

LA SYNTHÈSE DE L'ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE PAR LES EXTRAITS DES CELLULES CANCÉREUSES*

J. N. DAVIDSON

Université de Glasgow, Ecosse

Abstract—An enzyme system has been obtained from Ehrlich ascites tumour cells which is capable of promoting incorporation of tritiated thymidine (^3H -TDR) into DNA. The ascites cells are disrupted osmotically and all particulate matter is removed by high-speed centrifugation. The system requires the presence of ATP, magnesium ions and a low concentration of DPN. Primer DNA is required; it may be obtained from any source; digestion with deoxyribonuclease abolishes its activity as a primer, but heating increases activity.

The addition of very small amounts of dAMP, dGMP, and dCMP stimulates incorporation; higher concentrations inhibit it. Addition of the corresponding deoxyribonucleoside triphosphates stimulates incorporation.

It has been conclusively proved by degradation experiments that incorporation of ^3H -TDR does not represent terminal addition to an existing polynucleotide chain of a single nucleotide or of a polythymidylic acid extension, but that it represents random incorporation within a new polynucleotide chain.

Net synthesis of DNA has been demonstrated by incubating the system in the presence of primer DNA with four deoxyribonucleoside monophosphates and ATP, or with the four deoxyribonucleoside triphosphates without ATP.

LA BIOSYNTÈSE de l'acide désoxyribonucléique (ADN) a retenu l'attention de plusieurs groupes de chercheurs au cours de ces dernières années (voir toute la bibliographie). A Glasgow, nous nous sommes occupés principalement d'étudier la biosynthèse de l'ADN par une préparation soluble obtenue à partir du carcinome ascitique d'Ehrlich; à noter cependant qu'un certain nombre d'autres tissus ont été également étudiés.

Le système enzymatique est représenté par une fraction légère obtenue par centrifugation à haute vitesse de cellules tumorales lysées par choc osmotique, et il a été démontré qu'en présence de substances appropriées, ce système incorpore facilement la ^3H -thymidine (^3H -TDR) dans l'ADN. L'incorporation de la TDR s'effectue le plus rapidement à un pH d'environ 7,9 et diminue brusquement lorsque le pH s'élève ou s'abaisse. Les tampons phosphate et glycine ont été utilisés avec succès mais en général nous avons constaté que le tampon "tris" est celui qui convient le mieux.

Ce système a un besoin absolu d'ATP et d'ions Mg^{2+} , la concentration optimum de chacun étant de $5 \mu\text{mole/ml}$. De plus, de petites quantités de DPN provoquent

* Abréviations utilisées: acide désoxyribonucléique (ADN); acide ribonucléique (ARN); acide nucléique (AN); diphosphopyridinenucléotide (DPN); nucléosides triphosphates (NTP); désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP); adénosine, cytidine, uridine, guanosine, inosine et thymidine monophosphates (AMP, CMP, UMP, GMP, IMP et TMP) ou triphosphates (ATP, CTP, UTP, GTP, ITP et TTP); désoxyadénosine, désoxyguanosine, désoxycytidine, désoxyuridine et désoxyinosine monophosphates (dAMP, dGMP, dCMP, dUMP et dIMP) ou triphosphates (dATP, dGTP, dCTP, dUTP et dITP).

l'utilisation de ^3H -TDR aussi celui-ci est-il normalement ajouté au milieu réactionnel à la concentration de $0,25 \mu\text{mole/ml}$. Dès le début de ces recherches, il s'est avéré nécessaire d'ajouter un ADN initiateur (*primer*). Bien qu'il existe une petite quantité d'ADN dans l'extrait tissulaire, l'addition de 25 à $50 \mu\text{g/ml}$ du *primer* stimule l'incorporation de la thymidine. L'origine de cet ADN semble être de peu d'importance et des ADN de cellules de tumeurs ascitiques, de thymus de veau et de sperme de saumon se sont tous montrés efficaces. Une digestion préalable de l'ADN par de la désoxyribonucléase I (DNase I) abolit la stimulation de l'incorporation de TDR.

L'incorporation de ^3H -TDR dans l'ADN est en rapport avec la quantité de protéine extraite présente dans le mélange réactionnel entre $0,25$ et 2 mg/ml et en général nous avons utilisé de 3 à 5 mg de protéines par ml . Dans ces conditions, l'incorporation s'effectue rapidement et la réaction atteint un équilibre en 90 min environ à 37°C .

L'influence d'un certain nombre d'ions autres que le Mg^{2+} a été étudiée mais, alors que les ions Mg^{2+} peuvent être remplacés dans une certaine mesure par des ions Mn^{2+} , on ne peut les remplacer par du Ca^{2+} . Jusqu'ici les ions Mg^{2+} seuls se sont montrés supérieurs à n'importe quelle combinaison d'ions Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} qui ait été essayée.

L'addition de très petites quantités ($2,5 \mu\text{mole/ml}$.) de désoxyadénosine, de désoxyguanosine et de désoxycytidine monophosphates (dAMP, dGMP et dCMP) provoquent également l'incorporation de la TDR mais de plus hautes concentrations ($10 \mu\text{mole/ml}$.) l'inhibent. Les désoxyribonucléosides triphosphates correspondants (dATP, dGTP et dCTP) ajoutés individuellement ou simultanément stimulent aussi l'utilisation de la TDR et dans ce cas, plus la concentration du nucléotide ajoutée est élevée, plus l'incorporation de ^3H -TDR est grande.

La TDR peut être incorporée dans l'ADN de trois façons différentes: (a) comme nucléotide terminal unique sur un polynucléotide existant; (b) comme une extension d'acide polythymidylique à un polynucléotide existant; (c) comme nucléotide distribué au hasard sous forme de portion nouvelle d'une chaîne polynucléotidique. Nous avons donc mené certaines expériences pour élucider la localisation intramoléculaire de la TDR incorporée à l'ADN.

Un échantillon d'ADN qui avait été marqué avec de la ^3H -TDR de la façon usuelle fut dégradé par la DNase II et par la 3'-phosphodiesterase (ADLER *et al.*, 1958) de façon à donner des désoxyribonucléosides 3'-monophosphates et des nucléosides terminaux. Après séparation des produits de digestion, la plus grande partie de la radioactivité (90%) fut retrouvée dans la thymidine 3'-monophosphate et seulement une petite proportion (10%) dans la fraction des nucléosides libres; ceci indique que la ^3H -TDR a été incorporée principalement en positions non terminales dans le polynucléotide et exclut ainsi l'éventualité (a) (voir ci-dessus) comme localisation principale de la TDR incorporée.

Un autre échantillon de ^3H -ADN fut dégradé directement avec de la 5'-phosphodiesterase, enzyme qui dégrade l'ADN de façon graduelle depuis le désoxyribonucléoside en bout de chaîne (ADLER *et al.*, 1958). Nous avons observé que la libération de la radioactivité acidosoluble et les nucléotides acidosolubles étaient en étroite corrélation et que même après que 80 % de l'ADN fut rendu acidosoluble,

la portion insoluble retenait environ 20% de la radioactivité originelle. Si la TDR avait été présente dans l'ADN selon (a) ou (b), toute la radioactivité aurait été libérée dans les tout premiers stades de la digestion avant qu'une dégradation substantielle de l'ADN se fût produite et ces résultats suggèrent que la ^3H -TDR est distribuée au hasard dans la chaîne polynucléotidique.

Au cours d'autres expériences, du dCMP marqué au ^{32}P et du thymidine 5'-monophosphate (TMP) marqué au ^{32}P furent incorporés séparément dans l'ADN dans le système habituel. Les ADN furent ensuite isolés et dégradés par la DNase II et la 3'-phosphodiesterase de façon à donner les quatre constituants désoxyribonucléosides 3'-monophosphates. De cette façon, nous avons pu isoler le nucléoside 3'-monophosphate contenant le phosphore originellement associé au 5'-nucléotide adjacent. Que ce soit avec le ^{32}P -dCMP ou le ^{32}P -TMP comme précurseurs, nous avons constaté que la radioactivité de l'ADN se trouvait distribuée de façon plus ou moins égale dans les désoxyribonucléosides 3'-monophosphates, indiquant ainsi une distribution au hasard du nucléotide incorporé dans le polynucléotide et excluant complètement la possibilité de l'incorporation du dCMP ou du TMP sous forme de prolongement d'acide polydésoxycytidylique ou d'acide polythymidylique à un polynucléotide préexistant, comme dans (b).

Le calcul de la quantité de dCMP incorporé par rapport à la quantité d'ADN présent dans le mélange réactionnel montre qu'une molécule de dCMP a été incorporée pour chaque série de trente résidus nucléotidiques du polynucléotide. Ceci correspond à l'addition d'un nucléotide pour chaque unité de poids moléculaire 10 000 et à moins que l'on postule que le poids moléculaire moyen de l'ADN soit de cet ordre dans le système, il est impossible de rendre compte de tous les nucléotides incorporés en termes de simple addition terminale (système (a)).

Ces résultats suggèrent fortement que l'incorporation de la ^3H -TDR dans l'ADN dans le système ci-dessus est l'indice de la synthèse d'une nouvelle portion d'une chaîne polynucléotidique et nous avons entrepris des expériences pour mesurer la synthèse nette de polynucléotides.

Lorsque le type normal de mélange réactionnel est incubé avec ou sans addition de quatre désoxyribonucléosides 5'-monophosphates (500 m μ mole de chaque/ml) la quantité d'ADN présent à la fin de l'incubation est considérablement plus élevée dans les tubes contenant les désoxyribonucléotides. Jusqu'à présent, la plus forte différence observée fut de 81% correspondant à environ 21 μg de polynucléotides dans 1 ml de mélange réactionnel. Une synthèse similaire de polynucléotides a été observée dans des mélanges réactionnels contenant les quatre désoxyribonucléosides 5'-triphosphates mais pas d'ATP. Les préparations dialysées comme les préparations non dialysées de l'extrait sont capables de synthèse de polynucléotides lorsqu'on leur fournit des désoxyribonucléosides triphosphates comme substrat. Dans une autre expérience, la synthèse de polynucléotides fut réalisée à partir d'un mélange de dAMP, de dGMP et de dCMP non radioactifs et de TMP radioactif. Dans ce cas, il a été possible de calculer l'importance de la synthèse nette à la fois par l'accroissement de la quantité de polynucléotides et l'augmentation de leur radioactivité et un accord satisfaisant a été trouvé entre les résultats obtenus par ces deux méthodes.

RÉSUMÉ

A partir de cellules de tumeur ascitique d'Ehrlich, un système enzymatique a été obtenu; celui-ci est capable de favoriser l'incorporation de thymidine tritiée (^3H -TDR) dans l'ADN. Les cellules d'ascite sont détruites par choc osmotique et le système enzymatique est représenté par une fraction légère obtenue par centrifugation à haute vitesse. Le système exige la présence d'ATP, ion magnésium et une faible concentration de DPN. De l'ADN *primer* est nécessaire; il peut être de source variée; la digestion par la désoxyribonucléase détruit son activité en tant que *primer* mais la chaleur accroît son activité.

L'addition de très faibles quantités de dAMP, dGMP et dCMP augmente l'incorporation; des concentrations plus élevées l'inhibent. L'addition de désoxyribonucléosides triphosphates correspondants stimule l'incorporation.

Il a été prouvé par des expériences de dégradation que l'incorporation de ^3H -TDR ne représente pas une addition terminale d'une chaîne polynucléotidique préexistante d'un simple nucléotide ou d'un prolongement d'acide polythymidylique mais qu'elle représente une incorporation au sein d'une nouvelle chaîne polynucléotidique.

Une synthèse nette d'ADN a été observée en incubant le système en présence d'ADN *primer* avec quatre désoxyribonucléosides monophosphates et ATP ou avec les quatre désoxyribonucléosides triphosphates sans ATP.

BIBLIOGRAPHIE

- ADLER J., LEHMAN I. R., BESSMAN M. J., SIMMS E. S. et KORNBERG A. (1958) *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* **44**, 641.
 BESSMAN M. J., LEHMAN I. R., SIMMS E. S. et KORNBERG A. (1958) *J. Biol. Chem.* **233**, 171.
 BOLLUM F. J. et POTTER V. R. (1958) *J. Biol. Chem.* **233**, 478.
 DAVIDSON J. N., SMELLIE R. M. S., KEIR H. M. et MCARDLE A. H. (1959) *Nature, Lond.* **182**, 589.
 LEHMAN I. R., BESSMAN M. J., SIMMS E. S. et KORNBERG A. (1958) *J. Biol. Chem.* **233**, 163.
 MANTSAVINOS R. et CANELLAKIS E. S. (1959) *J. Biol. Chem.* **234**, 628.
 SMELLIE R. M. S., KEIR H. M. et DAVIDSON J. N. (1959) *Biochim. Biophys. Acta.* **35**, 389.
 SMELLIE R. M. S., GRAY E. D., KEIR H. M., RICHARDS J., BELL D. et DAVIDSON J. N. (1960) *Biochim. Biophys. Acta.* **37**, 243.

DISCUSSION

P. ALEXANDER:

(1) In view of the evidence by PELC that thymidine can be incorporated *in vivo* in cells where there is no net DNA synthesis, have you been able to exclude the possibility that thymidine exchange plays a part?

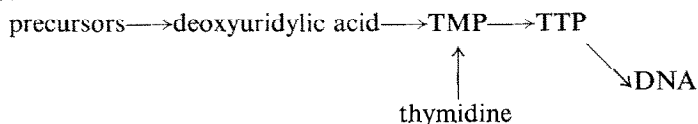
(2) Can the conditions under what you observe DNA synthesis be considered physiological?

J. N. DAVIDSON:

(1) The answer to the first question is: (a) that our conditions are completely different from that of PELC and LACOUR who were working with intact cells; we use cell free extracts; (b) we have carried out net synthesis with the following mixture—dAMP, dCMP, dGMP and ^3H -TMP. The net synthesis as measured chemically agreed well with the results found by measuring the incorporation of the ^3H -TMP. This effectively excludes the possibility that our results are due to an exchange.

(2) The system appears to be as "physiological" as can be expected of a cell-free extract. Deoxyribonucleotides stimulate incorporation only at very low concentrations—higher concentrations inhibit; they are present in tissues only in very low concentrations.

It could be argued that thymidine itself is not a physiological substance since it is not on the direct line of formation of TTP (thymidine triphosphate) in biosynthesis:



We have, however, shown that our system contains an enzyme which can phosphorylate thymidine to TMP (thymidine monophosphate). This enzyme is quite distinct from the enzyme which phosphorylates TMP to TTP.

J. DANIELLI: Will the enzymes in your DNA-synthetizing system resist the solvents used in anhydrous separation of nuclei and cytoplasms?

J. N. DAVIDSON: We do not know whether the enzyme systems concerned would withstand the procedures involved in the preparation of Behrens-type nuclei but we do know that frozen-dried extract retains its activity for some considerable time.

J. HUPPERT:

(1) Les extraits cellulaires sont-ils stables?

(2) La différence d'activité d'un tissu à l'autre ne pourrait-elle être attribuée à une différence de stabilité?

J. N. DAVIDSON:

(1) Les extraits gardent leur activité plusieurs jours si on les conserve à l'état congelé et plusieurs semaines à l'état lyophilisé.

(2) La comparaison des tissus était faite avec des extraits frais—en plus, dans le tableau comparatif les cellules d'ascite ne sont pas incluses—leur système enzymatique pouvant être différent.

F. KASTEN: Would it be of any help in detecting loss of material from nuclei to cytoplasm use non-nucleated erythrocytes?

J. N. DAVIDSON: I do not think so, since extracts of non-proliferating tissues such as kidney, are almost inactive

P. MANDEL: L'enzyme trouvé dans le cytoplasme ne peut-il pas provenir des noyaux au cours de la lyse des cellules pour séparer les noyaux?

C. LIÉBECQ: In relation to Prof Mandel's question, is it possible to reinforce the cytoplasmic extract, in itself enzymatically active, by addition of nuclear extracts? Is a mixture of nuclear and cytoplasmic extract more active than the sum of the two?

J. N. DAVIDSON: Reinforcement has been tried but the results are not encouraging. The situation is complicated by the presence of DNA in nuclear extracts.

R. WEGMANN: What happens when UTP (uridine triphosphate) is used instead of ATP?

J. N. DAVIDSON: We have tried to use it and found it may partially replace ATP.