem 5'-Nachbar Thymidylat, wenn es in einer Pufferlösung mit Polynucleotid-Kinase während 6 h bei Raumtemperatur inkubiert wurde<sup>[10]</sup>. Die drei Template wurden zwar unmittelbar vor der Anwendung durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt, doch wurden die Stränge nicht mehr auf ihren Gehalt an **1–3** überprüft. Selbst wenn das Templat **II** unmittelbar vor der Anwendung intakt war, muß es sich beim Erwärmen auf 60 °C, kurz vor der pol I\*-Zugabe, zersetzt haben, da ja das stabilere Templat **I** unter denselben Bedingungen höchstwahrscheinlich Pyridin abspaltet.

Beide Replikationsexperimente mit den Templaten **I** und **II** zeigten klar, wie wichtig die Stabilität der Basen-Analoga nicht nur während ihrer chemischen Synthese, sondern auch während der Replikationsexperimente ist.

### 3.3.3. Replikation des Template **III**: Die Struktur eines Pyridin-Pyrimidin-Paares in polymerasegebundener DNA

Um den spezifischen Einbau von Desoxycytidylat gegenüber dem Analogon **3** im Templat **III** zu verstehen, müssen wir uns nochmals alle theoretisch möglichen Basenpaarungen in einer Polymerase vergegenwärtigen, die mit dem Analogon im Templat möglich sind (Abb. 6). **3** kann in seiner Amino-Keto-Form mit keinem der Nucleotide ein Watson-Crick-ähnliches Basenpaar bilden, da die Wechselwirkungen zwischen den H-Atomen eine Annäherung der Basen und somit die Bildung von H-Brücken verhindern (Abb. 6a, Spalte 1). Zwei alternative Anordnungen sind denkbar: Die Wobble-Paare, wobei die eintretende Base zur großen oder zur kleinen Furche der DNA-Doppelhelix hin verschoben ist (Abb. 6a, Spalte 2 bzw. 3). In dieser Position wären Paarungen mit einigen Purin- und Pyrimidinnucleotiden sterisch möglich; bevorzugt sollte die Bindung an Desoxyguanylat sein. Da in der Position gegenüber dem Analogon **3** (innerhalb der Fehlergrenzen der Sequenzanalyse nach *Maxam* und *Gilbert*) kein Desoxyguanylat nachzuweisen war, schließen wir die Möglichkeit einer Basenpaarung mit Wobble-Anordnung in der Polymerase aus.

Die tautomere Imino-Enol-Form<sup>[\*]</sup> des Analogons **3** (**dN\***, Abb. 6b) kann im Gegensatz zur Amino-Keto-Form zwei H-Brücken mit Desoxycytidylat und weniger als zwei mit Desoxyadenylat in einer Watson-Crick-ähnlichen Anordnung bilden. Prinzipiell ist auch die Bildung von Basenpaaren mit Desoxyguanylat und Thymidylat in einer Wobble-Anordnung vorstellbar; der ausschließliche Einbau von

Desoxycytidylat beweist jedoch, daß – zumindest bei hoher Fehlerhäufigkeit – einzig die Watson-Crick-Anordnung in der Polymerase toleriert wird.

Es sollte noch eine andere Möglichkeit der Basenpaaranordnung in Betracht gezogen werden. Die eintretenden Nucleotidbasen könnten in der alternativen tautomeren Form vorliegen, in der sie ein anderes H-Substitutionsmuster aufweisen. Besonders die Lactimform von Desoxyguanylat (**dG\*TP**) und eine Iminoform von Desoxyadenylat (**3H-dA\*TP**) würden in einer Watson-Crick-Anordnung zur Amino-Keto-Form von **3** passen (Abb. 7). Von beiden Tautomeren ist bekannt, daß sie in Lösung selten, d. h. nur zu ca. 10<sup>-3</sup> bis 10<sup>-5</sup> pro Monomer der normalen Form vorkommen<sup>[68]</sup>. Da wir wieder keinen entsprechenden Einbau beobachteten, dürften sich *seltere* tautomere Formen an der Bindungsstelle für Nucleosidtriphosphate in der Polymerase ausschließen lassen. Dies stimmt mit unserer Beobachtung überein, daß die seltene (siehe unten) tautomere Form des Triphosphat-Analogons **43**, **dN\*TP**, nicht in die DNA eingebaut wurde (Abschnitte 3.2.1 und 3.3.1), sowie mit den Ergebnissen bekannter Mutagenitätsexperimente (diskutiert in<sup>[69]</sup>).

Die Frage, wie selten die Imino-Enol-Form des Nucleosid-Analogons **3** in Wasser ist, konnte durch eine vergleichende <sup>13</sup>C-NMR-Untersuchung von **3** und Desoxycytidin beantwortet werden<sup>[70]</sup>. Die tautomeren Formen von Desoxycytidin (**dC\*** und **dC''**) können spektroskopisch nicht nachgewiesen werden, weil sie sowohl in Wasser als auch in Dimethylsulfoxid (DMSO) in einem zu geringen Anteil vorhanden sind. Die Änderungen der chemischen Verschiebungen, die beim Wechsel von DMSO zu Wasser beobachtet werden, können deshalb für die Zucker-C-Atome von **dC** auf Konformationsänderungen und für die Basen-C-Atome von **dC** hauptsächlich auf Veränderungen der Solvatation oder Hydratation zurückgeführt werden. Dies gilt auch für das Analogon **3**. Die  $\delta(C)$ -Kurven beider Verbindungen sind recht ähnlich; die häufigsten Unterschiede liegen im Bereich von  $\Delta\delta_3^{dC} = 0.1$  bis 0.3, wenn die  $\delta(C)$ -Werte der entsprechenden C-Atome unabhängig von den „absoluten“ chemischen Verschiebungen verglichen werden (Abb. 8). Die größten Unterschiede betragen in reinem DMSO  $\Delta\delta_3^{dC} = 1.4$  für C-4 und 0.5 für C-5. Bei höherem Wassergehalt resultierten praktisch deckungsgleiche  $\delta(C)$ -Kurven. Dies leuchtet ein, denn wenn kein oder nur wenig Wasser vorhanden ist, erwartet man eine andere Art der Hydratisierung in der Nähe der 4-Aminogruppe, je nachdem, ob ein zusätzlicher Protonen-acceptor (N-3) vorhanden ist oder nicht.

Eine wesentliche, d. h. spektroskopisch beobachtbare Verschiebung des Tautomerengleichgewichtes von **3**, die durch den graduellen Übergang von DMSO zu Wasser erreicht wird, sollte sich auch auf die  $\delta(C)$ -Werte für C-4, aber nur zusammen mit denen für C-2 (**dN → dN''**), auswirken. Die Unterschiede  $\Delta\delta_{H_2O}^{DMSO}$  zwischen reinem DMSO und reinem Wasser betragen für C-4 und C-2 1.17 bzw. 1.16 im Analogon **3** und 0.25 bzw. 1.44 in **dC**. Der Unterschied, aufgrund einer Änderung der tautomeren Form, sollte mindestens  $\Delta\delta_{H_2O}^{DMSO} = 2$  betragen, wenn ein externer Standard verwendet wird<sup>[71]</sup>. Da die Form der  $\delta(C)$ -Kurven der C-2-Atome beider Verbindungen sehr ähnlich ist (Abb. 8), schließen wir, daß beim Analogon eine etwaige Verschiebung des Tautomerengleichgewichtes nicht beobachtet werden konnte. Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **3** in DMSO zeigt zwei Aminopro-

[\*] Im folgenden kennzeichnet ein Sternchen die ungewöhnliche tautomere Form am C-4-Substituenten des Pyri(mi)din- und am C-6-Substituenten des Purinnucleotides und ein Hochstrich die ungewöhnlichen tautomeren Formen am C-2-Substituenten des Pyri(mi)din- und Purinnucleotides.

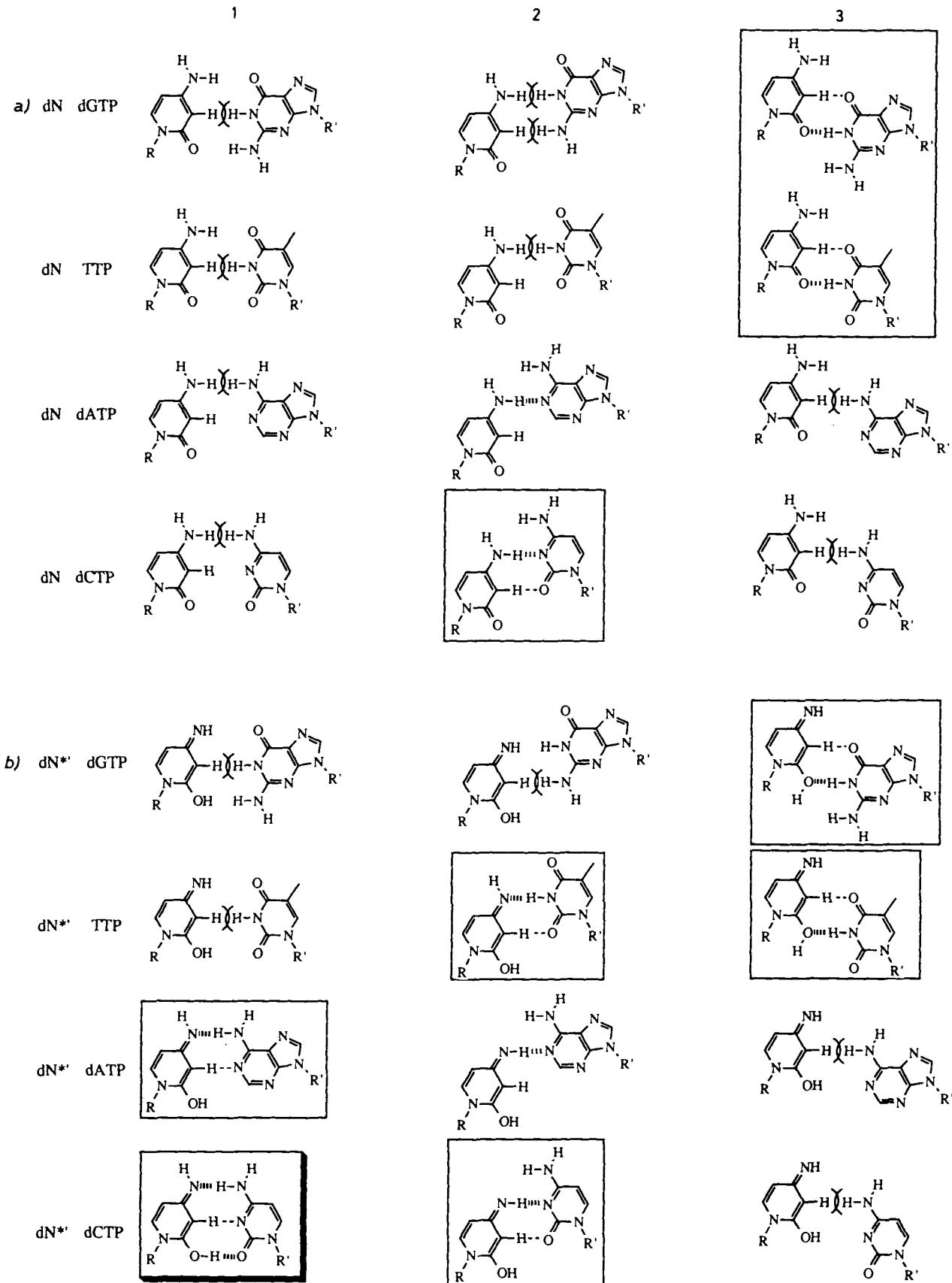


Abb. 6. Theoretisch mögliche Anordnungen von Basen in einer DNA-Polymerase zwischen a) dem Basen-Analogon 3 (dN), b) der tautomeren Form von 3 (dN\*) und den normalen tautomeren Formen der vier natürlichen Desoxyribonucleotide. Spalte 1: Watson-Crick-artige Anordnung; Spalte 2: Wobble-Anordnung, bei der das eintretende Nucleotid zur großen Furche der DNA-Doppelhelix verschoben ist; Spalte 3: wie zweite Spalte, aber mit Verschiebung zur kleinen Furche. R = DNA-Rückgrat; R' = 2'-Desoxy- $\beta$ -D-ribofuranosyl-5'-triphosphat. (III): H-Brücken zwischen Heteroatomen; (—): schwache anziehende Wechselwirkungen; sich überschneidende Klammern: sterische Hinderung (Abstoßung); einfache Umrahmung: mehr als eine, aber weniger als zwei H-Brücken pro Basenpaar; schattierte Umrahmung: zwei H-Brücken. Für dN\* wurde die Position von H-N<sup>4</sup> (syn oder anti) so gewählt, daß eine optimale Basenpaarung möglich wurde.

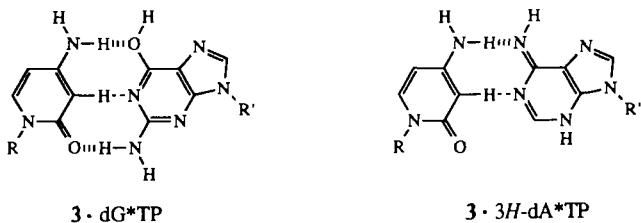


Abb. 7. Theoretisch mögliche Basenpaaranordnungen in einer DNA-Polymerase zwischen 3 (im Templat) und seltenen tautomeren Formen der Nucleosid-triphosphat dG\*TP und 3H-dA\*TP. R = DNA-Rückgrat; R' = 2'-Desoxy-β-D-ribofuranosyl-5'-triphosphat.

tonen. Somit muß in wäßriger Lösung die Amino-Keto-Form bevorzugt sein.

Ungeachtet ihrer Seltenheit ist die Imino-Enol-Form von 3 offensichtlich die einzige, die ein genügend festes Basenpaar mit einem Nucleosidtriphosphat bilden und eine Polymerisation durch das Enzym zulassen würde. Das H-Substitutionsmuster entspricht dem von Desoxyguanylat (Abb. 6b). Somit läßt sich der spezifische Einbau von Desoxycytidylat, der durch die Anwesenheit des Analogons 3 im Templat bedingt ist, erklären.

### 3.3.4. Ein Modellmechanismus für die Nucleotidbasenpaarung und die Polymerisation

Lassen sich diese Interpretationen mit den bekannten Mechanismen der Nucleotidpolymerisation und Replikationsgenauigkeit vereinbaren? Da das gegenwärtige Polymerisationsmodell hauptsächlich auf Versuchen mit pol I\* basiert, sollen einige neuere Ergebnisse erwähnt werden.

Benkovic et al.<sup>[72-74]</sup> untersuchten die Kinetik der DNA-Synthese durch pol I\*. Ihre Schlußfolgerungen sind in Schema 9 (vgl.<sup>[74]</sup>) zusammengefaßt. Zuerst wird das Enzym mit dem DNA-Templat und dem Primer beladen ( $K_1$ ). Es folgt eine primäre Komplexierung eines Nucleosidtriphosphates ( $K_2$ ). Den ersten geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bildet eine Konformationsänderung ( $E \rightarrow E'$ ) des Gesamtkomplexes ( $k_{\pm 3}$ ). In einem rascheren (höchstens teilweise geschwindigkeitsbestimmenden) Polymerisationsschritt wird die kovalente Bindung zwischen Primer und komplexiertem Mononucleotid gebildet ( $k_{\pm 4}$ ), wodurch ein verlängerter Primer und ein Pyrophosphatmolekül resultieren. Nach diesen Schritten ist die stärkste Diskriminierung richtig und falsch gepaarter Nucleotide erreicht (ca. 1:10<sup>4</sup> bis 1:10<sup>6</sup>). In diesem Stadium kann die korrigierende Aktivität von pol I\*

(Abb. 4) die neugeknüpfte Bindung spalten, so daß ein Nucleosid-5'-monophosphat entsteht ( $k_{\text{exo}}$ ). Eine weitere Konformationsänderung ( $k_{\pm 5}$ ) wurde vorgeschlagen, die eine zweite Diskriminierung richtig und falsch gepaarter Primer-Enden ermöglicht. Diese Konformationsänderung vermindert die Dissoziationsgeschwindigkeit von DNA, die eine Fehlpaarung enthält; somit kann die korrigierende Aktivität die meisten falsch gepaarten Nucleotide entfernen ( $k_{\text{exo}}$ ). Die Wegdiffusion von Pyrophosphat ( $K_6$ ) führt zu einem intermediären Komplex, der auf drei Arten weiterreagieren kann: Dekomplexierung des Templat-Primers ( $k_7$ ), was zu einer Unterbrechung der kontinuierlichen DNA-Synthese führt; Abspalten des letzten Nucleotids vom Primer ( $k_{\text{exo}}$ ); geschwindigkeitsbestimmende Translokation, die eine freie Bindungsstelle für ein Nucleosidtriphosphat regeneriert.

Man stellt sich vor, daß während der ersten Diskriminierung ( $k_{\pm 3}$ ) das korrekte Nucleosidtriphosphat eine rasche

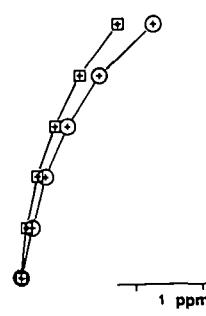
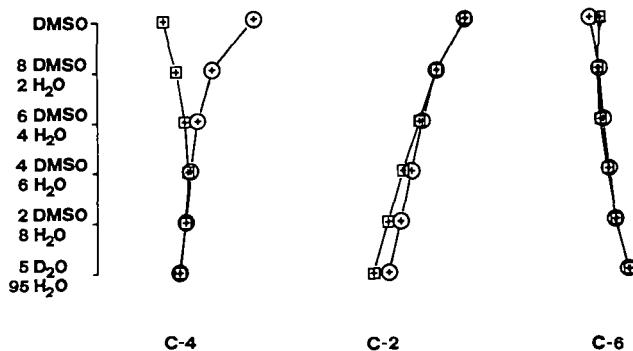
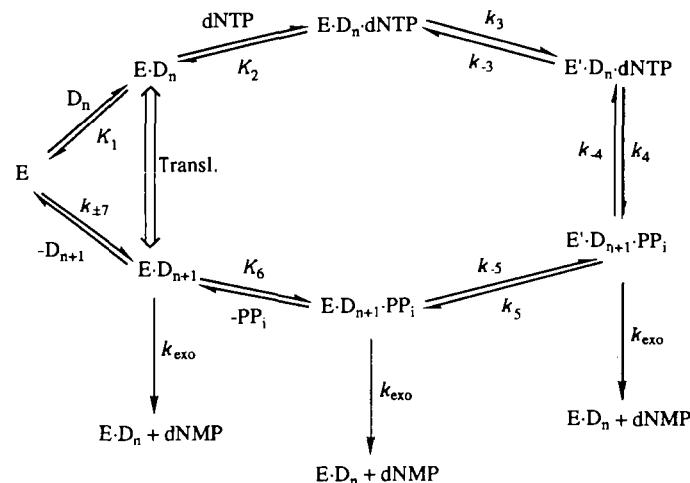


Abb. 8. Überlagerung von  $\delta(\text{C})$ -Kurven, die sich von  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von 2'-Desoxycytidin (Vierecke) und 3-Desaza-2'-desoxycytidin 3 (Kreise) ableiten, in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Lösungsmittels (aus Strazewski [70]). DMSO =  $[\text{D}_6]\text{Dimethylsulfoxid}$ .

Konformationsänderung von E nach E' bewirkt, während das Enzym mit dem unkorrekten Triphosphat genügend lange in seiner ursprünglichen Form E verweilt, um die Diffusion von dNTP zu ermöglichen. Die Polymerisationsgeschwindigkeit  $k_{\pm 4}$  hängt auch davon ab, ob ein richtiges oder ein falsches Nucleotid umgesetzt wird. Interessanterweise ist die korrigierende Aktivität nicht nur recht ineffizient im Ver-



Schema 9. Kinetisches Modell für die DNA-Synthese und das Korrekturlesen von *E. coli*-DNA-Polymerase I (vgl. Kuchta et al. [74]). E: Enzym; D<sub>n</sub>: Primer/Templat; PP<sub>i</sub>: Pyrophosphat; D<sub>n-1</sub>: verlängerter Primer/Templat.

fusion von dNTP zu ermöglichen. Die Polymerisationsgeschwindigkeit  $k_{\pm 4}$  hängt auch davon ab, ob ein richtiges oder ein falsches Nucleotid umgesetzt wird. Interessanterweise ist die korrigierende Aktivität nicht nur recht ineffizient im Ver-

gleich mit der Polymerase, sondern schneidet auch unselektiv Nucleosidmonophosphate heraus: Sowohl korrekte als auch fehlerhafte Nucleotide können unter günstigen Bedingungen herausgeschnitten werden. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn die Polymerisation oder die anschließenden Schritte wegen eines falsch gepaarten oder eines zuvor unerkannten falschen Basenpaars, das sich gerade hinter dem letzten Paar befindet, langsamer werden. Zur Zeit sind die genauen (sterischen) Gründe, die den Replikationsprozeß verlangsamen, noch unbekannt.

Steitz et al. führten Röntgenstrukturanalysen von pol I\* mit gebundenem TMP<sup>[75]</sup>, 5'-d(AGACCGCCGG)-3' · 5'-d(CGGGCCGG)-3' oder p(T)<sub>4</sub><sup>[76]</sup> durch. Diese Studien und weitere Strukturuntersuchungen durch Protein-Engineering<sup>[57]</sup> wiesen überraschenderweise darauf hin, daß das „Korrektur-Aktivzentrum“ des Enzyms etwa acht Basenpaare vom „Polymerisations-Aktivzentrum“ entfernt ist. Es wird vermutet, daß der Primerstrang im Enzym beim Korrekturlesen teilweise „geschmolzen“ vorliegt, d.h., die letzten vier Basen sind nicht gepaart (Abb. 9)<sup>[76]</sup>. Um zu erklä-

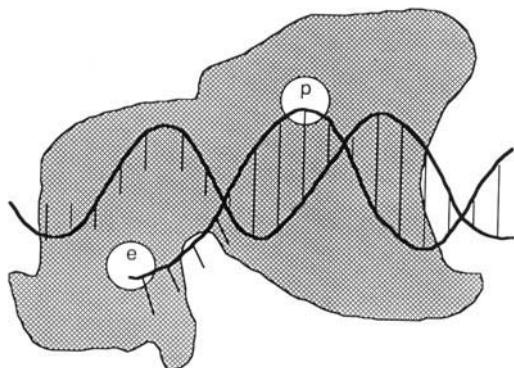
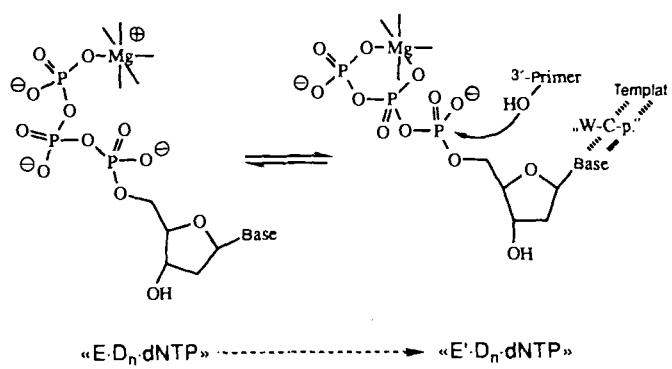


Abb. 9. Schematische Darstellung von pol I\*/DNA mit dem aktiven Zentrum der Polymerase (p) und 3'-Terminus der DNA, der an das aktive Zentrum (e) der Exonuclease gebunden ist (nach Freemont et al. [76]).

ren, wie fehlgepaarte Basen die Polymerisation verzögern und dadurch die Wanderung des Primerstranges zur Korrekturstelle ermöglichen, wurde ein Erkennungselement („reading head“) im aktiven Zentrum der Polymerase postuliert<sup>[58]</sup>. Zur Zeit ist diese Hypothese noch nicht experimentell gestützt, da es noch keine Röntgenstrukturanalyse gibt, die die Wechselwirkungen zwischen dem aktiven Zentrum der Polymerase, dem Templatstrang und einem Nucleosidtriphosphat zeigt.

Ferrin et al.<sup>[66, 77, 78]</sup> untersuchten die Wechselwirkungen von pol I\* mit Nucleosidtriphosphaten und Oligoribonucleotiden als Templayten (Ribonucleotiden, um einen enzymatischen Abbau zu verhindern) durch NMR-Spektroskopie (kernmagnetische Relaxation von enzymgebundenen Mangan-Ionen (statt der „richtigen“ Magnesium-Ionen) und Protonen-Kern-Overhauser-Effekt). Ein entscheidendes Ergebnis war eine vorläufige Interpretation der strukturellen Bedingungen für den ersten dNTP-bindenden und den ersten diskriminierenden Schritt ( $K_2$  bzw.  $k_{\pm 3}$  in Schema 9). Ferrin et al.<sup>[66]</sup> schlugen vor, daß das Nucleosidtriphosphat in einem ersten Schritt an das Enzym bindet und dann nur über seine terminale  $\gamma$ -Phosphorylgruppe mit dem enzymgebundenen Magnesium-Ion in Wechselwirkung treten sollte (Schema 10). Obwohl die Triphosphatbasen zusammen mit



«E·D<sub>n</sub>·dNTP» → «E'·D<sub>n</sub>·dNTP»

Schema 10. Vorschlag für die Wechselwirkung zwischen  $Mg^{2+}$  (an dem Primer-Templat-pol-I\*-Komplex gebunden) und dNTP vor dem Polymerisationsschritt (nach Ferrin et al. [77] und Ferrin und Mildvan [66]). „W-C-p.“ bedeutet Bildung eines Watson-Crick-Paares.

dem Primer und dem Templat eine B-DNA-Konformation annehmen, ist diese primäre Bindung gegenüber den vier Nucleotidbasen nicht besonders selektiv; außerdem ist sie reversibel (entspricht  $K_2$  im Schema 9). Während des geschwindigkeitsbestimmenden Schrittes („verification step“), bei dem zuvor eine Konformationsänderung angenommen wurde<sup>[72]</sup>, kann die  $\beta$ -Phosphorylgruppe des Substrates nur dann das enzymgebundene Magnesium-Ion komplexieren ( $k_{\pm 3}$ ), wenn zwischen Substratbase und Templatbase ein Watson-Crick-, nicht aber ein Wobble-Paar gebildet wird. Die Entstehung eines sechsgliedrigen Chelatringes (-Mg<sup>2+</sup>-O- $\gamma$ P-O- $\beta$ P-O-) verringert die Distanz zwischen der  $\alpha$ -Phosphoryl- und der eintretenden 3'-OH-Gruppe des Primerstranges und beschleunigt zusätzlich die Abspaltung der Pyrophosphatgruppe. Es folgt dann die Substitutionsreaktion ( $k_{\pm 4}$ ).

Dieser spekulativer Modellmechanismus vermag unsere Replikationsexperimente mit den Analoga 41–43 und dem Templat III recht gut zu erklären; er erweist sich als brauchbare Arbeitshypothese. Die Triphosphate 41–43 werden nicht eingebaut, weil  $k_{\pm 3}$  im Vergleich mit der Rückreaktion von E·D<sub>n</sub>·dNTP viel zu langsam ist; dies ist auf die fehlenden H-Brücken und die durch die Pyridon-Analoga (Abb. 3) verursachten abstoßenden Wechselwirkungen zurückzuführen, die eine Bildung von E'·D<sub>n</sub>·dNTP verhindern. Günstigere protonierte oder tautomere Formen konnten nicht verwendet werden, da sie zu selten sind, um mit den natürlichen Substraten zu konkurrieren.

Diese seltene Form könnte jedoch dazu dienen, die Replikation des gesamten Templat III durch einen „Engpaß“ zu erreichen. Die einzige Möglichkeit, um das Analogon 3 im Templat zu umgehen, bestand darin, seine seltene tautomere Form zur Bindung der Nucleosidtriphosphat-Base zu gebrauchen, d.h. als eigentliches Templat. In unseren Replikationsexperimenten wurden weder Polymerisationsgeschwindigkeiten noch Umsätze von Nucleosidtri- zu -monophosphaten bestimmt. Somit können wir keine genauen Informationen über die Kinetik z.B. des Einbaus und des Korrekturlesens von Desoxycytidin in einer Position gegenüber dem Analogon 3 im Templat geben. Da diese Reaktion jedoch innerhalb der gleichen Zeitspanne, wie sie bei der Replikation natürlicher Strände beobachtet wird (vgl. Abschnitt 3.2.2), vollständig ablief, ist es sinnvoll für das Pyridin-Pyrimidin-Paar während der Polymerisation eine Watson-Crick-ähnliche Anordnung anzunehmen.

### 3.3.5. Die berechnete Struktur eines Pyridin-Pyrimidin-Paars in enzymfreier DNA

Grundsätzliche Betrachtungen<sup>[79]</sup> und neueste kristallographische Ergebnisse<sup>[80]</sup> legen nahe, daß eine in freien Nucleosiden seltene tautomere Form durch Basenpaarung und Basenstapelung stabilisiert werden kann.

Deshalb wurde in Zusammenarbeit mit K. Müller (F. Hoffmann-La Roche AG, Basel) eine orientierende Computer-Modeling-Studie an einem Pyridin-Pyrimidin-Paar aus dem Analogon 3 in seiner seltenen tautomeren Form und Desoxycytidylat durchgeführt. Das dN\* · dC-Paar wurde in die Mitte einer pentameren, doppelsträngigen B-DNA plaziert. Dieses DNA-Fragment, das eine ähnliche Sequenz wie das Templat III enthält, ergab bei einem Relaxationsprozeß (unter Verwendung eines ladungsfreien, mit geometrischen Zwängen versehenen Kraftfelds) eine erweiterte Form der Basenpaaranordnung aus Abbildung 6b, unten links. Diese Form enthält ein fest über H-Brücken gebundenes Wassermolekül in der kleinen Furche zwischen den beiden O-Atomen der Basen<sup>[69]</sup>. Obwohl diese Analyse nicht das Ergebnis einer systematischen Studie verschiedener Konformationsminima ist, sondern das Auffinden eines idealen Minimums darstellt, zeigt das zur Diskussion stehende Basenpaar doch eine erstaunliche Ähnlichkeit mit einem

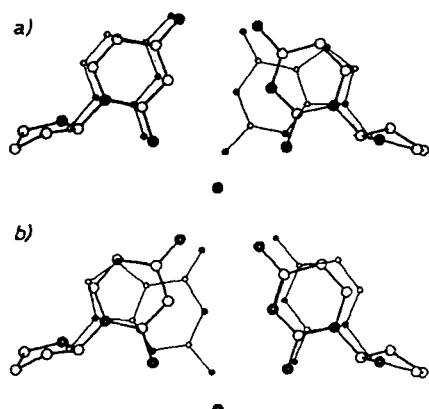


Abb. 10. Strukturvergleich zwischen einem modellierten und einem Standard-Watson-Crick-Basenpaar. Größere Kreise: Teilanansicht des 3-Desaza-2'-desoxycytidylat-2'-Desoxycytidylat-Paars (dN\* · dC) aus dem relaxierten, modellierten B-DNA-Pentamer [5'-d(pTpTpNpGpC)-3'] · [5'-pGpCpApA]-3' (pdN = 3-Desaza-2'-desoxycytidylat) mit einem eingeschobenen (mitrelaxierten) Wassermolekül in der kleinen Furche (der einzelne Kreis symbolisiert das O-Atom von H<sub>2</sub>O). Kleinere Kreise: a) dC · dG-Paar, b) dG · dC-Paar aus einer Standard-B-DNA [69], jeweils dem obengenannten Basenpaar überlagert gezeichnet.

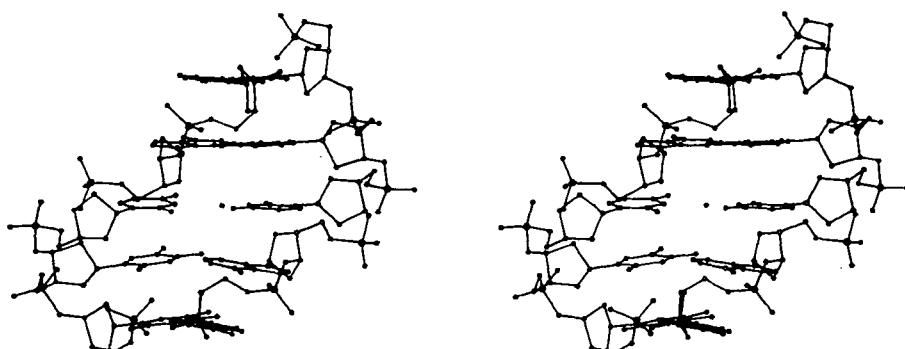


Abb. 11. Stereodarstellung des relaxierten Pentamers (vgl. Abb. 10), das ein Wassermolekül (Punkt) enthält; Blick in die kleine Furche.

normalen Watson-Crick-Paar (Abb. 10). Das relaxierte Fragment glich qualitativ immer noch einer normalen B-DNA, was darauf hinzweist, daß sich Pyri(mi)din-Pyrimidin-Paare in eine DNA-Doppelhelix einpassen lassen, ohne die Sekundärstruktur wesentlich zu beeinflussen (Abb. 11).

Es gibt mehrere Möglichkeiten für die Anordnung des Pyridin-Pyrimidin-Paars. Es könnte in Lösung in der seltenen tautomeren Form verbleiben, in der bevorzugten tautomeren Form ein Wobble-Paar bilden oder aber im Gleichgewicht zwischen beiden Anordnungen vorliegen. Eine kombinierte spektroskopische und kristallographische Untersuchung eines DNA-Doppelstranges mit Pyri(mi)-din-Pyrimidinpaaren ist in Arbeit (vgl. Abschnitt 2.2.1 und Schema 7).

Die Replikationsexperimente mit dem Templat III und die Modeling-Studien legen nahe, daß die Basenpaartrennung (Abstand C-1'–C-1') im aktiven Zentrum der Polymerase für den Nucleotideinbau nicht sehr eng eingeschränkt wird, wogegen in einer freien DNA-Doppelhelix das Zucker-Phosphat-Rückgrat und die Hydrathülle den fehlgepaarten Basen einen nahezu normalen Abstand aufzwingen. Der entscheidende Parameter, der die Einbauselektivität und somit die korrekte Replikation gewährleistet, scheint das H-Substitutionsmuster der Templatnucleotidbasen zu sein, das vom eintretenden Nucleosidtriphosphat auf bestimmte Art abgelesen wird. Die Lage des Leserahmens ist an eine Watson-Crick-ähnliche Anordnung der Basen gebunden (Abb. 2a, b und d). Eine Verschiebung dieser Lage in eine Wobble-Anordnung (Abb. 2c) muß durch das umgebende Enzym verhindert werden.

### 3.3.6. Mögliche medizinische Anwendungen

Wie steht es mit der praktischen Anwendung von Nucleosid- und Nucleotid-Analoga? Aufgrund der potentiellen Mutagenität von Nucleosid-Analoga<sup>[81]</sup> ist ihr Einsatz gegen Virusinfektionen möglich. Am bekanntesten ist derzeit das gegen Retroviren wirksame 3'-Azido-3'-desoxythymidin (AZT, aktiv gegen AIDS-Virus-HIV). Zahlreiche ähnliche Analoga wurden hergestellt, von denen 2',3'-Didesoxy-, 3'-Azido-3'-desoxy- und 3'-Desoxy-3'-fluor-Derivate die interessantesten Eigenschaften zeigten<sup>[82,83]</sup>. Es wird angenommen, daß diese Verbindungen *in vivo* schrittweise triphosphoryliert und von der retroviroalen RNA-abhängigen DNA-Polymerase, die reverse Transkriptase genannt wird, in die DNA eingebaut werden. Zudem ist bekannt, daß diese

und andere DNA-Polymerasen mit wesentlich geringerer Genauigkeit<sup>[84]</sup> als beispielsweise die bakteriellen Polymerasen wie pol I replizieren. Deshalb werden sie von Biochemikern auch als mutationsauslösende Agentien eingesetzt.

Diese größere Toleranz gegenüber modifizierten Nucleotiden könnte es dem Enzym ermöglichen, auch Nucleotidbasen-Analoga einzubauen, obwohl dies bei 3-Desazapyrimidinribo- und -desoxyribonucleosiden (vgl. Abschnitt 3.2.2) und nicht-viralen Polymerasen nicht der Fall war. Wir hoffen, daß es durch Kombination von modifizierten Basen und modifizierten Zuckern möglich sein wird, zu antiretroviral aktiven Verbindungen zu gelangen. Die erste Modifikation würde eine fehlerhafte Basenpaarung und somit eine Substitutionsmutation bewirken, während die zweite aufgrund der fehlenden nucleophilen Gruppe in 3'-Position einen Abbruch der Polymerisation zur Folge hätte. Letztendlich könnte man sich auch eine synergistische Wirkung mit AZT vorstellen, was eine niedrigere Dosierung des problematischen Anti-AIDS-Mittels erlauben würde. Deshalb dürfte es interessant sein, die dC- und T-Analoga 48–53 auf ihre Toxizität und antivirale Aktivität hin zu prüfen (Abb. 12).

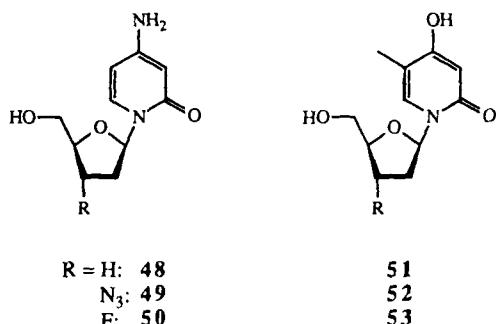


Abb. 12. 3-Desaza-Analoga von 2',3'-Didesoxycytidin **48**, 3'-Azido-2',3'-didesoxycytidin **49**, 3'-Fluor-2',3'-didesoxycytidin **50**, 3'-Desoxythymidin **51**, 3'-Azido-3'-desoxythymidin **52** und 3'-Fluor-3'-desoxythymidin **53**.

### **3.3.7. Nucleotid-Analoga, die ionisierte und seltene tautomere Formen natürlicher Nucleotidbasen nachahmen**

Die andere, indirekte Verwendung von Nucleotidbasen-Analoga basiert auf deren Fähigkeit, ein ungewöhnliches H-Substitutionsmuster anzunehmen, falls sie als modifizierte Templatnucleotide in Replikationsexperimenten verwendet werden. Beispiele natürlicher und synthetischer Varianten von Nucleosidbasen sind in Abbildung 13 gezeigt.

Bisher wurden nur einige wenige dieser Analoga verwendet, um den fehlerhaften Einbau durch Polymerasen zu untersuchen; dabei entstanden mehrere ungewöhnliche Basenpaare.  $N^4$ -Hydroxydesoxycytidylat ist ein (C·G → T·A und A·T → G·C)-Transitions-Mutagen (Purin-Purin- und Pyrimidin-Pyrimidin-Austausche bezeichnet man als Transitionen). Es weist eine stabilere Iminosform als Desoxy-cytidylat auf und bildet bevorzugt ein Basenpaar mit Desoxyadenylat. Sein H-Substitutionsmuster entspricht dem des seltenen Tautomers dC\*; deshalb sollte  $N^4$ -Hydroxydesoxycytidylat das Bindungsverhalten von dC\* nachahmen (Abb. 14 a). 5-Brom- und 5-Fluoruracil sind ebenso Transition-Mutagene. Die Gründe für die gelegentliche Bildung fehlerhafter Basenpaare mit Desoxyguanylät liegen in der erhöhten Acidität, die Watson-Crick-artige  ${}^{Br}U^{\ominus}$  · G- und

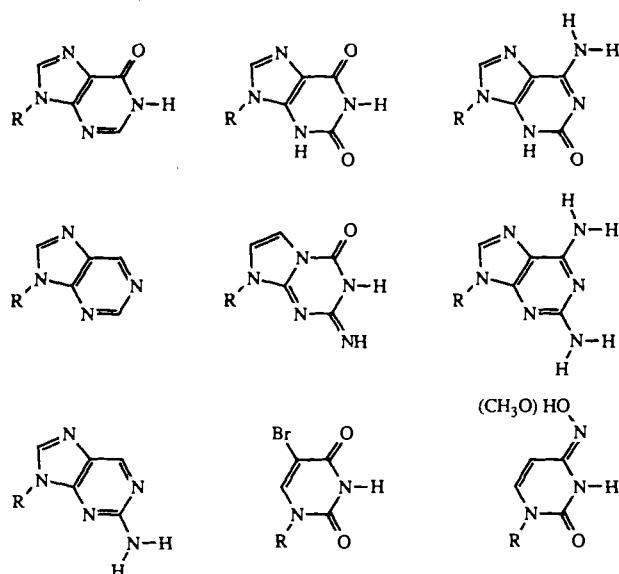


Abb. 13. Einige natürliche und synthetische Nucleosidbasen-Analoga, von links nach rechts: 2'-Desoxyinosin, -xanthosin, -isoguanosin, -nebularin, -5-aza-7-desazaguanosin, -ribosyl-2,6-diaminopurin, -ribosyl-2-aminopurin, -5-bromuridin, -N<sup>4</sup>-methoxy- und -N<sup>4</sup>-hydroxycytidin. R = 1'-(2-Desoxy-β-D-ribofuranosyl).

$\text{FU}^\ominus$  · G-Basenpaare bei physiologischen pH-Werten ermöglicht<sup>[85]</sup>. Deshalb ahmen diese Verbindungen auch das Bindungsverhalten von deprotoniertem Thymidylat nach (Abb. 14 b).

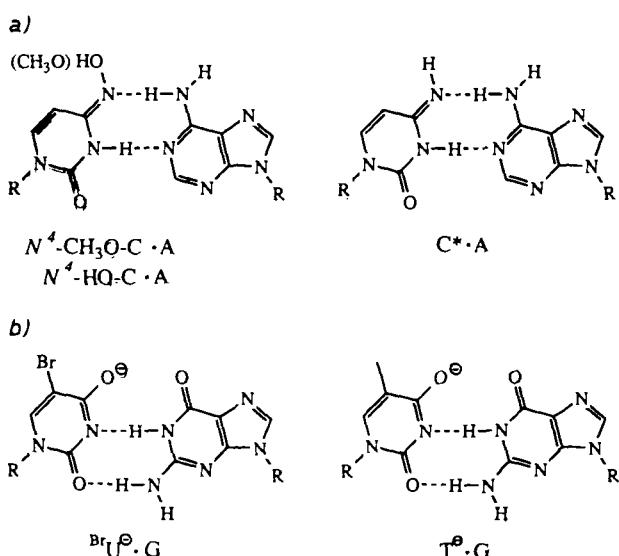


Abb. 14. Nachahmung a) einer seltenen tautomeren Form von Desoxycytidin, dC\*, durch  $N^4$ -Methoxy- oder  $N^4$ -Hydroxycytidin, b) einer deprotonierten Form von Thymidin durch 5-Bromdesoxyuridin in Watson-Crick-artigen Basenpaaren

2-Aminopurin (AP) führt normalerweise als Templat-Analogon zum Einbau von Thymidylat, bildet aber auch recht oft ein Basenpaar mit Desoxycytidylat, was A · T → G · C-Transitionen bewirkt<sup>[86]</sup>. Die bevorzugte Bildung eines Watson-Crick-ähnlichen [AP · C]<sup>®</sup>-Fehlbasenpaares in der Polymerase ist für die Mutagenität von AP maßgeblich (Abb. 15a)<sup>[87]</sup>. AP-bedingte A · T → T · A-Transversio-

nen (Purin-Pyrimidin-Austausche bezeichnet man als Transversionen) weisen auf die Bildung von AP·A-Paaren (Wobble-Paar, Abb. 15b) in der Polymerase hin. A·T → T·A-Transversionen erwiesen sich als um mindestens eine

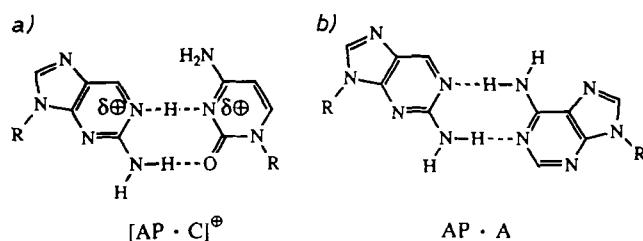


Abb. 15. a) Protoniertes Watson-Crick-artiges Basenpaar zwischen Desoxyribosyl-2-aminopurin und Desoxycytidin; b) neutrales Wobble-Paar zwischen Desoxyribosyl-2-aminopurin und Desoxyadenosin.

Größenordnung seltener als A·T → G·C-Transitionen<sup>[88]</sup>. Eritja et al.<sup>[89]</sup> konnten jedoch zeigen, daß doppelsträngige DNA mit einem  $[\text{AP} \cdot \text{C}]^\oplus$ -Paar thermodynamisch weniger stabil als eine solche mit einem AP·A-Wobble-Paar ist. Daraufhin wurde erstmals vorgeschlagen, daß Wobble-Paare aus sterischen Gründen in Polymerasen ungünstig sein sollten, so daß an ihrer Stelle ein weniger stabiles Basenpaar eingebaut würde. Ähnliche Replikationsexperimente mit Desoxyxanthosin (Abb. 13) als Templatbase zeigten einen noch größeren Unterschied zwischen dem bevorzugten Einbau durch die eukaryotische DNA-Polymerase und der gemessenen thermodynamischen Stabilität von doppelsträngiger DNA, die Desoxyxanthosin enthält<sup>[90]</sup>: Der von Desoxyxanthosin (X) dirigierte bevorzugte Einbau von T > C ≈ A ≈ G entspricht nicht der Stabilitätsreihe X·T > X·G > X·A ≈ X·C. Dieses Ergebnis lieferte einen klaren Hinweis auf die Möglichkeit, daß die Polymerase die Substrat-Templat-Wechselwirkungen beeinflußt, was schließlich zur schnelleren Bildung von instabileren Falschpaaren in der fertigen DNA führen kann.

Natürlich vorkommendes  $O^6$ -Methyldesoxyguanylat (d( $O^6$ -meG)) und  $O^4$ -Methylthymidylat ( $O^4$ -meT), die durch selektive O-Methylierung mit einem methylierenden Mutagen entstehen, erwiesen sich als hochmutagene DNA-Bausteine. Während der Replikation bewirken sie wegen ihres veränderten H-Substitutionsmusters vorzugsweise einen fehlerhaften Einbau von Thymidylat bzw. Desoxyguanylat.  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Untersuchungen von DNA-Fragmenten mit  $O^6$ -meG·C-,  $O^4$ -meT·A-,  $O^6$ -meG·T- und  $O^4$ -meT·G-Paaren zeigen, daß die nicht-mutagenen  $O^6$ -meG·C- und  $O^4$ -meT·A-Paare relativ stabile Wobble-Paare sind (wahrscheinlich ist  $O^4$ -meT·A protoniert), während die mutagenen  $O^6$ -meG·T- und  $O^4$ -meT·G-Paare Watson-Crick-ähnliche Anordnungen von anscheinend geringerer thermodynamischer Stabilität bilden (Abb. 16)<sup>[91]</sup>. Außerdem zeigten  $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektren von d( $O^6$ -meG)-enthaltenen Verbindungen, daß das  $O^6$ -meG·C-Paar eine wesentlich größere Verformung des Zucker-Phosphat-Rückgrates bewirkte als das  $O^6$ -meG·T-Paar, und zwar besonders beim der alkylierten Base gegenüberliegenden Strang<sup>[92]</sup>. Einmal mehr konnte daraus geschlossen werden, daß eine Wobble-Anordnung in der Polymerase für die Polymerisation ungünstig ist.

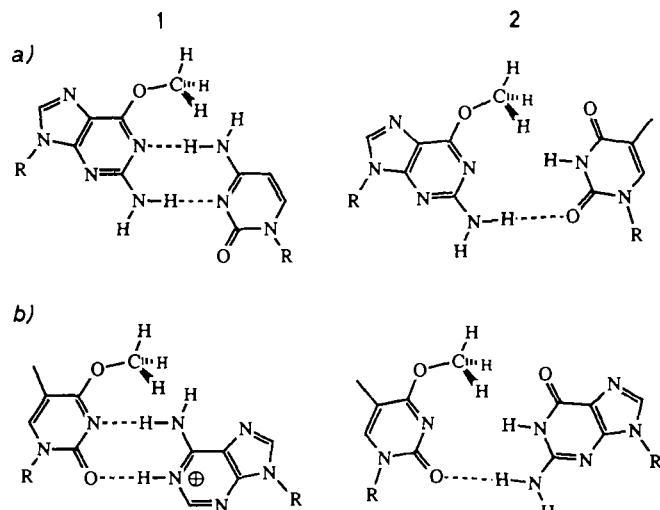


Abb. 16. Aus  $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Studien abgeleitete Strukturen von Basenpaaren zwischen a)  $O^6$ -Methyldesoxyguanosin und Desoxycytidin (links) sowie Thymidin (rechts), b)  $O^4$ -Methylthymidin und Desoxyadenosin (links) sowie Desoxyguanosin (rechts) in B-DNA (nach Li et al. [91]). Die Basenpaare in Spalte 1 sind nicht-mutagene Wobble-Paare, in Spalte 2 mutagene Watson-Crick-ähnliche Paare.

Diese Betrachtung wird stark durch unsere Experimente mit dem Templat III gestützt, bei denen ein Pyridin-Pyrimidin-Paar entstand, das als eher instabil angesehen wird<sup>[93]</sup>. Zudem konnte bei der Bildung eines Pyridin-Pyrimidin-Basenpaars (und nicht eines Pyridin-Purin-Paares, vgl. Abb. 6b) eine Selektivität von 100 % beobachtet werden. Dies zeigt, daß die Bildung eines „kurzen“ Basenpaars, die wegen seiner Instabilität als unwahrscheinlich angesehen wird, stark begünstigt sein kann und unterstreicht, daß die Stabilität von Basenpaaren in einer Polymerase und in der freien DNA verschieden sein muß.

Außerdem legt das Experiment nahe, daß das Basen-Analogon 3 ähnliche Paarungseigenschaften wie ein anderes seltenes Desoxycytidylat-Tautomer, dC\*, aufweist, indem es dessen H-Substitutionsmuster nachahmt. Die Analogie mit dem H-Substitutionsmuster von Verbindung 3 gilt allerdings nicht uneingeschränkt. Das eigentliche Tautomer dC\* hat kein H-Atom in 3-Position, so daß prinzipiell die Watson-Crick-ähnliche Basenpaarung mit einem Iminoproton eines Nucleotids möglich wäre. Nebst der nicht-mutagenen Bindung von Desoxyguanylat besteht immer noch die Möglichkeit, daß dC\* auch den Einbau von Thymidylat dirigieren könnte – eine Erklärung für die beobachtete Bildung von C·T-Paaren in vitro.

## 4. Bildung und Struktur von Fehlpaaren in DNA

### 4.1. Vorausgesagte und nachgewiesene Strukturen von Fehlpaaren

#### 4.1.1. Tautomere Fehlpaare

Unter den zahlreichen Strukturvorschlägen für Fehlpaare, die für die Bildung von Substitutionsmutationen maßgeblich sind, waren die tautomeren Transitions-Fehlpaare A\*·C, A·C\*, G\*·T und G·T\* nach Watson und Crick<sup>[94]</sup> die ersten und bekanntesten, die genau zu den Regeln ihrer Entdecker

paßten. Wegen der vermuteten Kurzlebigkeit dieser seltenen Tautomere in DNA-Basenpaaren ließen sich aber nur indirekte Verfahren zum Nachweis ihrer Existenz heranziehen.

23 Jahre später gelang es *Topal* und *Fresco*<sup>[95]</sup>, diese Strukturvorschläge durch Vergleich der Häufigkeit von Transitions-Mutationen *in vivo* mit dem Tautomerengleichgewicht freier Nucleoside zu erhärten. Zudem vermuteten sie, daß sich Transversionen aufgrund der Bildung von tautomeren Purin-Purin-Paaren befriedigend erklären ließen. Es wurde angenommen, daß diese Fehlpaare die Struktur von Hoogsteen-Paaren haben. Da das Auftreten von zwei Anomalien in derselben Base als unwahrscheinlich angesehen wurde, müßte die eine Purinbase als seltenes Tautomer und die andere als *syn*-Konformer vorliegen. Im gemischten G·A-Paar würde entweder G\*(*anti*) mit A(*syn*) oder A\*(*anti*) mit G(*syn*) ein Basenpaar bilden. Es sei betont, daß die Autoren das unveränderte und ebenfalls „komplementäre“ G(*anti*)·A(*anti*)- oder G(*anti*)·A(*syn*)-Paar ohne selte tautomere Form nicht in Erwägung zogen, wahrscheinlich weil sie die Tautomerisierung als wichtigen Grund für die Bildung von Fehlpaaren ansahen.

Nach Ansicht der Autoren<sup>[95]</sup> könnten in der Polymerase seltene Tautomere sowohl in den Templat-Nucleotidbasen als auch in Nucleosidtriphosphaten vorkommen; bei den *syn*-Konformeren wären sie aus sterischen Gründen nur an der Triphosphatbindungsstelle möglich. Der Vergleich der Transversionshäufigkeit *in vivo* mit dem Tautomeren- und *syn-anti*-Gleichgewicht von Purinnucleosiden zeigte die Folgerichtigkeit dieser Überlegungen. Es wurde vermutet, daß Pyrimidin-Pyrimidin-Paare innerhalb der Doppelhelix keine Basenpaare bilden können. Daraus entstand das erste Modell, das „Pathways for Substitution Mutations“ genannt wurde<sup>[95]</sup>.

Dank dieser wegweisenden Arbeit konnten zum erstenmal *durchschnittliche* Mutationshäufigkeiten anhand einfacher thermodynamischer Parameter (Gleichgewichtskonstanten für spontane Tautomerisierung und *syn-anti*-Rotation) erklärt werden, ohne auf Kräfte, die die Tautomerisierung induzieren, zurückgreifen zu müssen. Leider beachtete man in der Folge bei den *in-vitro*-Mutagenitätsexperimenten die Möglichkeit der Bildung von Pyrimidin-Pyrimidin-Paaren kaum.

Später zeigten genaue Messungen des Tautomerengleichgewichtes von freien Basen und Nucleosiden, daß die Mutationshäufigkeit praktisch nie von diesen thermodynamischen Parametern abhängt (siehe z. B.<sup>[68, 79]</sup>). Darüber hinaus wurde klar, daß die *durchschnittliche* Mutationshäufigkeit keinesfalls das Verhalten der replizierenden DNA wiedergab. Es kamen immer mehr Ergebnisse zusammen, die erkennen ließen, daß die Wahrscheinlichkeit einer spezifischen Substitutionsmutation stark von den relativen Konzentrationen der Nucleosidtriphosphate<sup>[96]</sup>, von der Templatsequenz<sup>[97–100]</sup> und von der Polymerase<sup>[101–103]</sup> abhängt. Die Ursachen dieser Unterschiede geben ebenso wie die Faktoren, die die Fehlererkennung in der Polymerase ermöglichen (siehe Abschnitt 3.3.4), noch immer Anlaß zu Diskussionen (vgl.<sup>[74, 104, 105]</sup>), bei denen von seltenen Tautomeren aber kaum die Rede ist. So bezweifeln manche Forscher inzwischen, daß seltene tautomere Formen – die Meinung ist, sie würden u.a. in Nucleosidtriphosphaten vorkommen – eine Hauptrolle bei der Mutagenese spielen.

Das Vorkommen von Pyrimidin-Pyrimidin-Paaren konnte man allerdings nicht mehr ableugnen, da kürzlich die *in-vitro*-Replikation eines natürlichen Templat durch das Polymerase- $\alpha$ -Holoenzym die Existenz von C·T- und T·T-Paaren bestätigte<sup>[105, 106]</sup>. In der Tat haben sich Biologen, die *in-vivo*-Mutagenitätsexperimente durchführten, anscheinend nie um die vorgeschlagene Unfähigkeit der Polymerase, Pyrimidin-Pyrimidin-Paare zu synthetisieren, gekümmert.

Deshalb müssen die „Pathways for Substitution Mutations“ modernisiert werden. Offensichtlich sind an der Mutagenese alle möglichen Fehlpaarungen beteiligt. Um ihre (häufige) Entstehung zu erklären, sollte man nach unserer Ansicht erneut in Betracht ziehen, daß sich seltene Tautomere nicht in den Nucleosidtriphosphaten, sondern in den Templatbasen bilden. Die größten Widerstände gegen die Anerkennung der wichtigen Rolle, die die seltenen tautomeren Formen bei der Mutagenese spielen, sind aber noch zu nennen.

#### 4.1.2. Wobble-Paare

Die rasche Entwicklung nützlicher synthetischer und analytischer Verfahren in der Chemie, insbesondere die automatisierte Synthese von Oligodesoxynucleotiden im 10- $\mu$ mol-Maßstab, die moderne Umkehrphasen-HPLC und die 2D- $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie, haben Untersuchungen kurzkettiger DNA-Oligomere mit definierter Länge und Sequenz angeregt. Die Analyse doppelsträngiger DNA durch Circulardichroismus,  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie und Einkristall-Röntgenstrukturanalyse sind die geeignetsten Methoden, um die Struktur einer bestimmten Sequenz zu ermitteln. Von besonderem Interesse sind Sequenzen, die ein oder zwei Fehlpaare enthalten.

Wie bei der *in-vitro*-Mutagenese gehören die nicht-komplementären Purin-Pyrimidin- und Purin-Purin-Basenpaare zu den am besten analysierten Strukturen. Oligomere, die ein G·T-Paar enthielten, wurden als A-, B- und Z-DNA, als „dehydratisierte“ rechtshändige Form, normale rechts-händige Form und linkshändige Form kristallisiert. Ungeachtet der Gesamtkonformation der Doppelhelix bilden die Basen ein Wobble-Paar (Abb. 17 a)<sup>[107–109]</sup>. Das A·C-Paar, das sich auch in einem B-DNA-Oligomer kristallisierte ließ, zeigte eine sehr ähnliche Geometrie wie das G·T-Paar, ist jedoch sehr wahrscheinlich an N-1 des Adenins protoniert (Abb. 17 b)<sup>[110–113]</sup>. Beide Fehlpaare verursachten im Vergleich zum vollständig komplementären Oligomer nur eine geringfügige Störung im DNA-Rückgrat.

Im Falle der Purin-Purin-Paare wurde nur das G·A-Paar kristallographisch charakterisiert. Es kann je nach der Nachbarsequenz in mehreren isomeren Formen vorkommen.

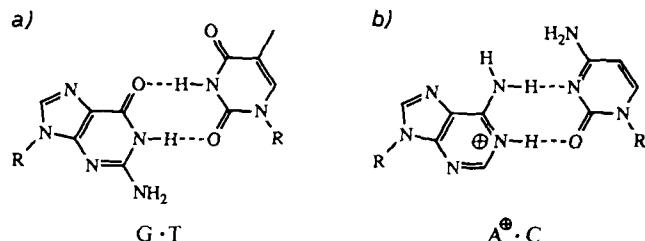


Abb. 17. a) G·T-Wobble-Paar, b) A<sup>⊕</sup>·C-Wobble-Paar, anhand der Röntgenstrukturdaten schematisch dargestellt.

Zuerst fand man ein Hoogsteen-Paar, das eine sehr geringe Störung im DNA-Rückgrat bewirkte (Abb. 18 a)<sup>[114]</sup>. Ein anderes ist ein Watson-Crick-ähnliches *anti-anti*-Paar, das etwas aufgeweitet ist (Abb. 18 b)<sup>[115]</sup>. Die Strukturen dieser Fehlpaare sind in Einklang mit den bekannten <sup>1</sup>H-NMR-Daten<sup>[116-122]</sup>. Gao und Patel<sup>[123]</sup> vermuteten aufgrund einer kürzlich durchgeführten NMR-Untersuchung, daß das G·A-Paar je nach pH-Wert auch in einer dritten protonierten Form angeordnet sein kann, nämlich als Hoogsteen-Paar mit G als *syn*-Konformer (Abb. 18 c). Erst kürzlich konnte dies anhand der Röntgenstrukturanalyse von G(*syn*)·A<sup>⊕</sup> bestätigt werden<sup>[124]</sup>.

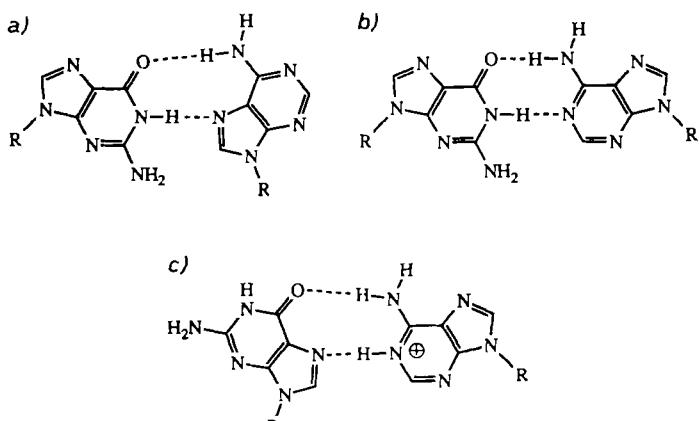


Abb. 18. a) G·A(*syn*)-, b) G·A-, c) G(*syn*)·A<sup>⊕</sup>-Paar, anhand der Röntgenstrukturdaten schematisch dargestellt.

Arbeiten von Gao und Patel<sup>[123]</sup> sowie Studien über die Bindung von (Reparatur-)Proteinen an Transitions-Fehlpaare<sup>[125]</sup> zeigten eine hohe Sequenz- und pH-Abhängigkeit der G·T- und insbesondere A·C-Paare; dies deutet darauf hin, daß die Strukturen von Fehlpaaren recht flexibel und stark von ihrer nächsten Umgebung abhängig sind.

Leider gibt es noch keine kristallographischen Daten über doppelsträngige DNA, die ein Pyrimidin-Pyrimidin-Paar aufweist. Aufgrund des <sup>1</sup>H-NMR-Spektrums eines C·T-enthaltenden Oligomers wurde für dieses Paar eine aufgeweitete Watson-Crick-artige Anordnung mit einem Wassermolekül in der kleinen Furche ähnlich wie in unserem berechneten Pyridin-Pyrimidin-Paar vorgeschlagen (vgl. Abb. 10)<sup>[121]</sup>. <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von Oligomeren mit T·T- oder C·C-Paaren weisen auf eine Wobble-Anordnung des T·T-Paares hin. Wenn auch weniger sicher, läßt die starke pH-Abhängigkeit der Struktur des C·C-Paares auf ein protoniertes Wobble-Paar oder eine seiner Varianten schließen<sup>[126]</sup>. Wiederum erwartet man eine große Flexibilität dieser Fehlpaare, da ihre thermodynamische Stabilität zu der niedrigsten aller Basenpaare gehört.

In jedem Fall scheint keines der fehlerhaften Basenpaare ein seltenes Tautomer zu enthalten.

## 4.2. Schlußfolgerungen

### 4.2.1. Der Konflikt zwischen Wobble- und Tautomerenpaar

Die kristallographischen Befunde veranlaßten zahlreiche Forscher, sich definitiv von der Vorstellung einer Beteiligung

seltener tautomerer Formen an der Mutagenese zu distanzieren. Man ist der Meinung, daß die Bildung von Wobble-Paaren zumindest für die Transitionsmutationen maßgeblich sei. Die Bildung von Purin-Purin-Hoogsteen-Paaren wiederum scheint als Erklärung von Transversionsmutationen zu genügen, ohne daß seltene tautomere Formen benötigt werden.

Dennoch widersprechen mehrere Experimente mit DNA-Polymerasen dieser Meinung (vgl. Abschnitte 3.3.4 und 3.3.7 sowie<sup>[169]</sup>). Deshalb sind wir der Ansicht, daß die Bildung von Hoogsteen- und Wobble-Paaren allein nicht alle in vivo nachgewiesenen Substitutionsmutationen zu erklären vermag. Besonders die großen Unterschiede bezüglich der Substitutionshäufigkeit, die gewöhnlich an verschiedenen Stellen („hot spots“) auftreten, sind auf der Basis eines anscheinend unbeeinflußten, zufälligen, fehlerhaften Einbaus nur sehr schlecht zu verstehen. Die unterschiedlich stabilisierenden Basenstapelungs-Wechselwirkungen könnten die sequenzabhängige Bildungswahrscheinlichkeit von z. B. Wobble-Paaren in Polymerasen etwas beeinflussen. Überlegt man sich jedoch, daß lediglich eine Auswahl zwischen vier unterschiedlichen nächsten Nachbarn besteht, die sich mehr oder weniger gut auf eine falsche Base am Primerende stapeln können, so resultiert eine viel zu kleine Variabilität in den Einbauraten von Fehlpaaren, um die oft beobachteten enormen Unterschiede in der Substitutionshäufigkeit erklären zu können. Ferner ist bekannt, daß die Replikation in vivo unter Beteiligung von DNA-Einzelstrang-bindenden Proteinen erfolgt, von denen angenommen wird, daß sie die Basenstapel im Templatstrang vor der Polymerisation abbauen, so daß die Replikationsgenauigkeit wesentlich verbessert wird<sup>[127]</sup>; trotzdem treten „hot spots“ in vivo auf.

Ein grundsätzliches Argument gegen die Bildung von Wobble-Paaren in der Polymerase ist im eigentlichen Zweck des Enzyms zu finden. Bei der Betrachtung von Fehlererkennungsmechanismen sollte man sich immer vergegenwärtigen, daß prokaryotische und eukaryotische Polymerasen hochentwickelte Proteine sind, die sich vermutlich hauptsächlich unter dem Selektionsdruck entwickelten, eine genügend hohe Replikationsgenauigkeit zu erreichen. Die erste denkbare Einschränkung, die Replikationsfehler unterdrücken könnte, ist, die Entstehung von Wobble- oder Hoogsteen-Paaren durch die Fixierung des Leserahmens zu verhindern (vgl. Abschnitt 1.3, Abb. 2c und 2d). Dies kann durch eine Tasche<sup>[105]</sup> erreicht werden, die das Protein bildet und die genau die richtige Größe für korrekte Basenpaare hat. Ein wesentlich schwierigeres Problem scheint die Fixierung des H-Substitutionsmusters zu sein, um u. a. die (De)protonierung und Tautomerisierung der Basen (Abb. 2a und 2b) zu verhindern, denn diese rascheren, sterisch nicht anspruchsvollen, protolytischen Reaktionen sind vermutlich nicht so leicht zu unterdrücken. Es scheint, als ob im Enzym die Triphosphat-Nucleosidbasen nur in der normalen tautomeren Form angenommen werden, während die Templatbasen von Brönstedt-Säuren und -Basen eher angegriffen werden können.

Dieses Evolutionsprinzip der Replikationsgenauigkeit unterscheidet sich sehr stark von dem der Translation, einem anderen templatabhängigen Prozeß, bei dem die nachgewiesene Bildung von Wobble-Paaren an der dritten Codonposition zwischen der mRNA und der tRNA nicht eingeschränkt, sondern von der Natur selektioniert wurde.

Dort wird eine gezielte Leseengenauigkeit angestrebt, damit verschiedene Codontriplets von der gleichen tRNA erkannt werden können (Entartung des universellen Codes).

Folglich kann man annehmen, daß die Entstehung von Wobble-Paaren in Polymerasen recht selten und nur für diejenigen Mutationsvorgänge maßgeblich ist, die immer nach der Replikation als Mutationshintergrund („Rauschen“) festgestellt werden können und nicht besonders ortsspezifisch sind. Es muß noch weitere Mechanismen geben, die ungeachtet der Replikationsgenauigkeit von Polymerasen eine hohe Substitutionshäufigkeit bewirken. Auf diese Weise gebildete Fehlpaare dürfen nicht auffallen, d. h. sie sollten von der Polymerase nicht als solche erkannt werden.

Nachdem sie die kritische Zeit im Enzym überstanden haben, werden sie an die Lösung abgegeben, und ihre Struktur wird allein von der hydratisierten, doppelsträngigen DNA bestimmt. Man kann zeigen, daß das gewöhnlich stabilste normale Tautomer angestrebt wird, und zwar oft auf Kosten einer Watson-Crick-ähnlichen Geometrie, wie es im Kristall normalerweise beobachtet wurde. Erst jetzt beginnen die Wobble- und normalen tautomeren Hoogsteen-Paare eine Hauptrolle bei der Mutagenese zu spielen, weil sie von post-replikativen Reparatur-Exonucleasen erkannt und herausgeschnitten werden können.

#### 4.2.2. Seltene tautomere Formen im Templatstrang *in vitro*

Es ist schwierig, die Beteiligung von tautomeren Formen direkt *in vitro* nachzuweisen, weil diese nur vorübergehend in Erscheinung treten. Neben unseren indirekten Hinweisen auf eine Mutagenese durch seltene tautomere Formen im DNA-Templatstrang, führen andere Resultate einschließlich Röntgenstrukturdaten zum gleichen Schluß<sup>[69, 128, 129]</sup>. Lippert et al.<sup>[1130]</sup> zeigten, daß *N*<sup>4</sup>-Imino-1-methylcytosin (entspricht C\*) durch Koordination von *N*<sup>4</sup> mit einem Platin(IV)-Ion stabilisiert werden kann. Chattopadhyaya et al.<sup>[180]</sup> fanden ein T\* in einem Watson-Crick-artigen T·T\*-Paar zwischen zwei nicht doppelhelicalen DNA-Strängen.

Obwohl in einer echten DNA-Doppelhelix keine Basenpaare mit seltenen Tautomeren gefunden wurden, zeigen die oben erwähnten Resultate, daß Wechselwirkungen wie Metallkoordination, Basenstapelung und Basenpaarung, die in allen biologischen Systemen vorkommen, seltene tautomere Formen stabilisieren können. Dies bedeutet, daß das gemessene Tautomerengleichgewicht von freien Basen oder sogar von Nucleosiden niemals den physikalisch-chemischen Zustand seltener tautomerer Formen, weder in einer proteinfreien DNA-Doppelhelix noch in polymerasegebundener DNA, repräsentiert. Das Replikationssystem scheint vor kinetisch labilen Formen im Templatstrang nicht geschützt zu sein, was zu Replikationsfehlern führen kann, falls Fehlpaare beim Korrekturlesen nicht erkannt werden. Kinetisch labile Formen sind protonierte oder deprotonierte Templatbasen oder seltene tautomere Formen von Templatbasen. Solche Formen unterscheiden sich, wenn sie in der DNA-Helix gestapelt sind, nur sehr geringfügig von normalen Formen und können deshalb eine „problematische“ Ursache für Substitutionsmutationen in der Polymerase sein.

Es wäre sehr hilfreich, wenn die Stabilität von Watson-Crick-ähnlichen tautomeren oder ionischen Fehlpaaren im aktiven Zentrum einer Polymerase *in vitro* sich irgendwie

experimentell demonstrieren ließe. Die Verwendung von Nucleotidbasen-Analoga mit verändertem H-Substitutionsmuster erwies sich als brauchbares Mittel für die Aufklärung von Substitutionsmutationen. Weitere Versuche sollen durchgeführt werden, um insbesondere die Korrekturlesaktivität von pol I gegenüber Pyrimidin-Pyrimidin-Paaren zu untersuchen.

Vielleicht wäre es nützlich, Mutagene zu finden, die Substitutionsmutationen durch Replikation ihrer modifizierten DNA bewirken, ohne diese dabei jedoch physisch zu schädigen. Die Wirkungsweise solch eines milden Mutagens sollte in einer reversiblen Reaktion mit der DNA bestehen, die nur dann gefährlich (mutagen) ist, wenn der Reaktionspartner (eine Templatnucleotidbase) repliziert wird, die aber sonst aufgrund ihrer kinetischen Labilität die Rückreaktion ein geht. Wir vermuten, daß es Möglichkeiten gibt, DNA-Basen zu tautomerisieren, besonders wenn diese in einem leicht zugänglichen Einzelstrang vorliegen. Es scheint allerdings recht schwierig zu sein, externe milde Mutagene zu finden – wir nennen sie „*Tauterogene*“ –, die bei der *in-vitro*-Replikation in der DNA Substitutionsmutationen hervorrufen, da nicht klar ist, welche Art von Verbindungen die Basen protonieren oder deprotonieren und somit tautomerisieren kann, ohne dabei weitere Reaktionen (z. B. mit der Polymerase) auszulösen.

#### 4.2.3. Tautomerisierende Mutagene *in vivo*?

Als interessanteste Möglichkeit ergibt sich aus den obigen Ausführungen die Existenz von „*Tauterogenen*“ *in vivo*, weil sie die vielfältigen Arten von Mutationsdrucken, in allen lebenden Zellen, erklären könnte. Zur Zeit kann noch nicht gesagt werden, auf welche Weise sich die Häufigkeit von Substitutionsmutationen innerhalb weniger Zellgeneratoren *in vivo* vergrößert. Das spontane Auftreten sekundärer Mutationen im Anfangsstadium eines tumorartigen Wachstums oder die plötzliche Umwandlung einer ruhenden Immunzelle in eine Zelle, die sofort somatische Substitutionsmutationen in den Antikörper-codierenden Genen hervorruft, sind zwei Beispiele. Es muß eine Möglichkeit bestehen, um Mutagene innerhalb einer Zelle zu aktivieren. Solche Mutagene können nicht gefährlich sein (im Sinne einer irreversiblen Schädigung des Genoms, da solche Zellen absterben würden), würden aber Substitutionsmutationen bei den Nachkommen der Zellen auslösen. DNA-bindende Proteine mit ihrer immensen Auswahl an deprotonierenden Funktionen empfehlen sich als Kandidaten für diesen Typ milder Mutagene. Sie würden kaum auffallen – nur vorübergehend an die DNA binden, eine Nucleotidbase während der Replikation tautomerisieren und wieder wegdiffundieren –, so daß ihre biologische Aktivität schwierig nachzuweisen wäre.

Die Vorstellung der Existenz eines „tauterogenen“ DNA-bindenden Proteins, das für eine beträchtliche Anzahl von Substitutionsmutationen *in vivo* von Bedeutung sein könnte, scheint aus mehreren Gründen attraktiv zu sein. Falls Proteine und die entsprechenden Gene gefunden und identifiziert würden, dürften sie z. B. bei Verwendung als Cytostatica oder sonstige Pharmaka beachtliche Eigenschaften haben. Darüber hinaus könnte eine große Anzahl der beobachteten, von der DNA-Sequenz abhängigen Substitutionsmutationen auf diese Proteine zurückgeführt werden, da sie

vermutlich sehr selektiv sind. Diese Eigenschaft wurde auch bei anderen DNA-bindenden Proteinen wie den Transkriptionsfaktoren oder Restriktionsenzymen beobachtet. Nicht zuletzt würden diese mutagenen DNA-bindenden Proteine, wie alle Proteine, fast direkte Produkte (via RNA) der DNA selbst sein. Das würde dem Genom eine direkte Kontrolle seiner eigenen Mutabilität ermöglichen, und dadurch ließen sich Fragen beantworten, wie z. B. ein gegebenes Genom einen gerichteten Mutationsdruck (z. B. ein gegebener G+C-Gehalt oder ein „Codondruck“, d. h. ein nicht zufälliger Gebrauch von synonymen Codons) über viele Generationen aufrecht erhält, und zwar ungeachtet eines eventuell vorhandenen Selektionsdrucks, der dieser Tendenz entgegenwirkt. Sicher würde es zu weit führen, an dieser Stelle näher darauf einzugehen (vgl. [131]). – Der letzte Teil der Schlußfolgerungen beruht nicht auf experimentellen Befunden. Er ist als Anregung zur Diskussion und Durchführung weiterer Experimente gedacht.

*Wir danken allen Mitarbeitern, die in den vergangenen Jahren wesentlich zu diesem Forschungsprojekt beigetragen haben (in alphabetischer Reihenfolge): R. Altermatt, P. Bühlmayer, N. Cerletti, R. Charczuk, S. De Bernardini, W. Falk, R. Glaser, G. Graf, I. Gregor, P. Kohler, C. A. Leach, C. Papageorgiou, H. D. Schneider, U. Séquin, E. Volz, M. Wachtl und F. Waldmeier. Zu Dank verpflichtet sind wir auch Prof. T. Bickle, Biozentrum der Universität Basel, Abteilung Mikrobiologie, und Priv.-Doz. Dr. K. Müller, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, für die angenehme Zusammenarbeit sowie den Dres. B. Hunter und M. Moore, Chemical Laboratory, University of Cambridge (GB), für die Korrekturen des englischen Manuskripts. Schließlich sei auch dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung für die finanzielle Unterstützung gedankt.*

Eingegangen am 16. Dezember 1988 [A 742]

- [1] C. de Duve, *Nature (London)* 333 (1988) 117.
- [2] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature (London)* 171 (1953) 737.
- [3] a) N. B. Ramsing, T. M. Jovin, *Nucleic Acid Res.* 16 (1988) 6659; b) J. H. van de Sande, N. B. Ramsing, M. W. Germann, W. Elhorst, B. W. Kalisch, E. von Kitzing, R. T. Pon, R. C. Clegg, T. M. Jovin, *Science (Washington, D.C.)* 241 (1988) 551.
- [4] a) S. M. Mirkin, V. I. Lyamichev, K. N. Drushlyak, V. N. Dolorynin, S. A. Filippov, M. D. Frank-Kamenetskii, *Nature (London)* 330 (1987) 495; b) Y. Kohwi, T. Kohwi-Shigematsu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 3781; c) J. C. Harvey, M. Shimizu, R. D. Wells, *ibid.* 85 (1988) 6292.
- [5] B. L. Currie, R. K. Robins, M. J. Robins, *J. Heterocycl. Chem.* 14 (1977) 475.
- [6] U. Séquin, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* 52 (1969) 1219.
- [7] U. Séquin, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* 55 (1972) 1196.
- [8] P. Kohler, E. Volz, U. Séquin, C. Tamm in L. B. Townsend, R. S. Tipson (Hrsg.): *Nucleic Acid Chemistry, Part 1*, Wiley-Interscience, New York 1978, S. 283.
- [9] M. Wachtl, *Dissertation*, Universität Basel 1980.
- [10] R. Charczuk, *Dissertation*, Universität Basel 1986.
- [11] R. Altermatt, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* 68 (1985) 475.
- [12] D. H. R. Barton, W. B. Motherwell, *Pure Appl. Chem.* 53 (1981) 15.
- [13] J. R. Williamson, S. G. Boxer, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 1529, zit. Lit.
- [14] H. Rosenmeyer, F. Seela, *Helv. Chim. Acta* 71 (1988) 1573, zit. Lit.
- [15] C. Papageorgiou, C. Tamm, *Tetrahedron Lett.* 27 (1986) 555.
- [16] C. Papageorgiou, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* 70 (1987) 138.
- [17] a) R. Zou, M. J. Robins, *Can. J. Chem.* 65 (1987) 1436; b) C. Tamm, P. Strazewski, G. Hong, unveröffentlicht.
- [18] M. J. Robins, J. S. Wilson, F. Hansske, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 4059.
- [19] F. Eckstein, K. H. Scheit, *Angew. Chem.* 79 (1967) 317; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 6 (1967) 362.
- [20] R. L. Letsinger, K. K. Ogilvie, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 3350.
- [21] W. Falk, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* 55 (1972) 1928.
- [22] I. Gregor, U. Séquin, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* 58 (1975) 712.
- [23] N. Cerletti, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* 60 (1977) 1182.
- [24] M. Yoshikawa, T. Kato, T. Takenishi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 42 (1969) 3505.
- [25] E. Volz, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* 61 (1978) 2579.
- [26] F. Waldmeier, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* 61 (1978) 1648.
- [27] P. Kohler, M. Wachtl, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* 63 (1980) 2488.
- [28] J. G. Moffat, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* 83 (1961) 649.
- [29] J. G. Moffat, *Can. J. Chem.* 42 (1964) 599.
- [30] S. De Bernardini, F. Waldmeier, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* 64 (1981) 2142.
- [31] S. De Bernardini, G. Graf, C. A. Leach, P. Bühlmayer, F. Waldmeier, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* 66 (1983) 639.
- [32] R. Altermatt, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* 68 (1985) 475.
- [33] C. B. Reese, R. C. Titmas, L. Yau, *Tetrahedron Lett.* 1978, 2727.
- [34] C. B. Reese, L. Yau, *Tetrahedron Lett.* 1978, 4443.
- [35] C. A. Leach, F. Waldmeier, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* 64 (1981) 2515.
- [36] H.-D. Schneider, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* 66 (1983) 350.
- [37] R. Charczuk, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* 70 (1987) 717.
- [38] a) J. B. Chattopadhyaya, C. B. Reese, *Tetrahedron Lett.* 1979, 5059; b) C. Tamm, P. Strazewski, G. Hong, M. Walser, H. Eschenhof, unveröffentlicht.
- [39] L. J. McBride, R. Kierzek, S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* 108 (1986) 2040.
- [40] L. J. McBride, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* 24 (1983) 2953.
- [41] P. T. Gilham, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 6212.
- [42] H. G. Khorana, J. P. Vizsolyi, *J. Am. Chem. Soc.* 83 (1961) 675.
- [43] N. Cerletti, C. Tamm, *Heterocycles* 5 (1976) 245.
- [44] N. Cerletti, U. Séquin, C. Tamm, W. Zürcher, *Helv. Chim. Acta* 61 (1978) 2589.
- [45] G. Weimann, H. G. Khorana, *J. Am. Chem. Soc.* 84 (1962) 419.
- [46] N. Cerletti, *Dissertation*, Universität Basel 1976.
- [47] P. Bühlmayer, G. Graf, F. Waldmeier, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* 63 (1980) 2469.
- [48] F. Waldmeier, S. De Bernardini, C. A. Leach, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* 65 (1982) 2472.
- [49] a) A. Maxam, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 560; b) C. Tamm, P. Strazewski, M. Walser, unveröffentlicht.
- [50] a) B. Chaudhuri, C. B. Reese, K. Weclawek, *Tetrahedron Lett.* 25 (1984) 4037; b) M. V. Rao, C. B. Reese, *Nucleic Acids Res.* 20 (1989) 8221.
- [51] R. L. Letsinger, W. B. Lursford, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 3655.
- [52] M. D. Matteucci, M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 3185.
- [53] a) S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* 22 (1981) 1859; b) C. Tamm, R. Charczuk, unveröffentlicht.
- [54] V. A. Efimov, O. G. Chakhmakheva, V. A. Ovchinnikov, *Nucleic Acids Res.* 13 (1985) 3651.
- [55] A. Kornberg: *DNA Replication*, Freeman, San Francisco 1980.
- [56] A. Kornberg: *1982 Supplement to DNA Replication*, Freeman, San Francisco 1982.
- [57] C. M. Joyce, T. A. Steitz, *Trends Biochem. Sci.* 12 (1987) 288.
- [58] T. A. Steitz, in R. M. Burnett, H. J. Vogel (Hrsg.): *Biological Organization: Macromolecular Interactions at High Resolution*, Academic Press, Orlando 1987, S. 45.
- [59] M. Wachtl, P. Kohler, C. Tamm, *Helv. Chim. Acta* 63 (1980) 2495.
- [60] H. Lineeweaver, D. Burke, *J. Am. Chem. Soc.* 56 (1934) 658.
- [61] R. Charczuk, C. Tamm, B. Suri, T. Bickle, *Nucleic Acids Res.* 14 (1986) 9530.
- [62] a) A. Bloch, G. Dutschman, *J. Med. Chem.* 16 (1973) 294; b) A. Bloch, M. C. Wang, *Biochem. Pharmacol.* 21 (1972) 1063.
- [63] T. Bickle, Biozentrum, Universität Basel, persönliche Mitteilung.
- [64] B. N. Ames, *Science (Washington, D.C.)* 204 (1979) 587.
- [65] R. Devoret, *Sci. Am.* 241 (1979) Nr. 2, S. 40.
- [66] L. J. Ferrin, A. S. Mildvan, *Biochemistry* 25 (1986) 5131.
- [67] T. A. Kunkel, R. M. Schaaper, L. A. Loeb, *Biochemistry* 22 (1983) 2378.
- [68] R. Rein, M. Shibata, R. Garduno-Juarez, T. Kieber-Emmons in E. Clementi, R. H. Sarma (Hrsg.): *Structure and Dynamics: Nucleic Acids and Proteins*, Adenine Press, New York 1983, S. 269.
- [69] P. Strazewski, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 9733.
- [70] P. Strazewski, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 5191.
- [71] H. Rosemeyer, F. Seela, *J. Org. Chem.* 52 (1987) 5136.
- [72] V. Mizrahi, R. N. Henric, J. F. Martier, K. A. Johnson, S. J. Benkovic, *Biochemistry* 24 (1985) 4010.
- [73] R. D. Kutchta, V. Mizrahi, P. Benkovic, K. A. Johnson, S. J. Benkovic, *Biochemistry* 26 (1987) 8410.
- [74] R. D. Kutchta, P. Benkovic, S. J. Benkovic, *Biochemistry* 27 (1988) 6716.
- [75] D. L. Ollis, P. Brick, R. Hamlin, N. G. Xuong, T. A. Steitz, *Nature (London)* 313 (1985) 762.
- [76] P. S. Freemont, J. M. Friedman, L. S. Beese, M. R. Sanderson, T. A. Steitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 8924.
- [77] L. J. Ferrin, R. A. Beckman, L. A. Loeb, A. S. Mildvan in V. L. Schramm, F. C. Wedler, (Hrsg.): *Manganese in Metabolism and Enzyme Function*, Academic Press, New York 1986, S. 259.
- [78] L. J. Ferrin, A. S. Mildvan, *Biochemistry* 24 (1985) 6904.
- [79] M. J. Scanlan, I. H. Hillier, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 3737.
- [80] R. Chattopadhyaya, S. Ikuta, K. Grzeskowiak, R. E. Dickerson, *Nature (London)* 334 (1988) 175.
- [81] R. K. Robins, *Chem. Eng. News* 64 (1986) Nr. 1, S. 28.

- [82] H. Mitsuya, S. Broder, *Nature (London)* **325** (1987) 773.
- [83] P. Herdewijn, J. Balzarini, E. De Clercq, R. Pauwels, M. Baba, S. Broder, H. Vanderhaeghe, *J. Med. Chem.* **30** (1987) 1270.
- [84] J. Weber, F. Grosse, *Nucleic Acids Res.* **17** (1989) 1379.
- [85] a) P. H. Driggers, K. L. Beattie, *Biochemistry* **27** (1988) 1729; b) L. C. Sowers, R. Eritja, B. Kaplan, M. F. Goodman, G. V. Fazakerley, *J. Biol. Chem.* **263** (1988) 14794.
- [86] M. F. Goodman, E. W. Branscomb in T. B. L. Kirkwood, R. F. Rosenberg, D. J. Galas (Hrsg.): *Accuracy in Molecular Processes*, Chapman & Hall, London 1986, S. 191.
- [87] L. A. Sowers, G. V. Fazakerley, R. Eritja, B. E. Kaplan, M. F. Goodman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (1986) 5434.
- [88] D. Mhaskar, M. F. Goodman, *J. Biol. Chem.* **259** (1984) 11713.
- [89] R. Eritja, B. E. Kaplan, D. Mhaskar, L. A. Sowers, J. Petruska, M. F. Goodman, *Nucleic Acids Res.* **14** (1986) 5869.
- [90] R. Eritja, D. M. Horowitz, P. A. Walker, J. P. Ziehler-Martin, M. S. Boosalis, M. F. Goodman, K. Itakura, B. E. Kaplan, *Nucleic Acids Res.* **14** (1986) 8135.
- [91] B. F. L. Li, P. F. Swann, M. W. Kalnik, M. Kouchakdijan, D. J. Patel in J. W. Jaroszewski, K. Schaumberg, H. Kofod (Hrsg.): *NMR Spectroscopy in Drug Research, Alfred Benzon Symposium 26*, Munksgaard, Kopenhagen 1988, S. 309.
- [92] P. Swann, University College, London, persönliche Mitteilung.
- [93] a) F. Aboul-ela, D. Koh, I. Tinoco, Jr., *Nucleic Acids Res.* **13** (1985) 4811; b) H. Werntges, G. Steger, D. Riesner, H.-J. Fritz, *ibid.* **14** (1986) 3773.
- [94] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature (London)* **171** (1953) 964.
- [95] M. D. Topal, J. R. Fresco, *Nature (London)* **263** (1976) 285.
- [96] A. R. Fersht, J. W. Knill-Jones, W.-C. Tsui, *J. Mol. Biol.* **156** (1982) 37.
- [97] J. E. Patten, A. G. So, K. M. Downey, *Biochemistry* **23** (1984) 1613.
- [98] G. G. Hillebrand, A. H. McCluskey, K. A. Abbott, G. G. Revich, K. L. Beattie, *Nucleic Acids Res.* **12** (1984) 3155.
- [99] G. G. Hillebrand, K. L. Beattie, *J. Biol. Chem.* **260** (1985) 3116.
- [100] M.-D. Lai, K. L. Beattie, *Biochemistry* **27** (1988) 1722.
- [101] T. A. Kunkel, *J. Biol. Chem.* **260** (1985) 5787.
- [102] T. A. Kunkel, *J. Biol. Chem.* **260** (1985) 12866.
- [103] T. A. Kunkel, P. S. Alexander, *J. Biol. Chem.* **261** (1986) 160.
- [104] M. E. Reyland, I. R. Lehman, L. A. Loeb, *J. Biol. Chem.* **263** (1988) 6518.
- [105] J. Petruska, M. F. Goodman, M. S. Boosalis, L. A. Sowers, C. Cheong, I. Tinoco, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** (1988) 6252.
- [106] M. S. Boosalis, J. Petruska, M. F. Goodman, *J. Biol. Chem.* **262** (1987) 14689.
- [107] T. Brown, O. Kennard, G. Kneale, D. Rabinovich, *Nature (London)* **315** (1985) 604.
- [108] G. Kneale, T. Brown, O. Kennard, D. Rabinovich, *J. Mol. Biol.* **186** (1985) 805.
- [109] P. S. Ho, C. A. Frederick, G. J. Quigley, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, A. H. Wang, A. Rich, *EMBO J.* **4** (1985) 3617.
- [110] W. N. Hunter, T. Brown, N. N. Anand, O. Kennard, *Nature (London)* **320** (1986) 552.
- [111] W. N. Hunter, T. Brown, O. Kennard, *Nucleic Acids Res.* **15** (1987) 6589.
- [112] L. C. Sowers, G. V. Fazakerley, H. Kim, L. Dalton, M. F. Goodman, *Biochemistry* **25** (1986) 3983.
- [113] M. W. Kalnik, M. Kouchakdijan, B. F. L. Li, P. F. Swann, D. J. Patel, *Biochemistry* **27** (1988) 100.
- [114] O. Kennard, *J. Biomol. Struct. Dyn.* **3** (1985) 205.
- [115] G. G. Prive, U. Heinemann, S. Chandrasegaran, L.-S. Kan, M. L. Kopka, R. E. Dickerson, *Science (Washington, D.C.)* **238** (1987) 498.
- [116] T. A. Early, J. Olmsted, D. R. Kearns, A. G. Lezius, *Nucleic Acids Res.* **5** (1978) 1955.
- [117] D. J. Patel, S. A. Kozlowski, L. A. Marky, J. A. Rice, C. Broka, J. Dallas, K. Itakura, K. J. Breslauer, *Biochemistry* **21** (1982) 437.
- [118] L. S. Kan, S. Chandrasegaran, S. M. Pulford, P. S. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** (1983) 4263.
- [119] D. J. Patel, S. A. Kozlowski, S. Ikuta, K. Itakura, *Biochemistry* **23** (1984) 3207.
- [120] D. J. Patel, S. A. Kozlowski, S. Ikuta, K. Itakura, *Biochemistry* **23** (1984) 3218.
- [121] D. J. Patel, S. A. Kozlowski, S. Ikuta, K. Itakura, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **43** (1984) 2663.
- [122] D. Hare, L. Shapiro, D. J. Patel, *Biochemistry* **25** (1986) 7445.
- [123] X. Gao, D. J. Patel, *J. Am. Chem. Soc.* **110** (1988) 5178.
- [124] T. Brown, A. Leonard, E. D. Booth, J. Chambers, *J. Mol. Biol.* **207** (1989) 455.
- [125] J. Jircny, S.-S. Su, S. G. Wood, P. Modrich, *Nucleic Acids Res.* **16** (1988) 7843.
- [126] M. Kouchakdijan, B. F. L. Li, P. F. Swann, D. J. Patel, *J. Mol. Biol.* **202** (1988) 139.
- [127] a) L. V. Mendelman, M. S. Boosalis, J. Petruska, M. F. Goodman, *J. Biol. Chem.* **264** (1989) 14, 415; b) M. D. Topal, N. K. Sinha, *ibid.* **258** (1983) 12, 274.
- [128] Y. Kuchino, F. Mori, H. Kasai, H. Inoue, S. Iwai, K. Miura, E. Ohtsuka, S. Nishimura, *Nature (London)* **327** (1987) 77.
- [129] J. Fresco, S. Broitman, A. E. Lane in B. Alberts, C. F. Fox (Hrsg.): *Mechanistic Studies of DNA Replication and Genetic Recombination*, Academic Press, New York 1980, S. 753.
- [130] B. Lippert, H. Schöllhorn, U. Thewalt, *J. Am. Chem. Soc.* **108** (1986) 6616.
- [131] P. Strazewski, *J. Mol. Evol.* (1990), im Druck.