

Diss. ETH No. 23371

# **Synthetic nucleotides for detecting DNA adducts: enzyme-based amplification strategies**

A thesis submitted to attain the degree of

DOCTOR OF SCIENCES of ETH Zurich

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

**LAURA ANDREA WYSS**

MSc ETH in Food Science, ETH Zurich, Switzerland

born on 26.11.1985

Citizen of

Olten (SO) and Fulenbach (SO)

Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Shana J. Sturla

Prof. Dr. Donald Hilvert

Prof. Dr. Andreas Marx

2016

## Abstract

Exposure to alkylating agents from diet, environment, and chemotherapeutic drugs can harm genome integrity through formation of DNA adducts that may result in characteristic mutation profiles in several cancer types. However, there are no methods available with single-base resolution to determine the exact location of DNA adducts, nor do they enable amplification. This thesis work focused on new enzyme-mediated approaches for evaluating in-gene  $O^6$ -alkylguanine ( $O^6$ -alkylG) adduct abundance on a single-molecule level. The strategy involved non-natural nucleoside triphosphate analogues that specifically pair with  $O^6$ -alkylated bases in polymerase-mediated DNA replication. An important prerequisite for this achievement was first, to identify a robust DNA polymerase that can efficiently replicate past these  $O^6$ -alkylG adducts, and second, that harnessed the ability to specifically incorporate a synthetic nucleotide analogue opposite the DNA adduct of interest. These milestones were achieved for the first time in this thesis work.

*Chapter 1* describes an introduction to the topic of this thesis. In *Chapter 2*, two newly prepared nucleoside triphosphate analogues **BIMTP** and **BenziTP** were tested as substrates for various DNA polymerases opposite the model bulky  $O^6$ -benzylguanine ( $O^6$ -BnG) adduct. A *Taq* mutant polymerase was identified (*KTqM747K* polymerase) that specifically incorporated **BenziMP** opposite  $O^6$ -BnG with high selectivity over natural dNTPs. We further showed that when replicating  $O^6$ -BnG with *KTqM747K*, the presence of artificial **BenziTP** was required for formation of full-length products in addition to natural dNTPs. Through the combination of **BenziTP** and *KTqM747K* polymerase we achieved to linearly amplify  $O^6$ -BnG DNA where an amplicon is generated containing **Benzi** that marks the adduct site in the original template. However, because  $O^6$ -BnG adducts have not been observed *in vivo*, our subsequent studies focused on physiologically occurring  $O^6$ -alkylG adducts.

In *Chapter 3*, the studies were expanded to investigate the action of artificial nucleotides in *KTqM747K*-mediated bypass of carcinogenic  $O^6$ -methylguanine ( $O^6$ -MeG) and  $O^6$ -carboxymethylguanine ( $O^6$ -CMG) adducts which are of particular biological interest among alkylation adducts since they have been observed in various tissue samples. We found that **BenziMP** is also specifically incorporated opposite these two DNA adducts. Steady-state kinetic experiments revealed the highest specificity for **BenziMP** incorporation opposite  $O^6$ -MeG versus G (150-fold difference in catalytic efficiencies), followed by  $O^6$ -BnG (24-fold), and  $O^6$ -CMG (12-fold). Investigating full-length translesion DNA synthesis, we discovered that  $O^6$ -MeG adducts are readily bypassed by *KTqM747K* polymerase, but  $O^6$ -CMG stalled DNA replication and **BenziTP** was required to promote full-length product formation. Finally, it was verified that **Benzi** is only incorporated opposite the  $O^6$ -alkylG adduct and not opposite canonical bases by using a new dideoxy **Benzi** nucleotide terminator.

We demonstrated successful linear PCR amplification of biologically relevant  $O^6$ -CMG and  $O^6$ -MeG adducts with **Benzi** as a marker nucleotide for the adduct site. However, with  $O^6$ -MeG DNA, amplicons were also generated in the absence of **BenziTP**. In another approach, the combination of artificial **BenziTP** and *KTqM747K* DNA polymerase mutant allowed concentration-dependant recognition of  $O^6$ -MeG and  $O^6$ -CMG adducts in 10-fold dilutions with unmodified DNA with 3-fold lower amounts required than necessary for linear amplification.

In *Chapter 4*, the findings of the PhD thesis work are summarized and critically evaluated. Limitations of our achievements are discussed and possible future directions as well as anticipated

experiments are introduced. In *Appendix A*, the two benzimidazole-derived nucleotide analogues **BIMTP** and **BenziTP** were explored as substrates for human polymerase  $\eta$  in DNA synthesis of cysplatinated and unmodified DNA and both nucleotides showed to impede human polymerase  $\eta$  in full-length synthesis of platinated templates. These findings represent a potent strategy to overcome anticancer drug resistance by using synthetic nucleotides as inhibitors for translesion DNA polymerases.

In *Appendix B*, synthetic nucleosides as specific base pairing partners for  $O^6$ -alkylG in DNA hybridization probes were explored. Structurally elongated versions of **BIM** and **Benzi** showed to form more stable DNA duplexes when paired opposite  $O^6$ -alkylG versus G in thermodynamic melting experiments. Their selectivity for stabilizing adducted DNA make **ExBenzi** and **ExBIM** improved candidates for incorporating into hybridization probes for sequence-specific detection of  $O^6$ -alkylG in DNA.

In conclusion, the work presented in this thesis represents a major achievement for the development of DNA adduct detection technologies with single-base resolution. This thesis includes the first report of specific incorporation and extension of an artificial nucleotide opposite DNA alkylation adducts by a DNA polymerase. The combination of an engineered polymerase and an artificial nucleotide allowed us to linearly amplify  $O^6$ -alkylG adducted DNA where **Benzi** marks the adduct site in the amplicon. Furthermore, we developed an approach to recognize  $O^6$ -alkylG adducts in mixtures of damaged and unmodified DNA with **BenziTP**. These findings are an important basis for further development of amplification-based technologies for detection of DNA adducts that combine engineered DNA polymerases with synthetic nucleic acid probes.

## Zusammenfassung

In unserer Nahrung, der Umwelt, im Zigarettenrauch oder auch in Chemotherapeutika können alkylierende Substanzen enthalten sein, welche die Nukleobasen der Desoxyribonukleinsäure (DNS) angreifen und erbgutverändernde Alkylierungen bilden.  $O^6$ -Alkylguanin ( $O^6$ -AlkylG) -Addukte beispielsweise können charakteristische Mutationen verursachen, welche an der Entstehung von Krebs beteiligt sind. Jedoch können die exakte Position und die Verteilung von Addukten im Genom mit den heutigen Methoden nicht bestimmt werden. Die vorliegende Doktorarbeit umfasst die Entwicklung neuer Enzym-basierter Strategien zur Bestimmung von  $O^6$ -alkylG-Addukten in Genen mit der Auflösung auf der Ebene einer einzelnen Base. Um dies zu erreichen wurden nicht-natürliche Nukleosid-Triphosphate synthetisiert, welche bei der DNS Replikation durch Polymerasen spezifisch mit  $O^6$ -alkylG ein Basenpaar bilden sollen. Eine wichtige Voraussetzung dafür ist, dass die DNS Polymerase über diese DNS Schäden effizient replizieren kann und dass sie diese nicht-natürlichen Nukleotide spezifisch gegenüber von  $O^6$ -AlkylG-Addukten einbaut.

*Kapitel 1* beinhaltet eine Einführung über den fachlichen Inhalt dieser Doktorarbeit. In *Kapitel 2* wird beschrieben wie zwei neue nicht-natürliche Benzimidazol-Nukleosid-Triphosphate synthetisiert wurden (**BIMTP** und **BenziTP**) und als Substrate für verschiedene DNA Polymerasen in der Replikation von  $O^6$ -Benzylguanin ( $O^6$ -BnG) als Modell für ein sperriges DNA Addukt, getestet wurden. Dabei haben wir eine *Taq* Polymerasen Mutante (*KTqM747K*) identifiziert, welche das **BenziMP** spezifisch gegenüber von  $O^6$ -BnG einbaut. Weiter wurde die Zugabe von **BenziTP** benötigt um das gesamte  $O^6$ -BnG-Templat mit der *KTqM747K* Polymerase zu synthetisieren und ein vollständiges Extensionsprodukt zu generieren. Die Kombination von **BenziTP** und der *KTqM747K* Polymerase erlaubte uns erstmals DNS mit einem  $O^6$ -BnG-Addukt linear zu amplifizieren. In dieser Reaktion wurde ein Amplifikationsprodukt hergestellt, welches **Benzi** als Marker an der Position des Adduktes im ursprünglichen Templat enthält. Die Ergebnisse dieser Studie bilden eine wichtige Grundlage für die weitere Entwicklung von Amplifikations- und Detektionsmethoden von DNS Addukten. Da das  $O^6$ -BnG-Addukt jedoch noch nie *in vivo* gemessen wurde, fokussierten wir unsere weiterführenden Studien auf physiologisch vorkommende  $O^6$ -alkylG-Addukte.

*Kapitel 3* beschreibt die Untersuchung der DNS Replikation von krebserzeugenden  $O^6$ -Methylguanin ( $O^6$ -MeG) und  $O^6$ -Carboxymethylguanin ( $O^6$ -CMG) -Addukten mit den synthetischen Nukleotiden als Substrate. Diese DNS Addukte sind von besonderer biologischer Relevanz, da sie bereits in verschiedenen Gewebeproben nachgewiesen wurden. **BenziTP** wurde von der *KTqM747K* Polymerase ebenfalls spezifisch gegenüber diesen beiden DNA Addukten eingebaut. Die höchste Spezifität für den Einbau von **Benzi** wurde kinetisch gegenüber  $O^6$ -MeG gemessen und zwar mit einer 150-fach höheren katalytischen Effizienz als beim Einbau von **Benzi** gegenüber von Guanin. Wir konnten zeigen, dass die *KTqM747K* Polymerase gut über das  $O^6$ -MeG-Addukt lesen kann, während das  $O^6$ -CMG-Addukt die Polymerase blockiert. Erst die Zugabe von **BenziTP** zu den natürlichen Nukleotiden ermöglichte die Bildung von vollständigen Extensionsprodukten während der Replikation von  $O^6$ -CMG-Templaten. Mit Hilfe eines neu hergestellten Terminator-Nukleotids von **Benzi** konnten wir bestätigen, dass **Benzi** nur gegenüber von  $O^6$ -alkyliertem Guanin, nicht aber gegenüber von natürlichen Basen eingebaut wird. Weiter konnten wir mit dem Marker Nukleotid **BenziTP** und der *KTqM747K* DNA Polymerase erfolgreich DNS mit  $O^6$ -MeG- und  $O^6$ -CMG-Addukten linear vervielfältigen. In Reaktionen mit dem  $O^6$ -MeG-Templat wurde jedoch auch ohne Zugabe von **BenziTP** ein amplifiziertes Extensionsprodukt von voller Länge generiert. Mit einer alternativen

Vorgehensweise konnten wir  $O^6$ -MeG- und  $O^6$ -CMG-Addukte in Mischungen von alkylierter und unmodifizierter DNS nachweisen. Der Nachweis gelang konzentrationsabhängig bis zu 10-facher Verdünnung.

*Kapitel 4* beinhaltet eine Zusammenfassung und kritische Diskussion der Forschungsergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit. Die Grenzen der Entwicklungen werden aufgezeigt sowie mögliche zukünftige Experimente vorgeschlagen. In *Appendix A* werden die zwei nicht-natürlichen Nukleotide **BIMTP** und **BenziTP** als Substrat für die menschliche Polymerase  $\eta$  in der DNS Replikation von cysplatinierter DNS untersucht. Beide Nukleotide wurden zwar eingebaut, blockierten aber die weitere Extension durch die Polymerase. Diese Ergebnisse zeigen das Potential von synthetischen Nukleotiden als Inhibitoren von Polymerasen für die Entwicklung von neuen Medikamenten zur Vermeidung von Resistenzen in der Krebstherapie auf.

In *Appendix B* werden Untersuchungen von synthetischen Nukleosiden zur spezifischen Basenpaarung mit  $O^6$ -alkylG-Addukten als DNS Hybridisierungsproben beschrieben. In thermodynamischen Schmelzexperimenten konnten wir zeigen, dass zwei strukturell verlängerte Versionen von **BIM** und **Benzi** stabilere DNS Duplexe bilden, wenn sie im Vergleich zu unmodifiziertem Guanin, gegenüber von  $O^6$ -alkylG liegen. Die erhöhte Selektivität zur Stabilisierung von alkylierter DNA machen diese zwei synthetischen Nukleotide zu interessanten Kandidaten als DNS Hybridisierungsproben für die sequenzspezifische Detektion von  $O^6$ -alkylG-Addukten in Genen.

Zusammengefasst wurden in der vorliegenden Doktorarbeit wichtige Grundlagen für die weitere Entwicklung zur Lokalisierung von DNS Addukten erreicht. Zum ersten Mal konnte ein nicht-natürliches Nukleotid von einer DNS Polymerase spezifisch gegenüber eines DNS Adduktes eingebaut werden. Dies ermöglichte die vollständige Replikation von beschädigten DNS Templaten. Die Kombination einer gentechnisch veränderten DNS Polymerase und einem nicht-natürlichen Marker Nukleotid ermöglichte erstmals die lineare Amplifikation von alkylierter DNS. Wir entwickelten eine Möglichkeit um  $O^6$ -alkylG-Addukte konzentrationsabhängig in Mischungen von alkylierter und unmodifizierter DNS zu bestimmen. Diese Resultate sind eine wichtige Grundlage für die weitere Entwicklung von Technologien, welche auf einer Amplifikation basieren und gentechnisch veränderte Polymerasen mit synthetischen Marker Nukleotiden kombinieren.