

Die photochemische Untersuchung verschiedener DNA-Strukturen

Yan Xu und Hiroshi Sugiyama*

Stichwörter:

DNA · DNA-Strukturen · Photochemie ·
Uracil · Wasserstoffabstraktion

Den verschiedenen Konformationen der DNA – den A-, B- und Z-Formen, dem proteininduzierten DNA-Knick und der G-Quartett-Struktur – werden bedeutende Rollen in biologischen Prozessen zugeschrieben, etwa bei der DNA-Replikation, der Genexpression und -regulierung und der Reparatur beschädigter DNA. Die Untersuchung von lokalen DNA-Konformationsänderungen bei biologischen Vorgängen ist daher für die Aufklärung der Funktion von DNA unumgänglich. In diesem Kurzaufsatz beschreiben wir die Anwendung der photochemischen Dehalogenierung von 5-Halogenuracil-derivatisierter DNA zur Untersuchung von DNA-Strukturen. Die Wasserstoffabstraktion durch das Uracil-5-yl-Radikal verläuft atomspezifisch und wird stark von der DNA-Struktur bestimmt. Infolgedessen könnte diese photochemische Methode bei der Untersuchung von DNA-Konformationen in lebenden Zellen zum Einsatz kommen.

1. Einleitung

Polymorphe DNA existiert in einer Vielfalt von verschiedenen Konformationen.^[1] Duplex-DNA kann in einer Reihe von sequenzabhängigen Sekundärstrukturen vorliegen, die von der üblichen rechtsgängigen B-Form bis zur links-gängigen Z-Form reichen.^[2,3] Triplex- und Tetraplex-DNA-Strukturen sind ebenfalls bekannt.^[3–5] Abbildung 1 zeigt die charakteristischen Unterschiede der verschiedenen DNA-Strukturen: der A-, B- und Z-Formen, des durch ein Protein induzierten DNA-Knicks und der G-Quartett-Struktur. Diese Konformationen sind vermutlich entscheidend für biologische Prozesse wie DNA-Replikation, Genexpression und -regulierung oder die Reparatur beschädigter DNA.^[6,7] Zum Beispiel schützt die DNA menschlicher Telomere, die G-Quartett(Quadruplex)-Strukturen bildet, Zellen vor Rekombination und Abbau.^[7,8] Wird die Wirkung der Telomere gestört, so kommt es schließlich zum Zelltod; dies kann the-

rapeutisch zur Krebsbehandlung genutzt werden.^[8–14] Kürzlich untersuchten Rich und Mitarbeiter die biologische Bedeutung der Z-DNA näher und berichteten, dass die Doppelstrang-RNA-abhängige Adenosin-Desaminase (ADAR1), das tumorassoziierte Protein DLM-1 und das Protein E3L

des Vaccinia-Virus spezifisch an die Z-Form der DNA binden.^[6] Weiterhin haben Liu et al. den Beweis dafür geliefert, dass die Z-DNA bildenden Sequenzen für die Chromatin-abhängige Aktivierung des Promotors CSF1 (colony-stimulating factor 1) notwendig sind.^[15] Neben der Funktion der DNA-Struktur selbst, induziert die Bindung eines Transkriptionsfaktors, wie eines TATA-Box bindenden Proteins, eine deutliche Biegung der DNA, die als Voraussetzung für die Transkription betrachtet wird.^[16–22] Aus diesen Gründen ist die Untersuchung der lokalen Konformationsänderungen von DNA bei biologischen Prozessen für das Verständnis der DNA-Funktion unerlässlich.

Methoden wie Röntgenkristallstrukturanalyse^[23] und NMR-Spektroskopie^[24,25] liefern Daten mit atomarer Auflösung zur DNA-Struktur. Auch Circular dichroismus und Raman-Spektroskopie können zur Untersuchung von DNA-Strukturen herangezogen werden. Diese Methoden arbeiten mit DNA-Modellsystemen wie synthetischen Oligonucleotiden oder Homopolymeren, sie liefern jedoch keine Informationen zu lokalen Konformationsänderungen, sondern nur zur durchschnittlichen Konformation in einer Probe. Darüber hinaus können diese Verfahren nicht zur direkten Untersuchung lokaler DNA-Strukturen in lebenden Zellen eingesetzt werden. Verschiedene chemische Sonden und Antikörper wurden entwickelt, diese Methoden erfordern jedoch in der Regel die Isolierung der DNA aus dem Zellkern.

[*] Dr. Y. Xu, Prof. H. Sugiyama
Department of Chemistry
Graduate School of Science
Kyoto University, Kitashirakawa-Oiwakecho
Sakyo, Kyoto, 606-8502 (Japan)
und
SORST (Japan) Science and Technology Corporation
Fax: (+81) 757-533-670
E-mail: hs@kuchem.kyoto-u.ac.jp

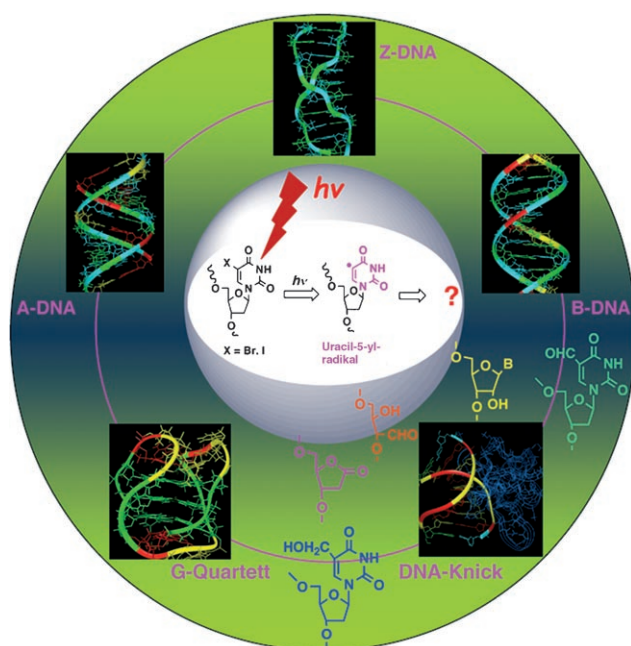


Abbildung 1. Strukturabhängige, atomspezifische Wasserstoffabstraktion in verschiedenen lokalen DNA-Strukturen durch das Uracyl-Radikal, das aus 5-Halogenuracil unter UV-Bestrahlung gebildet wird.

Licht einer geeigneten Wellenlänge kann durch Fokussierung auf eine bestimmte Stelle in eine Zelle eindringen. Da DNA in der Zelle vermutlich sehr schnell ihre Konformation ändert, wäre eine Methode von großem Nutzen, die auf der DNA-Photoreaktion beruht und die DNA-Konformation in vivo fixieren kann. Die Produkte der Photoreaktion sollten Aufschluss geben über lokale Konformationsänderungen in bestimmten DNA-Sequenzen während der Bestrahlung. In diesem Kurzaufsatz beschreiben wir die Photoreaktivitäten von 5-Halogenuracil in fünf charakteristischen lokalen DNA-Strukturen: den A-, B- und Z-Formen, dem proteininduzierten DNA-Knick und der G-Quartett-Struktur (Abbildung 1). Die Wasserstoffabstraktion in DNA durch ein Uracyl-5-yl-Radikal, das durch UV-Bestrahlung der 5-Halogenuracil-Einheit entsteht, verläuft atom-spezifisch und hängt stark von der DNA-Struktur ab. Diese photochemische Methode gibt die Struktur der DNA wieder, und daher könnte sie zur Untersuchung von DNA-Konformationen in lebenden Zellen eingesetzt werden.

2. Konkurrierende 1'- und 2'-α-Wasserstoffabstraktion durch das Uracyl-Radikal in B-DNA

Thymin (T) kann in DNA durch 5-Halogenuracil ($^{\text{Br}}$ U oder $^{\text{I}}$ U) ersetzt werden, wobei die Funktion der resultierenden 5-Halogenuracil-substituierten DNA in vivo erhalten bleibt. Der Einbau von 5-Halogenuracil steigert die Lichtempfindlichkeit der Zelle hinsichtlich DNA-Protein-Vernetzung, DNA-Strangbrüchen und der Erzeugung von basenlabilen Stellen durch die Bildung von Uracyl-Radikalen bei Bestrahlung.^[26–29] Daher gingen wir davon aus, dass die Photoreaktivität von 5-Halogenuracil zur Untersuchung der lokalen Konformation von DNA dienen kann. Wir begannen unser Projekt zur Aufklärung der Struktur von DNA-Läsionen mit der genauen Analyse der Produkte nach Bestrahlung von 5-Halogenuracil-substituierten Hexanucleotiden. Die Bestrahlung der selbstkomplementären B-Duplexe d(GCA $^{\text{Br}}$ UGC)₂ und d(GCA $^{\text{I}}$ UGC)₂ führte unter Freisetzung von Adenin zu Desoxyribonolacton **1** als C1'-Oxidationsprodukt und zum hexameren Produkt **2** mit einer Erythrose-Einheit als C2'-Oxidationsprodukt (Schema 1).^[27–29] Durch die Verwendung eines Oligonucleotids, das an C2' des Desoxyribose-Rests stereospezifisch deuteriert war, identifizierten wir die Abstraktion des 2'-α-Wasserstoffatoms der Desoxyribose-Einheit durch das Uracyl-Radikal als den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Bildung des C2'-Oxidationsprodukts **2**.^[29] Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass das Uracyl-Radikal sowohl das 1'- als auch das 2'-α-Wasserstoffatom der Desoxyribose-Einheit am Adenin auf der 5'-Seite abspalten kann.

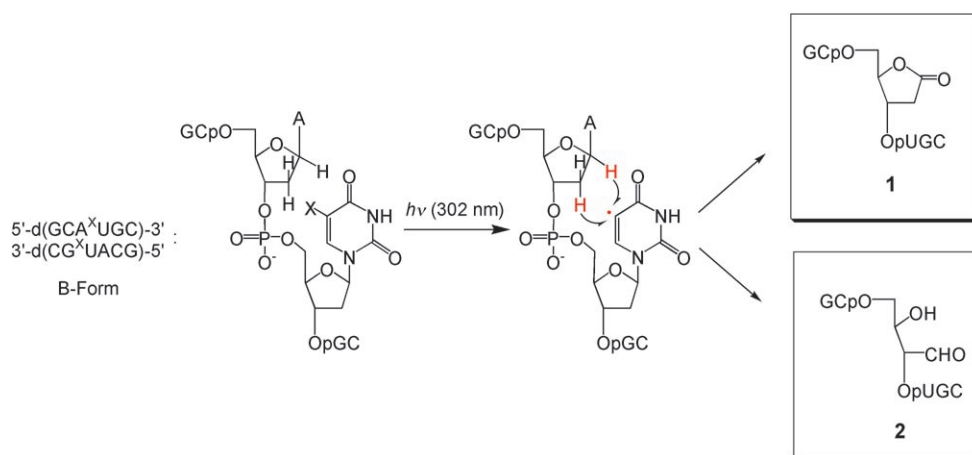
Während die Bestrahlung von d(GCA $^{\text{Br}}$ UGC)₂ zur effizienten Bildung der C1'- und C2'-Oxidationsprodukte führte, zeigten Hexanucleotide ohne A $^{\text{Br}}$ U-Sequenz, wie 5'-d(GCG $^{\text{Br}}$ UCG)-3'/5'-d(CGACGC)-3', eine geringe Photoreaktivität. Aufgrund dieser Ergebnisse stellten wir zunächst einen Mechanismus auf, bei dem ein sequenzspezifischer Elektronentransfer vom benachbarten Adenin-Rest an der 5'-Seite zum $^{\text{Br}}$ U in der Duplex-Struktur ein $^{\text{Br}}$ U-Radikalanion erzeugt, das durch Eliminierung des Bromid-Ions ein Uracyl-Radikal bildet. Dieses Radikal spaltet dann das C1'-Wasserstoffatom des Desoxyadenosins ab. Die anschließende Oxidation des C1'-Radikals durch das Adenin-Radikalkation führt über ein C1'-Kation zum Ribonolacton. Diese Selektivität wurde von einer anderen Forschergruppe bestätigt.^[30] Da jedoch Guanin als Nucleobase stärker elektronenschie-



Hiroshi Sugiyama promovierte 1984 bei Teruo Matuura an der Universität Kyoto. Nach einem Postdoktorat an der Universität von Virginia bei Sidney M. Hecht wurde er, ebenfalls in Kyoto, 1986 zum Dozenten und 1993 zum Associate Professor berufen. Im Jahre 1996 erhielt er eine Position am Institute of Biomaterials and Bioengineering an der Tokyo Medical and Dental University, und seit 2003 ist er Professor für Chemische Biologie in Kyoto. Seine Auszeichnungen umfassen den Nippon IBM Award und den Preis der Japanischen Chemischen Gesellschaft für kreative Arbeiten.



Yan Xu studierte Chemie an der Liaoning University of Petroleum and Chemical Technology (China). Im Jahre 2004 promovierte er bei Prof. Hiroshi Sugiyama an der Tokyo Medical and Dental University über die Stabilisierung von Z-DNA durch nichtnatürliche Aminosäuren und kleine Moleküle sowie photochemische Methoden zur Untersuchung von G-Quartetten. Als wissenschaftlicher Mitarbeiter (Japan Science and Technology Fellow) in der Gruppe von Prof. H. Sugiyama befasst er sich gegenwärtig mit der Struktur und Funktion von DNA.



Schema 1. Konkurrierende Wasserstoffabstraktion an den C1'- und C2'-Positionen in B-DNA. X = Br, I; G = Guanin, C = Cytosin, A = Adenin, U = Uracil.

bend wirkt, sprach man von einer „kontra-thermodynamischen“ Reaktion („contrathermodynamic reaction“).^[30] Kürzlich wurde ^{Br}U als molekulare Sonde für den Überschusselektronentransfer eingesetzt.^[31] Wir untersuchten den Elektronentransfer entlang der DNA unter Verwendung von DNA, die einheitlich mit 5-Halogenuracil substituiert war.^[32] Durch PCR erhielten wir 450-bp-DNA-Fragmente, in denen alle Thymin-Reste gegen ^{Br}U oder $^I U$ ausgetauscht waren. Die DNA-Fragmente wurden mit monochromatischem UV-Licht ($\lambda = 302\text{ nm}$) bestrahlt und dann auf Sequenzgelen analysiert. Überraschenderweise wurden erst nach Hitzebehandlung spezifische Spaltungen an den 5'-(G/C)AA X U X U-3'- und 5'-(G/C)A X U X U-3'-Sequenzen der ^{Br}U - und $^I U$ -DNA-Fragmente beobachtet. Die HPLC-Analyse der Oligonucleotid-Produkte ergab, dass Ribonolacton-haltige Octamere als Hauptprodukte entstanden waren. Bei Bestrahlung der Oligonucleotide in $H_2^{18}O$ wurden ^{18}O -Atome in den Ribonolacton-Teil eingebaut, was beweist, dass das Carbonyl-Sauerstoffatom von Ribonolacton aus H_2O stammt. Ausgehend von diesen Beobachtungen schlugen wir einen möglichen Mechanismus für die Photoreaktionen an 5'-GAA X U X U-3'-Sequenzen vor (Abbildung 2).

Dieser Mechanismus beginnt mit dem Elektronentransfer vom Guanin durch gestapelte AA- und A-Einheiten zum elektronenarmen $^XU^XU$ -Abschnitt.^[33] Die Freisetzung des Halogenid-Ions aus dem $^XU^XU$ -Radikalanion führt zu Uracyl-Radikalen, die das Wasserstoffatom am C1' der Adenosin-Einheit neben dem $^XU^XU$ -Abschnitt abspalten. Die Einelektronenoxidation des C1'-Radikals von Desoxyadenosin (dA) durch das Guanin-Radikalkation regeneriert Guanin und führt zu einem C1'-Kation. Die Adeninbasen zwischen Guanin und dem $^XU^XU$ -Abschnitt bilden in diesem Modell eine Brücke zwischen dem Elektronendonator Guanin und dem Elektronenacceptor $^XU^XU$, die durch Ladungstrennung

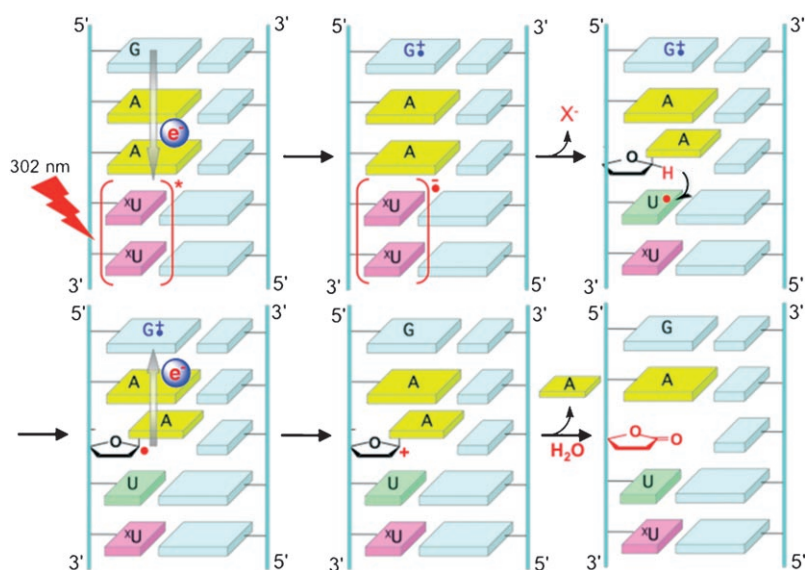


Abbildung 2. Vorgeschlagener Mechanismus für die photochemische Reaktion an 5'-(G/C)AA X U X U-3'-Sequenzen.

einem schnellen Elektronenrücktransfer vorbeugt. Die zuvor beobachtete Sequenzspezifität für A ^{Br}U kann dadurch erklärt werden, dass Adenin dieselbe Rolle spielt.

3. Selektive 1'-Wasserstoffabstraktion in A-DNA

Nach der Photoreaktion des DNA-RNA-Hybrids 5'-d-(CGA I UGC)-3'/5'-r(GCAUGC)-3', das die A-Struktur annimmt, zeigte eine Analyse des Lysats, dass **1** durch selektive 1'-Oxidation unter Freisetzung von Adenin als ein Hauptprodukt entstanden war (Abbildung 3a).^[34] Ähnliche Ergebnisse wurden für ^{Br}U -substituierte DNA-RNA-Hybride und DNA-Oligomere erhalten.^[28,29,34] 1H -NMR-NOE-Experimente mit 5'-d(CGAUGC)-3'/5'-r(GCAUGC)-3' und 5'-d(CGAUGC)-3'/5'-d(GCATCG)-3' deuten darauf hin, dass zwischen den Abständen und der Selektivität der Wasserstoffabstraktion kein Zusammenhang besteht. Um die se-

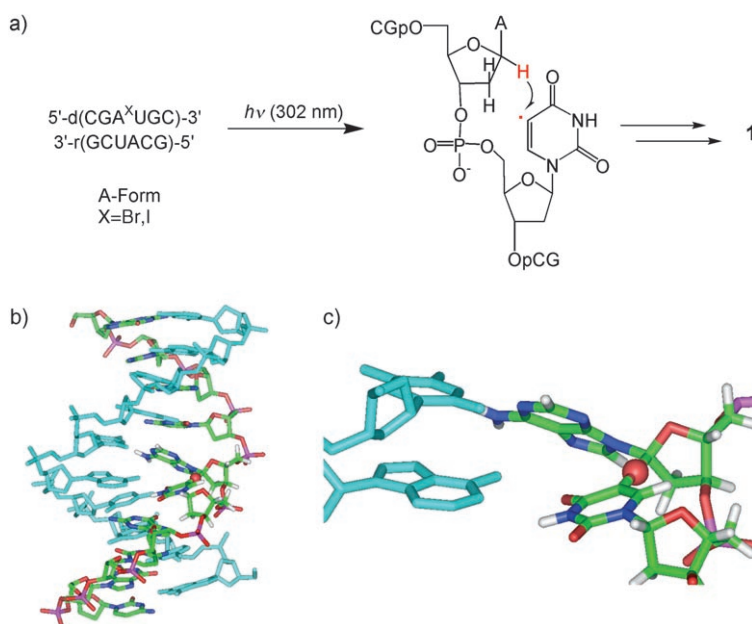


Abbildung 3. a) Photochemische Produkte der Hexanucleotide in DNA-RNA-Hybriden mit A-Struktur durch selektive 1'-Wasserstoffabstraktion nach Bestrahlung mit UV-Licht. b) Die Struktur des AU-Abschnitts für ein energieminiertes Octamer stellt den Übergangszustand für die C1'-Wasserstoffabstraktion im DNA-RNA-Hybrid dar. c) Vergrößerte Ansicht eines AU-Abschnitts.

lektive Wasserstoffabstraktion zu erklären, wurden mögliche Übergangszustände für den Vorgang in einem DNA-Duplex und einem DNA-RNA-Hybrid aufgestellt, und es wurde berechnet, wieviel Konformationsenergie zum Erreichen dieses Übergangszustands benötigt wird.^[34] Ein neuer Parametersatz für den Übergangszustand der Wasserstoffabstraktion für das AMBER-Kraftfeld wurden mithilfe von Ab-initio-Molekülorbitalrechnungen der Wasserstoffabstraktion in Ethanol durch Vinylradikale entwickelt. Im DNA-RNA-Hybrid hatte der C1'-Übergangszustand die niedrigste Energie, was die beobachtete C1'-Selektivität erklärt. Abbildung 3b zeigt die berechnete Struktur des AU-Abschnitts, der den möglichen Übergangszustand der C1'-Wasserstoffabstraktion im DNA-RNA-Hybrid enthält. Anders als bei der A-Form, bei der das C1'-Radikal stärker stabilisiert ist als das C2'-Radikal, sind die C1'- und C2'-Radikale der B-Form energetisch ungefähr gleich.^[29] Dies könnte erklären, warum die Wasserstoffabstraktionen an C1' und C2' konkurrierende Prozesse sind. Obgleich eine genauere Beschreibung der Wasserstoffabstraktion dynamische Eigenschaften der betreffenden Nucleinsäuren einschließen sollte, bieten die Ergebnisse eine qualitative Erklärung für die konformationsabhängige Wasserstoffabstraktion durch das Uracil-5-yl-Radikal in einem DNA-Duplex und einem DNA-RNA-Hybrid.

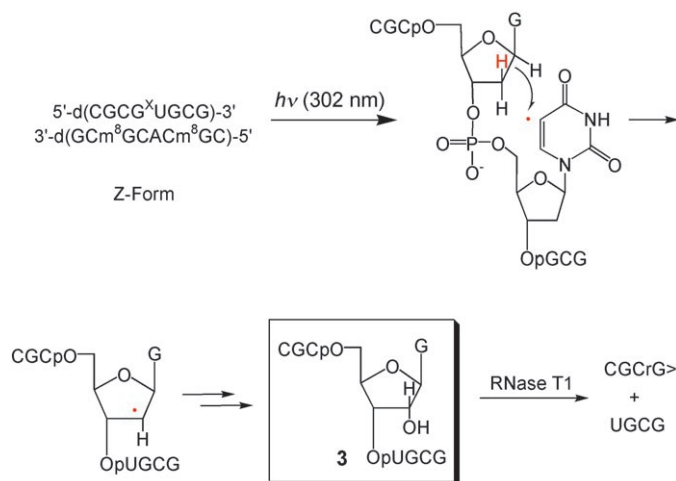
In einem Monomermodell lieferte die Reaktion des 2'-Desoxyuridin-1'-yl-Radikals mit molekularem Sauerstoff das Peroxyl-Intermediat, das schließlich über das C1'-Kation zur Bildung des 2'-Desoxyribonolactons führte.^[35–37] Es steht noch nicht fest, woher das Sauerstoffatom des Ribonolactons in A-DNA stammt, wahrscheinlich ist aber das Peroxyl-Intermediat an der Bildung des 2'-Desoxyribonolactons beteiligt.

4. Stereospezifische 2'- α -Hydroxylierung in Z-DNA

Die Z-Form ist eine der charakteristischen lokalen DNA-Strukturen, die durch Röntgenkristallographie aufgeklärt wurden; sie wurde hinsichtlich Transkription,^[38,39] Methylierung von Cytosin^[40] und Überspiralisierung^[41–43] ausgiebig untersucht. Die biologische Bedeutung von Z-DNA wurde jedoch noch nicht vollständig erfasst, was vermutlich auf ihrer kurzen Lebensdauer unter Torsionsspannung durch das Entwinden des Doppelstranges während der Transkription beruht. Um die Wasserstoffabstraktion durch das Uracilyl-Radikal in Z-DNA zu untersuchen, müssen zunächst bei physiologischen Salzkonzentrationen stabile Z-Oligonucleotide experimentell zugänglich gemacht werden. Beispielsweise verbleibt das Duplex-Desoxyoctadecamer d(Gm⁵C)₄A^{Br}U(Gm⁵C)₄, das in der Mitte einen A^{Br}U-Abschnitt aufweist, selbst in einer 4 M NaCl-Lösung in der typischen B-Form. Verschiedene modifizierte Guanin-Einheiten wurden in die Duplex-Nucleotide eingebaut, um ihre Fähigkeit zur Stabilisierung von Z-DNA zu prüfen. In dieser Hinsicht erwies sich der Einbau von 8-Methyl-2'-desoxyguanosin (m⁸G)^[44] und 8-Methylguanosin (m⁸rG)^[45] als besonders wirksam. Die Entwicklung des monomeren Z-Stabilisators er-

möglichte die Aufklärung der photochemischen Reaktion von ¹U in Z-DNA. Wir stellten fest, dass bei UV-Bestrahlung ($\lambda = 302$ nm) des Ioduracil-substituierten Z-DNA-Duplex 5'-d(CGCG¹UGCG)-3'/5'-d(Cm⁸GCACm⁸GCG)-3' eine 2'- α -Hydroxylierung stattfand (Schema 2).^[46] Die stereospezifische 2' β -Wasserstoffabstraktion, die zur 2'- α -Hydroxylierung und zum Produkt **3** führte, wurde mithilfe eines stereospezifisch deuterierten Octanucleotids in Z-DNA nachgewiesen. Da die 2'- α -Hydroxylierungsstelle in der DNA leicht durch Ribonuclease T1 hydrolysiert wird, eignet sich eine Folge aus photochemischer Hydroxylierung und enzymatischer Hydrolyse für den Nachweis von Z-DNA-Regionen (Schema 2).

Rich und Mitarbeiter berichteten kürzlich, dass verschiedene Proteine, einschließlich der ubiquitären Doppelstrang-RNA-abhängigen Adenosin-Desaminase (ADAR1), spezifisch an Z-DNA binden.^[47,48] Die hohe Affinität gegenüber Z-DNA geht dabei auf die Bindung von Z α , dem NH₂-Terminus von ADAR1, zurück.^[49] Wir untersuchten die photochemische Reaktion einer derart Z α -induzierten Z-DNA: Die 2'- α -Hydroxylierung erfolgte stereospezifisch an der 5'-Seite von ¹U. In der Röntgenkristallstrukturanalyse des Z α -d(CGCGCG)₂-Komplexes ist das C2' β -Wasserstoffatom der Desoxyribose am Guanin an der 5'-Seite in unmittelbarer Nähe zum Uracilyl-Radikal positioniert, während die C1'- und C2'- α -Wasserstoffatome weit entfernt von der C5-Position des Uracilrests stehen (Abbildung 4).^[49] Abbildung 4c zeigt die berechnete Struktur des G^{Br}U-Abschnitts, der den angenommenen Übergangszustand der C2' β -Wasserstoffabstraktion in Z-DNA einschließt. Das fest in der Z-DNA eingeschlossene Z α (der C3'-endo-Zucker faltet das Guanin des Duplex) fördert folglich die spezifische C2' β -Wasserstoffab-



Schema 2. Bestrahlung von d(CGCG^XUGCG)/d(Cm⁸GCACm⁸GC) mit UV-Licht in Gegenwart von Zα (2 Äquiv. bezogen auf DNA). Die spezifische 2'-Wasserstoffabstraktion führt zur 2'-α-Hydroxylierung, an die sich der enzymatische Verdau des hydroxylierten Produkts mit Ribonuclease T1 anschließt. X = Br, I.

straktion durch das Uracyl-Radikal und schließt damit die Oxidation an C1' und C2' aus.

5. Stranginterne Wasserstoffabstraktion an der 5-Methylgruppe von Thymin in proteininduzierten DNA-Knicken

In den vergangenen zehn Jahren wurden aus den Kristallstrukturen vieler DNA-Protein-Komplexe neue Erkenntnisse über DNA-Protein-Wechselwirkungen gewonnen. In einigen Fällen verursacht die Bindung eines Proteins in der DNA deutliche Konformationsänderungen, denen man eine große biologische Bedeutung zuschreibt.^[17–22] Beispielsweise induziert das TATA-Box bindende Protein eine Biegung der DNA, die erforderlich ist, um die Transkription auszulösen. Um den proteininduzierten DNA-Knick nachzuweisen, wurde die Photoreaktion der 5-Halogenuracil-substituierten DNA in Gegenwart von Sso7d untersucht. Sso7d ist ein thermisch und chemisch stabiles chromosomales Protein aus dem hyperthermophilen Archaeabakterium *Sulfolobus solfataricus*. Die Kristallstruktur des Komplexes aus Sso7d und d(GTAATTAC)₂ wurde mit hoher Auflösung ermittelt.^[50] Das Protein bindet in der kleinen Furche und verursacht durch Intercalation der hydrophoben Seitenketten von Val26 und Met29 einen 60°-Knick am TpT-Abschnitt. Die Bestrahlung von d(GTAAT^IUAC)₂ ohne Sso7d erzeugte 1'- und 2'-Oxidationsprodukte und entsprach damit früheren Beobachtungen zur B-DNA. In Gegenwart von Sso7d wurde die Bildung der beiden neuen Produkte **4** und **5** nachgewiesen (Schema 3).^[51] Diese Ergebnisse machen deutlich, dass der proteininduzierte DNA-Knick eine Wasserstoffabstraktion an der 5-Methylgruppe von Thymin im selben Strang verursacht. Einer Kristallstrukturanalyse zufolge steht die 5-Methylgruppe von Thymin in der Nähe des Uracyl-Radikals, während sich die T5-1'- und T5-2'-Wasserstoffatome weit

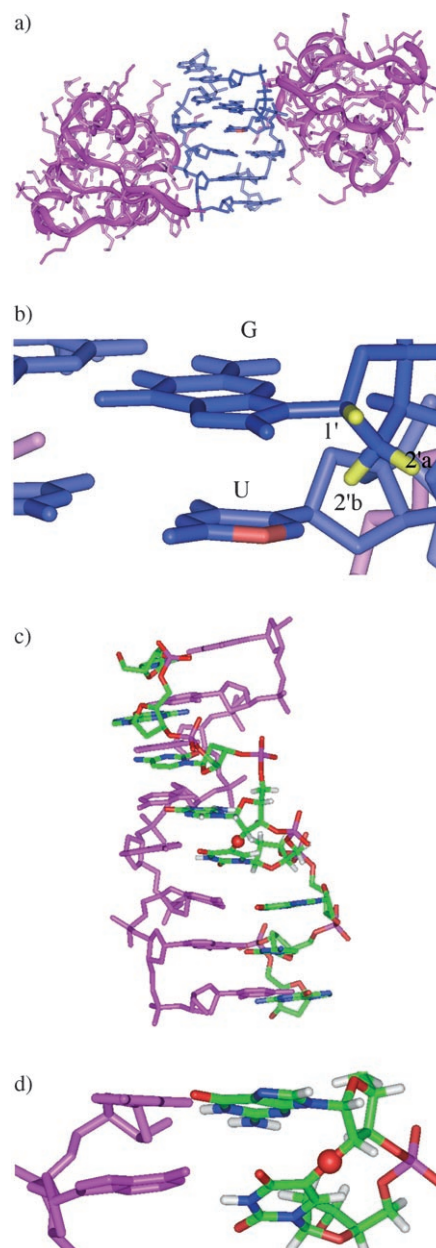
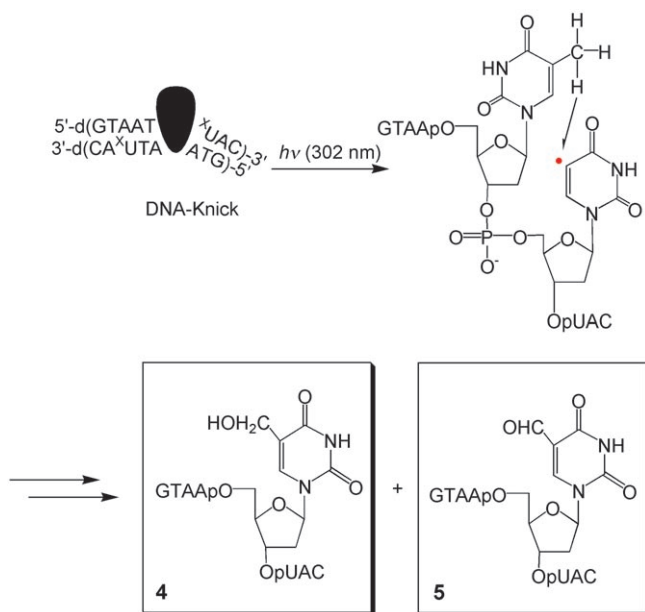


Abbildung 4. a) Kristallstruktur des Zα-d(CGCGCG)₂-Komplexes und b) eine vergrößerte Ansicht einer 5'-GC-3'-Region. Das Kohlenstoffatom in 5-Position von Uracil ist rot und die abspaltbaren Wasserstoffatome der Desoxyribose in Guanotin sind gelb dargestellt. c) Der G^BU-Abschnitt einer energieminierten Z-DNA-Struktur zeigt den postulierten Übergangszustand der C2'-Wasserstoffabstraktion.

enfernt vom benachbarten Uracyl-Radikal befinden (Abbildung 5). Wir folgern daraus, dass die ungewöhnliche stranginterne Wasserstoffabstraktion am T5-Me durch das Radikal genau an der strukturanalytisch lokalisierten Biegestelle erfolgte.^[51] Diese spezifische stranginterne Wasserstoffabstraktion an einer Methylgruppe bietet eine effiziente Methode zur direkten Detektion von DNA-Knicken in Lösung.

Die HPLC-Analyse des bestrahlten d(GTAAT^IUAC)₂-Sso7d-Komplexes zeigte ebenfalls, dass das Protein Sso7d zu Sso7dOH oxidiert wurde. Durch Umsetzung mit Lysyl-En-



Schema 3. Bestrahlung von $(\text{GTAAT}^{\text{T}}\text{UAC})_2\text{-Sso7d}$ mit UV-Licht. Die Bildung neuer Produkte weist auf eine stranginterne Wasserstoffabstraktion an der 5-Methylgruppe von Thymin hin.

dopeptidase erfolgte die Oxidation hauptsächlich zwischen den Einheiten 29 und 40 (78 %). Die Position der oxidierten Aminosäurereste im Fragment 29–40 wurde durch „Post-source-decay“-Massenspektrometrie (PSD-MS/MS) ermittelt (Abbildung 6). Während in beiden Fällen das Fragment y11 erhalten wurde, fand man nach der Oxidation das Fragment b2 anstelle des unveränderten Fragments 29–40. Es findet also eine spezifische Photooxidation des $\text{d}(\text{GTAAT}^{\text{T}}\text{UAC})_2\text{-Sso7d}$ -Komplexes an Met29 statt. Aus der Röntgenkristallstruktur wird ersichtlich, dass sich der Met29-Rest in der Nähe des Uracyl-Radikals befindet, das in die große Furche an der Biegungsstelle intercaliert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Wechselwirkungen zwischen DNA und Sso7d in Lösung und im Kristall im Wesentlichen gleich sind.

6. Hoch effiziente photochemische Bildung von 2'-Desoxyribonolacton im antiparallelen G-Quartett

DNA-Tetraplexe (DNA-Quadruplex, G-Quartette) sind viersträngige Strukturen aus guaninreichen DNA-Sequenzen.^[52–54] Auch wenn G-Quartette bisher nur in vitro untersucht wurden, steigt das Interesse wegen ihrer möglichen Beteiligung an biologischen Prozessen. Die DNA der menschlichen Telomere besteht aus wiederholten Einheiten mit TTAGGG-Nucleotidsequenz und endet in einem einzelsträngigen Abschnitt, der am Ende der doppelsträngigen DNA-Helix überhängt. Die einzelsträngigen Wiederholungseinheiten können viersträngige G-Quartett-Strukturen bilden.^[55–57] Eine NMR-spektroskopische Analyse zeigte, dass ein 22-mer von 5'-d[AGGG(TTAGGG)₃]-3' in Lösung in Gegenwart von Na⁺-Ionen eine antiparallele G-Quartett-Struktur annimmt. In dieser Struktur sind die gegenüberlie-

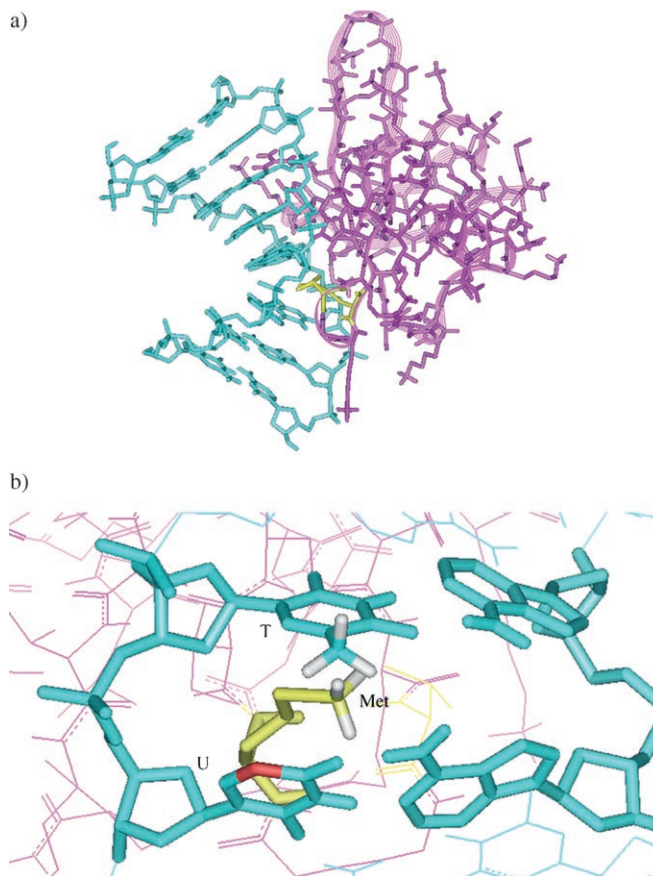


Abbildung 5. a) Kristallstruktur des bestrahlten $\text{Sso7d-d}(\text{GTAAT}^{\text{T}}\text{UAC})_2$ -Komplexes und b) eine vergrößerte Ansicht des Reaktionszentrums. In (a) sind die intercalierten Met29- und Val26-Einheiten gelb dargestellt; in (b) sind die Einheiten U6 und T5 von $\text{d}(\text{GTAATUAC})_2$ blau, das Kohlenstoffatom in 5-Position von U6 ist rot und die vermutlich absplaltbaren Wasserstoffatome von Thymin sind weiß dargestellt.



Abbildung 6. Sequenz des Fragments 29–40 von Sso7d. Nach der Oxidation fand man das Fragment b2 anstelle des unveränderten Fragments 29–40; das Fragment y11 wurde ohne Modifikation ebenso erhalten wie nach der Oxidation.

genden GGG-Stränge antiparallel, und die TTA-Einheiten bilden eine diagonale und zwei seitliche Schleifen (Abbildung 7).^[58] In einem Kristall, der in Gegenwart von K⁺-Ionen gezüchtet wurde, nimmt dasselbe 22-mer dagegen eine andere Struktur ein: Hier sind vier parallele GGG-Einheiten durch drei Schleifen an der Außenseite des G-Quartetts verbunden.^[59]

Zur Untersuchung der strukturabhängigen Abstraktion von Wasserstoffatomen in parallelen und antiparallelen G-Quartett-Strukturen wurden sechs Oligodesoxynucleotide

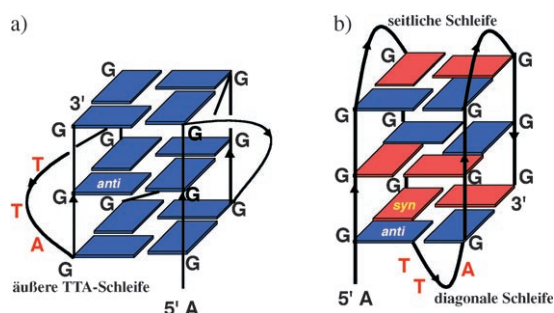


Abbildung 7. Gefaltete Strukturen von $[AG_3(T_2AG_3)_3]$: a) In der K^+ -stabilisierten Kristallstruktur umschließen äußere TTA-Schleifen die Seiten des G-Quartetts und die parallelen GGG-Stränge. b) Die Na^+ -stabilisierte Struktur in Lösung mit einer diagonalen und zwei seitlichen TTA-Einheiten.

(ODN 1–6) erhalten, indem jeweils eine der sechs Thymin-Einheiten in der 22-mer-DNA 5'-d(AGGGT₁T₂-AGGGT₃T₄AGGGT₅T₆AGGG)-3' der menschlichen Telomere gegen ¹U ausgetauscht wurde.^[60] Bei Bestrahlung mit UV-Licht reagierten über 60% des antiparallelen ODN 4, in dem ¹U anstelle von T₄ in der Mitte der diagonalen Schleife vorlag; die parallelen ODNs 1–6 zeigten dagegen unter denselben Bestrahlungsbedingungen keine Photoreaktion (<2%). Die Produktanalyse nach der Bestrahlung von ODN 4 im antiparallelen G-Quartett zeigte, dass 2'-Desoxyribonolacton unter Freisetzung von Thymin gebildet worden war (Abbildung 8).

Die große photochemische Reaktivität von ODN 4 im antiparallelen G-Quartett und seine schlechte Photoreaktivität in der parallelen Struktur kann durch Vergleich der Schleifen-Regionen der beiden Strukturen erklärt werden (Abbildung 9).^[58,59] Im parallelen G-Quartett schiebt sich eine Adenin-Base einer äußeren TTA-Schleife zwischen die beiden Thymin-Einheiten und verhindert so die Wasserstoffabstraktion. Eine solche Intercalation der Adenin-Base der diagonalen Schleife tritt in der antiparallelen G-Quartett-Struktur hingegen nicht auf, sodass die 1'-Wasserstoffabstraktion durch das Uracyl-Radikal in der Schleife möglich ist. Darüber hinaus haben NMR-Experimente gezeigt, dass das Uracyl-Radikal dem 1'-Wasserstoffatom des benach-

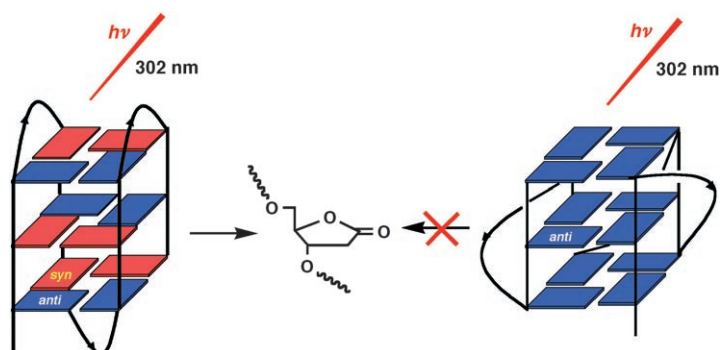
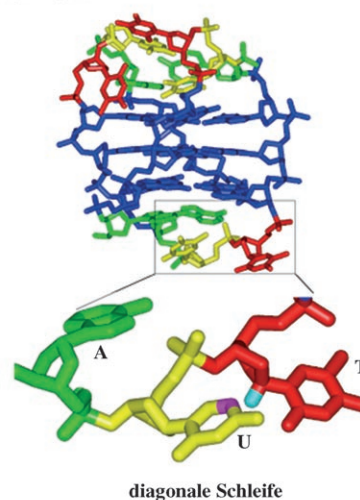


Abbildung 8. Das ¹U-Motiv in der diagonalen Schleife des antiparallelen G-Quartetts geht sehr leicht eine Photoreaktion zu einem 2'-Desoxyribonolacton ein. Im parallelen G-Quartett findet diese Reaktion dagegen nicht statt.

barten T₃ näher ist als den anderen Wasserstoffatomen in der diagonalen Schleife.

Auch für andere guaninreiche Sequenzen wird angenommen, dass ihre biologische Funktion auf der Bildung eines G-Quartetts beruht. So wurden G-Quartette mit der ortsspezifischen genetischen Rekombination in Immunglobulin(IgG)-Switch-Regionen, der Insulin-Gen-gebundenen polymorphen Region, dem Retinoblastom-Suszeptibilitäts-gen (Rb) und dem c-myc-Onkogen in Verbindung gebracht.^[61–64] Zahlreiche Sequenzen, die ein G-Quartett bilden könnten, wurden in vielen wichtigen Genen identifiziert.^[65] Das Sequenzmotiv für stranginterne G-Quartette kann als $G_nN_{m1}G_nN_{m2}G_nN_{m3}G_n$ dargestellt werden; darin ist n die

Na^+ -Form



K^+ -Form

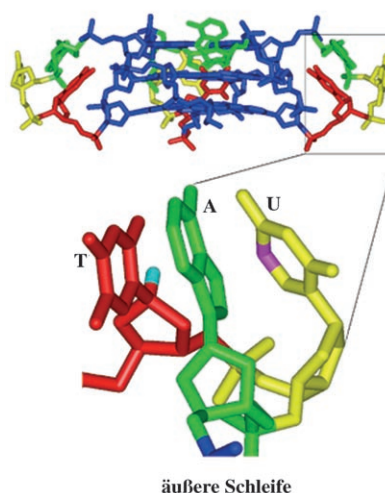


Abbildung 9. Struktur des bestrahlten Oligonucleotids d(AGGGT-TAGGGT¹UAGGGTTAGGG) entsprechend Röntgenkristallographie (ODN 4; K^+ -Form) und NMR-Experimenten (Na^+ -Form) sowie vergrößerte Ansichten der Schleifen-Regionen. Guanin-Einheiten sind blau, das Kohlenstoffatom C5 von Uracil ist violett, die abspaltbaren Wasserstoffatome von Thymin sind cyanblau, Thymin ist rot, Uracil gelb und Adenin grün dargestellt.

Anzahl der Guanin-Tetraden, und m_1 , m_2 und m_3 sind die Längen der Schleifen. Die diagonale Schleife (N_{m_2}) der antiparallelen Strukturen ist dem Sequenzmotiv gemeinsam (Abbildung 10a). Wir überprüften die photochemische Methode, indem wir die Photoreaktionen von ^1U -substituierten IgG-Switch-Regionen und 5'-Termini des Rb-Gens untersuchten.^[60] Nach der Bestrahlung von 5'-d(AGGG-GAGCTGGGG ^1U AGGTGGGA)-3' (IgG) und 5'-d(CGGGGGGT ^1U TGGGCGGC)-3' (Rb) bei $\lambda = 302\text{ nm}$ zeigte die HPLC-Analyse der Photolysate, dass es sich bei den Photoprodukten (ca. 90% Ausbeute) hauptsächlich um Oligomere handelte, die 2'-Desoxyribonolacton enthielten und unter Freisetzung von Guanin oder Thymin gebildet wurden. Diese effiziente Bildung von 2'-Desoxyribonolacton weist darauf hin, dass die guaninreichen Sequenzen in einer antiparallelen G-Quartett-Struktur mit einer diagonalen Schleife vorliegen. Abbildung 10b und c zeigen G-Quartett-Strukturen für IgG bzw. Rb mit zwei gestapelten Guanin-Tetraden und einer diagonalen Schleife aus vier Basen, wie sie entsprechend unseren photochemischen Untersuchungen aufgestellt werden können.

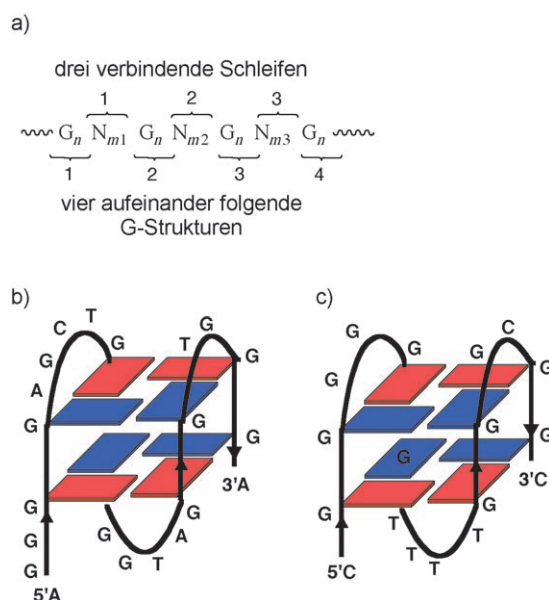
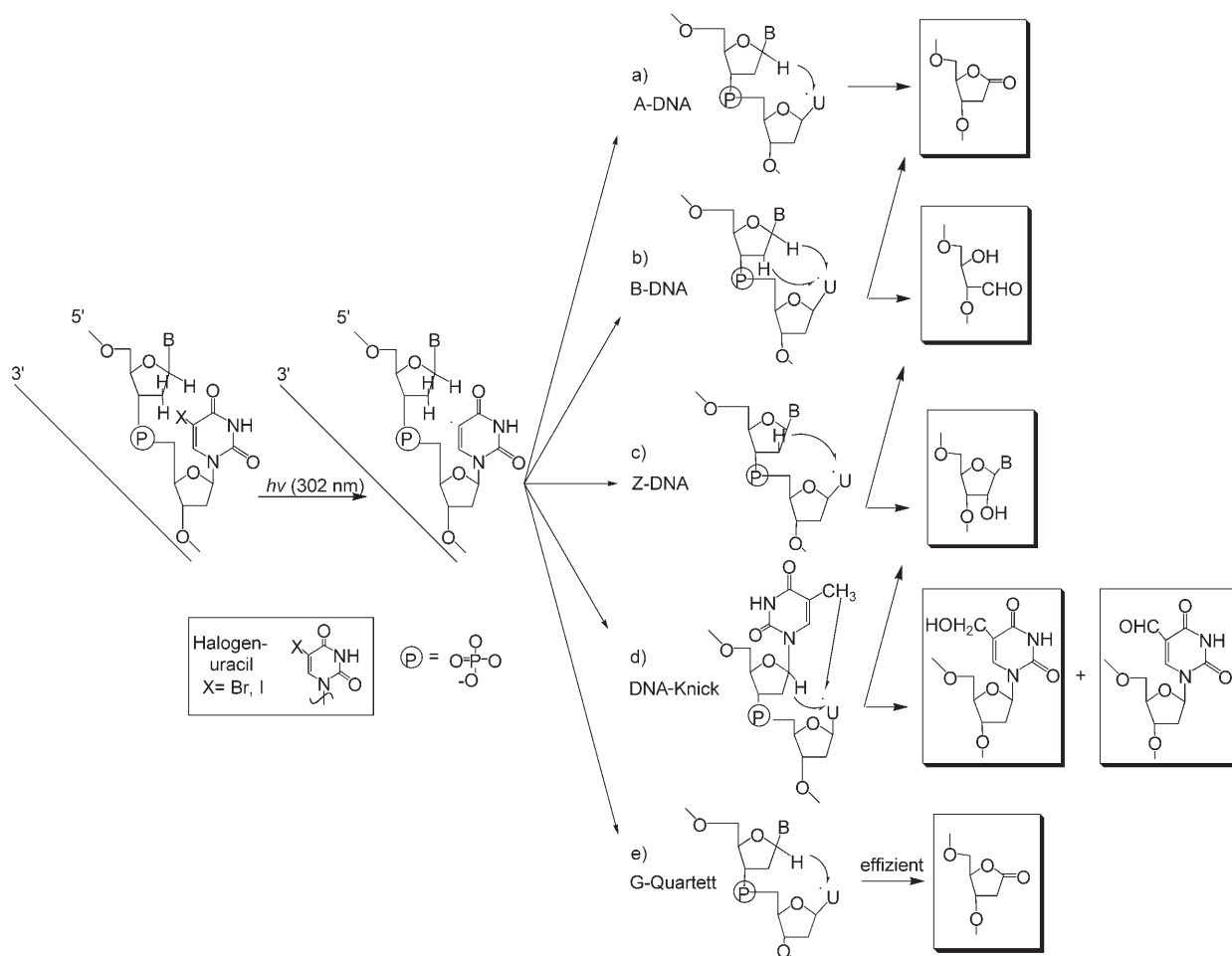


Abbildung 10. Allgemeines Aufbauschema für G-Quartette: Vier guaninreiche Sequenzen G_n bilden durch Wasserstoffbrücken Tetraden, die sich dann zum Stamm des G-Quartetts stapeln. a) 1, 2 und 3 bilden die drei Schleifen. b, c) Schematische Darstellung der K^+ -induzierten G-Quartette von IgG (b) und Rb (c).



Schema 4. Produkte der Wasserstoffabstraktion aus den fünf verschiedenen Strukturen der 5-Halogenuracil enthaltenden DNA nach Bestrahlung mit UV-Licht.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Die Wasserstoffabstraktion in DNA durch Uracil-5-yl-Radikale, die sich bei der UV-Bestrahlung aus 5-Halogenuracil bilden, verläuft atomspezifisch und wird stark von der DNA-Konformation beeinflusst (Schema 4). In B-DNA wurden konkurrierende 1'- und 2'-Wasserstoffabstraktionen beobachtet, in DNA-RNA-Hybriden mit A-Struktur fand hingegen eine selektive 1'-Wasserstoffabstraktion statt. In der Z-DNA verursachte die stereospezifische 2'-Wasserstoffabstraktion eine 2'-Hydroxylierung. In proteininduzierten DNA-Knicen führte die Bestrahlung zur stranginternen Wasserstoffabstraktion an der 5-Methylgruppe von Thymin in 5'-Richtung. In Ioduracil-haltiger Telomer-DNA bestimmt die Ausrichtung des G-Quartetts die Photoreaktivität: Die 2'-Desoxyribonolacton-Einheit wird nur in der diagonalen Schleife des antiparallelen G-Quartetts gebildet. Diese Untersuchungen veranschaulichen die Beziehung zwischen der lokalen DNA-Struktur und dem Produkt der Photoreaktion und verdeutlichen, wie hoch das Potenzial dieser photochemischen Methode für die Analyse der DNA-Struktur einzuschätzen ist. Bei Bestrahlung mit UV-Licht entstehen in DNA hauptsächlich zwei Arten von Photoaddukten: Cyclobutan-Dimere und das (6-4)-Photoprodukt.^[66] Die ligationsvermittelte Polymerasekettenreaktion (LMPCR) ist ein wertvolles Verfahren zur Detektion dieser Produkte in vivo.^[67] Da 5-Halogenuracil-substituierte DNA in lebenden Zellen wie *E. coli* funktionsfähig ist, können ihre photochemischen Reaktionen wichtige Informationen zu lokalen DNA-Konformationen in vivo bereitstellen.

Eingegangen am 7. Juni 2005

Online veröffentlicht am 16. Januar 2006

Übersetzt von Dr. Ines Sprung, Edinburgh

- [1] N. R. Cozzarelli, J. C. Wang, *DNA Topology and Its Biological Effects*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, **1990**.
- [2] „DNA Conformation and Protein Binding“: A. Travers, *Annu. Rev. Biochem.* **1989**, 58, 427–452.
- [3] A. H.-J. Wang, G. J. Quigley, F. J. Kolpak, J. L. Crawford, J. H. van Boom, G. A. van der Marel, A. Rich, *Nature* **1979**, 282, 680–686.
- [4] R. R. Sinden, *DNA Structure and Function*, Academic Press, New York, **1994**.
- [5] S. Neidle, *DNA Structure and Recognition*, IRL, Oxford, **1994**.
- [6] A. Rich, S. Zhang, *Nat. Rev. Genet.* **2003**, 4, 566–572.
- [7] J. A. Hackett, D. M. Feldser, C. W. Greider, *Cell* **2001**, 106, 275–286.
- [8] M. Lei, E. R. Podell, P. Baumann, T. R. Cech, *Nature* **2003**, 426, 198–203.
- [9] H. Han, D. R. Langley, A. Rangan, L. H. Hurley, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 8902–8913.
- [10] W. Tuntiwechapikul, T. L. Jeong, M. Salazar, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 5606–5607.
- [11] J. L. Mergny, L. Lacroix, M. P. Teulade-Fichou, C. Hounsou, L. Guittat, M. Hoarau, P. B. Arimondo, J. P. Vigneron, J.-M. Lehn, J. F. Riou, T. Garestier, C. Helene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 3062–3067.
- [12] J.-L. Mergny, J.-F. Riou, P. Mailliet, M. P. Teulade-Fichou, E. Gilson, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 839–865.
- [13] H. Arthanari, P. H. Bolton, *Chem. Biol.* **2001**, 8, 222–230.
- [14] J. W. Shay, Y. Zou, E. Hiyama, W. E. Wright, *Hum. Mol. Genet.* **2001**, 10, 677–685.
- [15] R. Liu, H. Liu, X. Chen, M. Kirby, P. O. Brown, K. Zhao, *Cell* **2001**, 106, 309–318.
- [16] E. H. Blackburn, *Nature* **1991**, 350, 569–573.
- [17] J. L. Kim, D. B. Nikolov, S. K. Burley, *Nature* **1993**, 365, 520–527.
- [18] D. B. Nikolov, H. Chen, E. D. Halay, A. Hoffmann, R. G. Roeder, S. K. Burley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 4862–4867.
- [19] Y. Kim, J. H. Geiger, S. Hahn, P. B. Sigler, *Nature* **1993**, 365, 512–520.
- [20] M. H. Werner, G. M. Clore, C. L. Fisher, R. J. Fisher, L. Trinh, J. Shiloach, A. M. Gronenborn, *Cell* **1995**, 83, 761–771.
- [21] M. A. Schumacher, K. Y. Choi, H. Zalkin, R. G. Brennan, *Science* **1994**, 266, 763–770.
- [22] M. H. Werner, J. R. Huth, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Cell* **1995**, 81, 705–714.
- [23] S. B. Zimmerman, B. H. Pfeiffer, *J. Mol. Biol.* **1979**, 135, 1023–1027.
- [24] D. G. Reid, S. A. Salisbury, S. Bellard, Z. Schakke, D. H. Williams, *Biochemistry* **1983**, 22, 2019–2025.
- [25] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *FEBS Lett.* **1985**, 179, 187–198.
- [26] M. C. Willis, B. J. Hicke, O. C. Uhlenbeck, T. R. Cech, T. H. Koch, *Science* **1993**, 262, 1255–1257.
- [27] H. Sugiyama, Y. Tsutsumi, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 6720–6721.
- [28] H. Sugiyama, Y. Tsutsumi, K. Fujimoto, I. Saito, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 4443–4447.
- [29] H. Sugiyama, K. Fujimoto, I. Saito, E. Kawashima, T. Sekine, Y. Ishido, *Tetrahedron Lett.* **1996**, 37, 1805–1808.
- [30] T. Chen, G. P. Cook, A. T. Koppisch, M. M. Greenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 3861–3866.
- [31] T. Ito, S. E. Rokita, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 11480–11481.
- [32] T. Watanabe, T. Bando, Y. Xu, R. Tashiro, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 44–45.
- [33] C. Behrens, T. Carell, *Chem. Commun.* **2003**, 1632–1633.
- [34] H. Sugiyama, K. Fujimoto, I. Saito, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 8057–8060.
- [35] C. J. Manuel, M. Newcomb, C. Ferreri, C. Chatgililoglu, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 2927–2928.
- [36] C. Chatgililoglu, T. Gimisis, *Chem. Commun.* **1998**, 1249–1250.
- [37] T. Christopher, B. K. Goodman, M. M. Greenberg, *Chem. Biol.* **1998**, 5, 263.
- [38] S. Wolff, C. Martinez, A. Rich, J. A. Majzoub, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 3664–3668.
- [39] A. Herbert, A. Rich, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 11595–11598.
- [40] W. Zacharias, T. R. O'Connor, J. E. Larson, *Biochemistry* **1988**, 27, 2970–2978.
- [41] S. D. Sheridan, C. J. Benham, G. W. Hatfield, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 8169–8174.
- [42] G. P. Schroth, P.-J. Chou, P. S. Ho, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 11846–11855.
- [43] A. J. Jaworski, N. P. Higgins, R. D. Wells, W. J. Zacharias, *Biol. Chem.* **1991**, 266, 2576–2581.
- [44] H. Sugiyama, K. Kawai, A. Matsunaga, K. Fujimoto, I. Saito, H. Robinson, A. H.-J. Wang, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 1272–1278.
- [45] Y. Xu, R. Ikeda, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13519–13524.
- [46] K. Kawai, I. Saito, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1391–1392.
- [47] T. Schwartz, M. A. Rould, K. Lowenhaupt, A. Herbert, A. Rich, *Science* **1999**, 284, 1841–1845.
- [48] T. Schwartz, J. Behlke, K. Lowenhaupt, U. Heinemann, A. Rich, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, 8, 761–765.

- [49] T. Oyoshi, K. Kawai, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1526–1531.
- [50] Y.-G. Gao, S.-Y. Su, H. Robinson, S. Padmanabhan, L. Lim, B. S. McCrary, S. P. Edmondson, J. W. Shriver, A. H.-J. Wang, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 782–786.
- [51] T. Oyoshi, A. H.-J. Wang, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2086–2087.
- [52] W. I. Sundquist, A. Klug, *Nature* **1989**, *342*, 825–829.
- [53] D. Sen, W. Gilbert, *Nature* **1990**, *344*, 410–414.
- [54] F. W. Smith, J. Feigon, *Nature* **1992**, *356*, 164–168.
- [55] Y. Wang, D. J. Patel, *Biochemistry* **1992**, *31*, 8112–8119.
- [56] M. P. Horvath, S. C. Schultz, *J. Mol. Biol.* **2001**, *310*, 367–377.
- [57] C. Schaffitzel, I. Berger, J. Postberg, J. Hanes, H. J. Lipps, A. Plückthun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 8572–8577.
- [58] Y. Wang, D. J. Patel, *Structure* **1993**, *1*, 263–282.
- [59] G. N. Parkinson, M. P. Lee, S. Neidle, *Nature* **2002**, *417*, 876–880.
- [60] Y. Xu, H. Sugiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6274–6279.
- [61] P. Catasti, X. M. Chen, R. K. Moyzis, E. M. Bradbury, G. Gupta, *J. Mol. Biol.* **1996**, *264*, 534–545.
- [62] A. I. Murchie, D. M. Lilly, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 49–53.
- [63] T. Simonsson, P. Pecinka, M. Kubista, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 1167–1172.
- [64] A. Siddiqui-Jain, C. L. Grand, D. J. Bearss, L. H. Hurley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11593–11598.
- [65] M. N. Weitzmann, K. J. Woodford, K. Usdin, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 20958–20964.
- [66] T. Matsunaga, K. Hieda, O. Nikaido, *Photochem. Photobiol.* **1991**, *54*, 403–410.
- [67] F. Thoma, *EMBO J.* **1999**, *18*, 6585–6598.
-