

Die Suche nach einzelnen DNA-Schäden unter Millionen von Basenpaaren: DNA-Glycosylasen bei der Arbeit

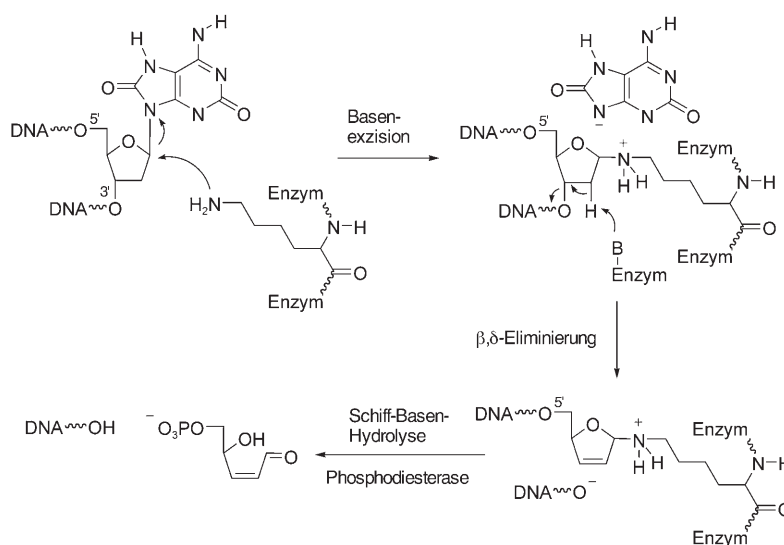
Hans-Achim Wagenknecht*

Stichwörter:

Basenexzision · Basen-Flipping · DNA · DNA-Schäden · Glycosylasen

Die Instandhaltung der genomischen Integrität ist von entscheidender Bedeutung für das Überleben eines jeden Organismus. DNA-Schäden können spontan oder nach Einwirkung von chemischen Stoffen oder Strahlung auftreten und können, wenn sie nicht repariert werden, gefährliche Konsequenzen haben.^[1,2] DNA-Läsionen führen zu Mutationen, die indirekt zelluläre Mechanismen stören und in Säugetieren die Entstehung von Krebs hervorrufen.^[3] Um solch schwerwiegende Folgen abzuwenden, hat die Natur eine Reihe von Enzymmaschinerien für unterschiedliche DNA-Reparaturen hervorgebracht:^[4] 1) Reparatur durch Schadensumkehr, 2) Basenexzisionsreparatur (BER), 3) Nucleotidexzisionsreparatur, 4) Fehlpaarungsreparatur und 5) Reparatur von Doppelstrangbrüchen.

Unter diesen Prozessen ist die BER auf dem molekularen Niveau am besten verstanden, vor allem in Bezug auf den enzymatischen Mechanismus, der den DNA-Schaden behebt (Schema 1).^[5,6] BER-Proteine sind hauptsächlich DNA-Glycosylasen, die die nucleosidische Bindung zur beschädigten DNA-Base hydrolysieren, wodurch eine abasische Stelle entsteht. Anschließend wird das



Schema 1. Mechanismus der Basenexzision durch eine bifunktionelle DNA-Glycosylase (z. B. hOGG1) über ein Schiff-Base-Addukt zwischen Protein und DNA. B = basische Seitenkette des Enzyms.

Desoxyribofuranosid durch β,δ -Eliminierung entfernt. Monofunktionelle DNA-Glycosylasen benötigen dafür eine Lyase als zusätzliches Enzym, bifunktionelle DNA-Glycosylasen enthalten diese katalytische Lyase-Aktivität bereits als zweite Funktion. Zum Schluss wird das fehlende Nucleotid durch DNA-Polymerasen und Ligasen eingefügt.

Während die bioorganischen Details des Mechanismus der Basenexzision bekannt sind, war bisher unklar, wie die eigentliche Erkennung von DNA-Schäden abläuft.^[7] DNA-Glycosylasen müssen Millionen unbeschädigter Basenpaare überprüfen, um ein einziges beschädigtes Nucleotid aufzuspüren und dann herauszuschneiden. Es ist schwer vorstellbar, dass die verschiedenen che-

mischen DNA-Modifikationen (z. B. desaminierte, methylierte, alkylierte oder oxidierte Basen) gemeinsame Merkmale aufweisen, die durch BER-Glycosylasen erkannt und lokalisiert werden können.

Aus dem Mechanismus der Hydrolyse der Glycosidbindung ist offensichtlich, dass insbesondere die enzymatische Aktivierung der Abgangsgruppe einen Zugang der beteiligten DNA-Glycosylase zu der beschädigten Base erfordert, die aber als Teil des Basenstapels normalerweise im Inneren des DNA-Duplexes verborgen ist. Deswegen sind alle DNA-Glycosylasen zum „Basen-Flipping“ befähigt, bei dem die beschädigte Base aus der DNA in eine außerhelicale Proteintasche herausgedreht wird. Dort kann die modifizierte Base durch spe-

[*] Prof. H.-A. Wagenknecht
Institut für Organische Chemie
Universität Regensburg
93040 Regensburg (Deutschland)
Fax: (+49) 941-943-4617
E-Mail: achim.wagenknecht@chemie.uni-regensburg.de
Homepage: <http://www-oc.chemie.uni-regensburg.de/wagenknecht/>

zifische Kontakte mit Aminosäuren über elektrostatische Wechselwirkungen, Stapelwechselwirkungen oder Wasserstoffbrücken erkannt werden. Es wurde vorgeschlagen, dass diese Wechselwirkungen in der Bindungsstelle im Protein zwischen beschädigter und unbeschädigter DNA-Base unterscheiden. Mithilfe kristallographischer Daten einer Reihe von Komplexen aus BER-Proteinen und DNA wurde bewiesen, dass das „Basen-Flipping“ eine ubiquitäre Eigenschaft der DNA-Glycosylasen darstellt.^[5–7]

Die Beobachtung eines „Basen-Flippings“ in einer statischen Proteinstruktur gibt aber keine Antwort auf die Frage, wie Schäden in der DNA-Helix vor dem „Flipping“-Prozess erkannt werden. In den späten 90er Jahren wurden einige Modelle vorgeschlagen, die beschreiben sollten, wie Proteine DNA-Schäden lokalisieren.^[8–10] 1997 teilten Verdine et al. die DNA-Läsionen in stark und weniger stark helixdestabilisierende ein. Es ist klar, dass eine stark helixdestabilisierende Läsion durch das Abtasten der DNA-Oberfläche geortet werden kann, bis eine solche vorübergehend außerhelicale Läsion gefunden wurde. Das Protein stoppt dann auf dem Schaden und katalysiert die Basenexzision. Für die Erkennung intrahelicaler Läsionen, die die Duplexstruktur nicht stark destabilisieren, wurde dagegen vorgeschlagen, dass sowohl beschädigte als auch unbeschädigte Basen in der außerhelicalen Proteintasche überprüft werden. Das bedeutet, dass das Enzym entlang der DNA-Helix wandert und eine außerhelicale Base durch die nächste ersetzt, bis die Basenläsion lokalisiert wurde. Dieses „Basen-Flipping“ unbeschädigter Basen wird besonders kontrovers diskutiert.

Offensichtlich sind die entscheidenden Informationen über die Erkennung von DNA-Schäden nur aus Strukturen zu erhalten, in denen BER-Glycosylasen an unbeschädigte DNA gebunden sind. Aber wie lässt sich ein enzymatisch aktives Protein auf spezifischen Positionen einer unbeschädigten Ziel-DNA einfangen? 2005 präsentierten Verdine et al. die Antwort:^[11] Die publizierte Struktur beschreibt einen Komplex aus humaner 8-Oxoguanin-Glycosylase (hOGG1) und einem unbeschädigten DNA-Duplex. Sie hatten zuvor über

eine Struktur der inaktivierten hOGG1 berichtet, die an 8-Oxoguanin-haltige DNA gebunden vorlag.^[12] Diese ältere Struktur zeigt eindeutig die Situation nach dem „Basen-Flipping“: Das 8-Oxoguanin ist tief im aktiven Zentrum des Proteins vergraben, an dem die Hydrolyse der nucleosidischen Bindung stattfinden kann.

Für die aktuelle Struktur von hOGG1 gebunden an unbeschädigte DNA entwickelte die Arbeitsgruppe von Verdine eine Strategie zur kovalenten Verknüpfung, um das Protein an einem unbeschädigten Guanin einzufangen.^[13] Der experimentelle Ansatz sieht im Wesentlichen zwei Modifikationen vor (Abbildung 1):^[11] 1) Die Gegenbase Cytosin des Zielguanins in der DNA wurde mit einer kurzen Alkylkette modifiziert, die eine Disulfid-Funktionalität trägt. 2) Das Asn149 der hOGG1 wurde zu Cys mutiert. Nach diesen beiden Veränderungen konnten

Protein und DNA gezielt über eine Disulfidbrücke verknüpft werden. In der Struktur des entsprechenden hOGG1-DNA-Komplexes war das unbeschädigte Guanin tatsächlich aus der DNA-Helix herausgedreht, aber im Unterschied zum 8-Oxoguanin wird dem unbeschädigten Guanin der Zutritt in das aktive Zentrum verwehrt. Stattdessen befindet sich das Guanin in einer benachbarten außerhelicalen Bindungsstelle, die als „Pfortner“ gewährleistet, dass nur 8-Oxoguanin in das eigentliche aktive Zentrum gelangt und abgespalten wird, nicht aber das unbeschädigte Guanin. Dieses Ergebnis ist deswegen so wichtig, weil es zeigt, dass das proteininduzierte „Basen-Flipping“ unbeschädigter DNA-Basen prinzipiell erfolgen kann und die Diskriminierung der DNA-Läsion dann zwar in einer außerhelicalen Position, aber *nicht* im aktiven Zentrum erfolgt.

Obwohl diese Strukturanalyse das Modell stützt, bei dem ein BER-Enzym unter kontinuierlichem „Basen-Flipping“ wandert, erheben sich einige Zweifel. Insbesondere im Hinblick auf das Abfragen von Millionen von Basenpaaren, das zum Erkennen einer einzigen beschädigten Stelle erforderlich ist, erscheint ein kontinuierliches „Basen-Flipping“ als zu langsam. Die entscheidende Frage ist nun, ob die Base für die Erkennung eines Schadens wirklich herausgedreht werden muss.^[7] In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung wichtig, dass alle Enzyme, die Basen aus dem DNA-Duplex herausdrehen, auch die DNA an der Bindungsstelle deutlich abknicken.^[5,6] Diese Störung der DNA-Struktur kann aber vor, gleichzeitig mit oder nach dem „Basen-Flipping“ erfolgen. Wenn DNA-Glycosylasen in der Lage sind, auch unbeschädigte DNA abzuknicken, könnte ein alterna-

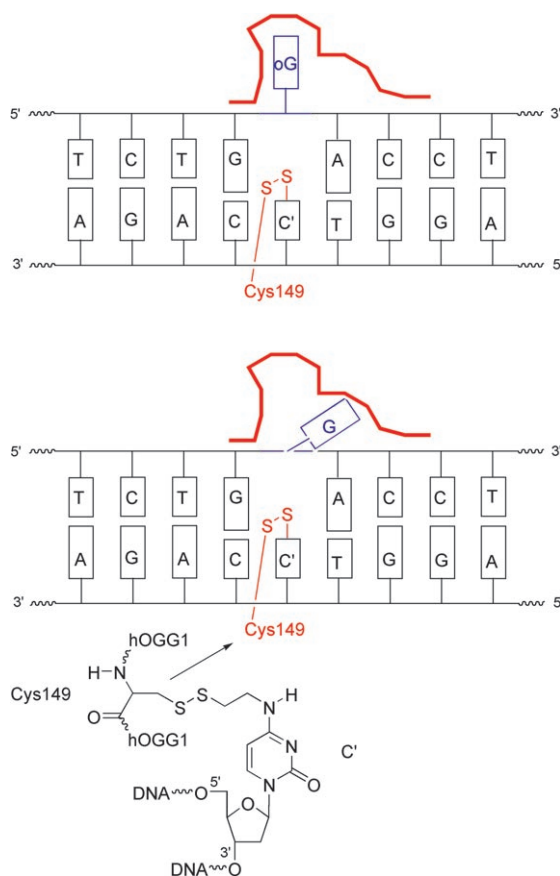


Abbildung 1. Komplexe aus hOGG1 (N149C-Mutante) und beschädigter DNA (oben, oG = 8-Oxoguanin) oder unbeschädigter DNA (unten) mit Disulfidverknüpfungen. Das unbeschädigte Zielguanin ist herausgedreht, aber im Gegensatz zu 8-Oxoguanin nicht in das aktive Zentrum inseriert.

tiver Induced-Fit-Mechanismus die beschädigten Stellen lokalisieren. Solch ein Mechanismus wurde von Tainer et al. vorgeschlagen.^[9,10] Entsprechend könnte eine lokale Flexibilität der DNA-Konformation, hervorgerufen z.B. durch *syn*-Konformationen oder Wobble-Fehlpaarungen an der Stelle der Beschädigung, durch Aminosäuren erkannt werden, die selbst eine konformative Spannung auf die DNA-Helix erzeugen, bevor das „Basen-Flipping“ erfolgt.

Ein solches Szenario wurde kürzlich durch Verdine et al. anhand der DNA-Protein-Struktur von MutM nachgewiesen.^[14] Die bakterielle DNA-Glycosylase MutM erkennt ebenfalls 8-Oxoguanin und kann daher als Pendant der zuvor diskutierten hOGG1 betrachtet werden. Ähnlich wie bei hOGG1 wurde auch enzymatisch aktives

MutM mithilfe einer Strategie zur kovalenten Verknüpfung^[13] sowohl auf beschädigten Stellen als auch auf unbeschädigtem Guanin eingefangen (Abbildung 2). Für diese Studien wurde das Phosphodiester-Rückgrat der DNA im Bereich der Proteinbindungsregion mit einer thiolhaltigen Alkylkette modifiziert. Die Cystein-Mutante von MutM (Q166C) ergab eine Reihe interessanter Strukturen, in denen verschiedene DNA-Zielsequenzen abgefangen wurden. Ähnlich dem entsprechenden hOGG1-Komplex befindet sich auch in der Struktur von MutM mit einer 8-Oxoguanin-haltigen DNA die beschädigte Base deutlich erkennbar in einer herausgedrehten, außerhelicalen Position. Sehr viel wichtiger erscheinen die Details derjenigen MutM-Strukturen, die auf unbeschädigten DNA-Duplexen eingefangen wurden. In diesen Fällen inserierte die aromatische Seitenkette

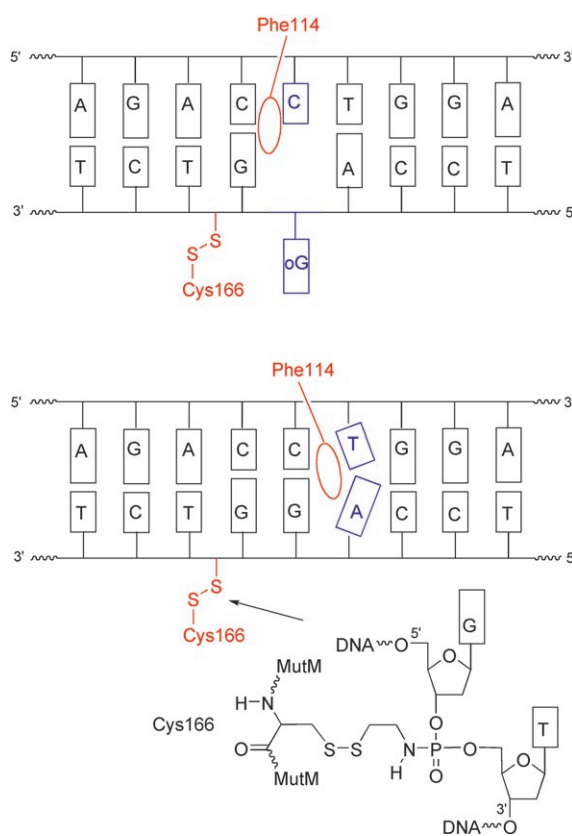


Abbildung 2. Oben: Der Komplex aus MutM (Q166C-Mutante) und beschädigter DNA zeigt das „Basen-Flipping“ von 8-Oxoguanin. Unten: Beispiel eines Abtastungskomplexes aus MutM (Q166C-Mutante) und unbeschädigter DNA mit Disulfidverknüpfung.

von Phe114 direkt neben der eigentlichen Zielbase in die DNA, aber es wurde keine Base herausgedreht. Die Phe114-Seitenkette bewirkt ein Abknicken der DNA an der Intercalationsstelle, wodurch wiederum das „Base-Flipping“ von 8-Oxoguanin gegenüber Guanin kinetisch begünstigt wird: Folglich wird 8-Oxoguanin herausgedreht, nicht aber Guanin. Offensichtlich wirkt also nicht nur eine positive Selektion für das Herausdrehen beschädigter Basen, sondern zusätzlich eine negative Selektion für das Herausdrehen unbeschädigter Basen.

Die beiden diskutierten Strukturen mit hOGG1 und MutM geben neue Einblicke in den Prozess der Lokalisierung von DNA-Schäden. Die Diskriminierung beschädigter DNA-Basen gegenüber unbeschädigten kann über mindestens zwei Mechanismen erfolgen: 1) Die konformative Spannung

durch die Intercalation der Phe114-Seitenkette von MutM in die DNA-Helix ergibt eine kinetische Präferenz für das „Basen-Flipping“ der beschädigten DNA-Base. Dieser Teil des Lokalisierungsprozesses für DNA-Schäden kann von der Außenseite der Helix durchgeführt werden. 2) Sollte die Glycosylase gelegentlich einen Fehler machen und versuchen, eine unbeschädigte Base in das aktive Zentrum herauszudrehen, so hat dies keine gefährlichen Konsequenzen. Wie anhand der hOGG1-Struktur gezeigt, ist eine Bindungsstelle vor dem aktiven Zentrum in der Lage, zwischen beschädigten und unbeschädigten Basen zu unterscheiden. Man darf gespannt sein, ob weitere interessante DNA-Protein-Strukturen aufgedeckt werden, die diese beiden Modelle der Lokalisierung von DNA-Schäden verfeinern.

Online veröffentlicht am 4. August 2006

- [1] Siehe z.B.: D. Wang, S. A. Kreuzer, J. M. Essigmann, *Mutat. Res.* **1998**, *400*, 99–115.
- [2] Siehe z.B.: E. C. Friedberg, L. D. McDaniel, R. A. Schultz, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *14*, 5–10.
- [3] Siehe z.B.: A. Luch, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 113–125.
- [4] Übersicht: O. D. Schärer, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 3052–3082; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2946–2974 zit. Lit.
- [5] Übersicht: S. S. David, S. D. Williams, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1221–1261 zit. Lit.
- [6] Übersicht: J. T. Stivers, Y. L. Jiang, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2729–2759 zit. Lit.
- [7] Übersicht: S. R. Rajski, B. A. Jackson, J. K. Barton, *Mutat. Res.* **2000**, *447*, 49–72 zit. Lit.
- [8] G. L. Verdine, S. D. Bruner, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 329–334.
- [9] C. D. Mol, S. S. Parikh, C. D. Putnam, T. P. Lo, J. A. Tainer, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, *28*, 101–128.
- [10] S. S. Parikh, C. D. Mol, D. J. Hosfield, J. A. Tainer, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 37–47.
- [11] A. Banerjee, W. Yang, M. Karplus, G. L. Verdine, *Nature* **2005**, *434*, 612–618.
- [12] S. D. Bruner, D. P. G. Norman, G. L. Verdine, *Nature* **2000**, *403*, 859–866.
- [13] G. L. Verdine, D. P. G. Norman, *Annu. Rev. Biochem.* **2003**, *72*, 337–366.
- [14] A. Banerjee, W. L. Santos, G. L. Verdine, *Science* **2006**, *311*, 1153–1157.