

Übersehenes sichtbar gemacht: ATL-Proteine und DNA-Reparatur**

Thomas Reißner, Stephanie Schorr und Thomas Carell*

Alkylierungen · DNA-Reparatur · DNA-Schäden ·
Molekulare Erkennung · Nucleotide

Die DNA einer Zelle ist der ununterbrochenen Schädigung durch zahlreiche endogene und exogene Faktoren ausgesetzt. Die entstehenden DNA-Schäden können zu Mutationen führen oder den Zelltod herbeiführen.^[1] Einige der bedeutendsten DNA-Schäden entstehen durch die Reaktion von alkylierenden Reagentien mit den DNA-Basen. Die alkalierten Reaktionsprodukte können einerseits endogen durch zelluläre Alkylierungsreagentien wie das S-Adenosylmethionin entstehen oder sind auf die Einwirkung exogener Faktoren (unter anderem Umwelteinflüsse) zurückzuführen. Auch bei der Krebstherapie werden alkylierende Agentien eingesetzt, um die DNA von Tumorzellen zu schädigen. Dabei treten diverse alkylierte Basen auf. Neben der *N*⁷-Position von Guanin und Adenin sind die *O*⁶-Position des Guanins und die *O*⁴-Position des Thymins für Alkylierungen anfällig. Vom *O*⁶-Methylguanin weiß man, dass es während der Replikation mit Thymin paaren kann, woraus eine Transitionsmutation von G-C zu A-T resultiert.^[2]

Zurzeit sind drei verschiedene Reparaturmechanismen für die Entfernung von alkylierten Basen bekannt: Mithilfe direkter oxidativer Desalkylierung durch Oxygenasen der AlkB-Familie kann die Alkylgruppe an der Base direkt entfernt werden.^[3] Die Alkylgruppe wird aufoxidiert und eliminiert. Ein weiterer Mechanismus verläuft über Basenexzisionsreparatur-Glycosylasen.^[4] Hierbei wird die geschädigte Base aus dem Strang entfernt. Die meisten Zellen reparieren allerdings *O*⁶-Alkylguanin-Schäden hauptsächlich über *O*⁶-Alkylguanin-DNA-Transferasen (AGTs). Diese Proteine demethylieren *O*⁶-Methylguanin und *O*⁴-Methylthymin mithilfe eines Cysteinrestes im aktiven Zentrum.^[5,6] AGTs transferieren die Alkylgruppe in einer S_N2-Reaktion auf dieses Cystein, was ein irreversibel alkyliertes Enzym ergibt („Suizid“-Enzym; Abbildung 1). Es existieren Kristallstrukturen der humanen AGT im Komplex mit *O*⁶-Methylguanin

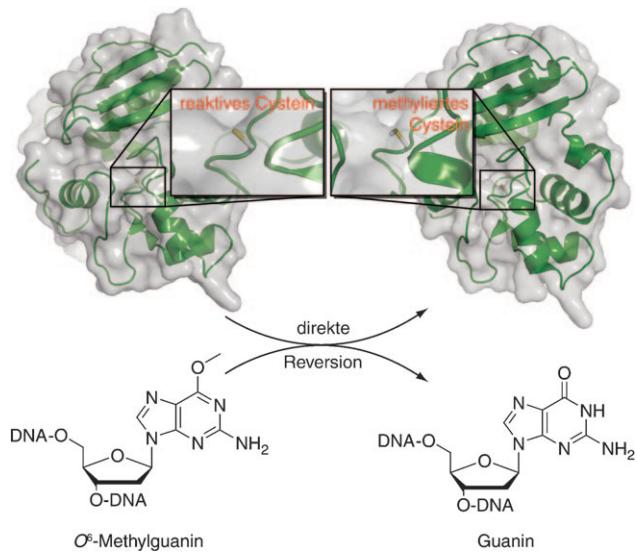


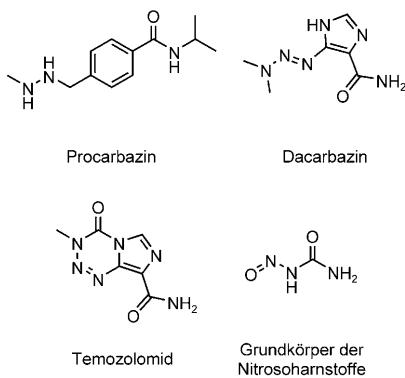
Abbildung 1. Suizid-Reparatur durch die *O*⁶-Alkylguanin-DNA-Transferase (AGT).

enthaltender doppelsträngiger DNA.^[7] AGT enthält ein Helix-Turn-Helix(HTH)-Motiv, das die DNA über eine Wechselwirkung mit der kleinen Furche des Duplexes bindet. DNA-Bindung führt zur Aufweitung der kleinen Furche der DNA und Interkalierung eines Arginin-Fingers in die Helix. Wie auch bei den DNA klappenden Photolyasen^[8] wird die alkylierte Base in die katalytische Tasche herausgeklappt (base flipping). Dieses Herausdrehen der geschädigten Base aus dem Duplex wird zusätzlich durch einen konservierten Tyrosinrest unterstützt, der über sterische Hinderung und Ladungsabstoßung die Rotation des 3'-Phosphatrestes der alkylierten Base induziert. Außerdem bildet ein Arginin eine Wasserstoffbrücke zum zurückbleibenden ungepaarten Cytosin in der DNA-Doppelhelix. Diese Wechselwirkung ist essenziell für die Stabilisierung des herausgeklappten Nucleotides.

Die Reparatur von alkylierten Basen durch AGTs spielt eine große Rolle bei der Krebstherapie. Diverse Chemotherapeutika wie Procarbazine, Dacarbazine, Temozolomid und die Wirkstoffgruppe der Nitrosoharnstoffe sind alkylierende Substanzen (Schema 1). Eine Reparatur der alkylierten Guanine in der DNA durch AGTs führt zu Resistenz der Tumorzelle gegen diese alkylierenden Medikamente. Zur

[*] T. Reißner, S. Schorr, Prof. Dr. T. Carell
Center for Integrative Protein Science (CiPS^M)
Department für Chemie und Biochemie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 5–13, 81377 München (Deutschland)
Fax: (+49) 89-2180-77756
E-Mail: thomas.carell@cup.uni-muenchen.de
Homepage: <http://www.carellgroup.de>

[**] Wir danken dem Exzellenzcluster CiPS^M sowie den SFBs 749 und 646 für finanzielle Unterstützung. T.R. dankt dem Boehringer Ingelheim Fonds für ein Doktorandenstipendium.



Schema 1. Alkylierende Chemotherapeutika.

Verbesserung der Chemotherapie mit diesen Wirkstoffen werden daher AGT-Inhibitoren gesucht, die das schnelle Auftreten von Resistenzen verhindern sollen.^[9,10]

Anfang 2003 wurde von Margison und Mitarbeitern eine neue Klasse von Proteinen aus Prokaryoten und niederen Eukaryoten beschrieben, die in ihrer DNA bindenden Domäne Sequenzähnlichkeiten zu den AGTs aufweisen. Diese werden als Alkyltransferase-ähnliche Proteine (ATL-Proteine, **alkyltransferase-like proteins**) bezeichnet.^[11] Wie bei den AGTs wird hier ebenfalls das geschädigte Nucleotid erkannt und aus der DNA-Helix herausgedreht. Die ATLs unterscheiden sich jedoch von den AGTs in einigen charakteristischen Eigenschaften:^[12–16]

- Trotz der signifikanten Sequenzhomologie findet sich im aktiven Zentrum statt des katalytisch aktiven Cysteins in diesen neuartigen ATLs hauptsächlich ein Tryptophan oder auch ein Alanin.
- Aufgrund der fehlenden Cysteingruppe kann keine Alkyltransferaseaktivität, d.h. keine direkte Reparatur des entstandenen DNA-Schadens, stattfinden. Eine Mutation des Tryptophans zu Cystein führt nicht zur Wiederherstellung der Alkyltransferaseaktivität, was zeigt, dass die ATL-Proteine keine Reparaturaktivität entfalten können.
- Ebenfalls konnte weder Glycosylase- noch Endonucleaseaktivität als alternativer Reparaturmechanismus nachgewiesen werden.
- ATLs inhibieren reversibel die Aktivität der AGT-Reparaturenzyme, da sie spezifisch an die Alkylschäden binden.
- Eine Inaktivierung der ATL-Gene führt zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegen DNA alkylierende Agentien, d.h., ATLs schützen den Organismus vor den biologischen Folgen von DNA-Alkylierung.

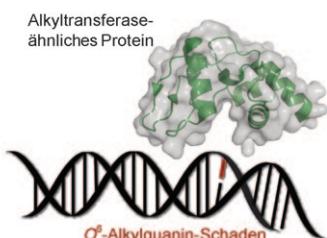
Tainer und Mitarbeiter erforschten nun den Mechanismus der Schadenserkennung der ATLs und deren Verbindung zur allgemeinen Nucleotid-Exzisions-Reparatur (NER), die so genannte Bulky-Adduct-Schäden aus dem Genom entfernt.^[17]

Um Aufschlüsse über Struktur und Wirkungsweise der ATLs zu erlangen, wurde At1 aus *Schizosaccharomyces pombe* in Komplex mit verschiedenen Oligonucleotiden kristallisiert. Als DNA-Schaden fungierte entweder ein O^6 -Methylguanin ($O^6\text{-mG}$) oder das toxikologisch relevante

Addukt $O^6\text{-4-(3-Pyridyl)-4-oxobutylguanin}$ ($O^6\text{-pobG}$). Tainer und Mitarbeiter stellten fest, dass die katalytische Domäne von At1 große Ähnlichkeit zur humanen AGT aufweist. Im katalytischen Zentrum sind die für DNA-Bindung und Herausklappen des Nucleotids verantwortlichen Reste konserviert. Allerdings fehlt At1 in der Tat das reaktive Cystein für die direkte Reversion des Alkylschadens. Dieses ist im Fall von At1 – wie erwartet wurde – durch ein Tryptophan ersetzt, das durch hydrophobe Wechselwirkungen die herausgeklappte Alkylbase stabilisiert.

Der $O^6\text{-mG}$ - oder $O^6\text{-pobG}$ -Schaden ist in Komplex mit At1 in das aktive Zentrum mit der typischen PWHRV-Sequenz gedreht. Ein Arginin bildet eine Wasserstoffbrücke zum ungepaarten Cytosin und stabilisiert somit das herausgeklappte Alkylguanin zusätzlich. Die At1-Bindetasche für alkylierte Nucleotide ist ungefähr dreimal so groß wie jene der AGTs. Dies erklärt die Vielfalt an Schäden, die durch At1 erkannt werden, z.B. $O^6\text{-Benzyl-}$, $O^6\text{-(4-Bromphenyl)}$ - oder $O^6\text{-Hydroxyethylguanin}$. Die Promiskuität der Bindetasche ist erstaunlich. Interessant ist, dass in den aktiven Taschen der *E. coli*-AGTs (Ada und Ogt) nicht genügend Platz für das herausgeklappte $O^6\text{-pobG}$ vorhanden ist. Dies lässt darauf schließen, dass ATLs für die Reparatur von sperrigen Addukten in Organismen wie *E. coli* benötigt werden. Die DNA-Bindung erfolgt bei At1 wie bei AGTs über ein HTH-Motiv. Tainer und Mitarbeiter konnten zudem bei At1 mehr DNA-Protein-Kontakte als bei AGTs nachweisen, was die starke Affinität zu alkylgeschädigten Basen erklärt. Zusätzlich wird die DNA um ca. 45° abgewinkelt. Die starke Biegung der DNA durch At1 wird vor allem durch die N-terminale Helix unterstützt.

Das Herausklappen von geschädigten Basen ist ein weit verbreiteter Prozess, den viele Nucleotid modifizierende Enzyme (z.B. DNA-Reparaturenzyme oder RNA modifizierende Enzyme) nutzen. All diese Enzyme verbinden mit dem Klappen eine katalytische Funktion, in deren Folge die geklappte Base modifiziert oder eliminiert wird. Trotz herausgeklappter Alkylbase zeigt At1 jedoch keinerlei enzymatische Aktivität zur Spaltung. Dies ist außergewöhnlich, denn warum soll ein Protein eine geschädigte Base herausklappen, wenn keine chemischen Prozesse folgen? Da den ATL-Proteinen eine katalytische Funktion fehlt, wurde früh vermutet, dass das Herausklappen des Nucleotids nur ein Schalter sein könnte, der andere Reparatsysteme aktiviert. Da z.B. $O^6\text{-meG}$ keinen Transkriptionsstop hervorruft, könnte At1 als Erkennungsprotein an den Schaden binden und dadurch die Transkription blockieren, was eine anschließende Reparatur ermöglicht (Abbildung 2). Wechselwirkungsstudien mit verschiedenen NER-Proteinen zeigen nun tatsächlich direkte Zusammenhänge zwischen ATLs und dem NER-System. NER ist ein allgemeiner Reparaturprozess, bei dem ein schadhaftes DNA-Teilstück komplett herausgeschnitten wird und die resultierende Einzelstranglücke mit den korrekten Nucleotiden ausgefüllt wird. At1 von *E. coli* wechselwirkt z.B. mit UvrA und UvrC aus *E. coli*, die am NER-Mechanismus beteiligt sind. Biochemische Wechselwirkungen zwischen At1 und Rad13 (beide aus *S. pombe*) konnten ebenfalls eindeutig nachgewiesen werden. Vermutlich ist ATL daher tatsächlich eine reine Erkennungseinheit

1. Erkennung von O^6 -Alkylguanin durch ATLs

2. Herausdrehen des Schadens durch DNA-Biegung zur Aktivierung der NER

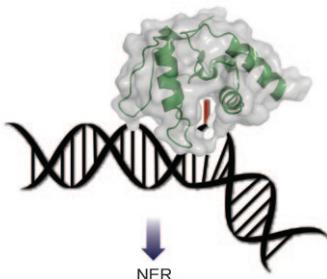


Abbildung 2. Erkennung von O^6 -Alkylguanin-Schäden durch ATLs. Der entstandene Protein-DNA-Komplex rekrutiert durch starke Biegung der DNA und Herausklappen der alkylierten Base die NER.

von Schäden, die diese der Reparatur durch NER-Proteine zuführt. Dies ist zusätzlich zu den bereits bekannten Reparaturmechanismen ein neuer Weg zur Reparatur von alkylgeschädigten Basen.

Es steht noch offen, ob ATLs auch bei höheren Lebewesen eine Rolle bei der generellen Schadenserkennung spielen. Die Autoren konnten allerdings die ersten ATLs nun auch in einem multizellulären Organismus (der Seeanemone *Nematostella vectensis*) nachweisen. Eine humane Version der ATLs wurde noch nicht gefunden. Es bleibt daher festzuhalten, dass viele, vor allem kleine Schäden während der Replikation oder Transkription schlicht übersehen werden und zu Mutationen führen.^[18] Die ATL-Proteine binden an diese Schäden und klappen sie heraus, wodurch die „unsichtbaren“ Schäden für die Reparatursysteme wie NER sichtbar werden.

- [1] J. Butenandt, L. T. Burgdorf, T. Carell, *Synthesis* **1999**, 1085–1105.
- [2] V. Murray, *Mutat. Res.* **1987**, *190*, 267–270.
- [3] B. Yu, W. C. Edstrom, J. Benach, Y. Hamuro, P. C. Weber, B. R. Gibney, J. F. Hunt, *Nature* **2006**, *439*, 879–884.
- [4] B. F. Eichman, E. J. O'Rourke, J. P. Radicella, T. Ellenberger, *EMBO J.* **2003**, *22*, 4898–4909.
- [5] Y. Mishina, E. M. Duguid, C. He, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 215–232.
- [6] B. Sedgwick, P. A. Bates, J. Paik, S. C. Jacobs, T. Lindahl, *DNA Repair* **2007**, *6*, 429–442.
- [7] D. S. Daniels, T. T. Woo, K. X. Luu, D. M. Noll, N. D. Clarke, A. E. Pegg, J. A. Tainer, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11*, 714–720.
- [8] M. J. Maul, T. R. Barends, A. F. Glas, M. J. Cryle, T. Domratcheva, S. Schneider, I. Schlichting, T. Carell, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 10230–10234; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10076–10080.
- [9] A. E. Pegg, K. Swenn, M. Y. Chae, M. E. Dolan, R. C. Moschel, *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *50*, 1141–1148.
- [10] A. E. Pegg, M. E. Dolan, R. C. Moschel, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **1995**, *51*, 167–223.
- [11] G. P. Margison, A. C. Povey, B. Kaina, M. F. Santibanez Koref, *Carcinogenesis* **2003**, *24*, 625–635.
- [12] S. J. Pearson, J. Ferguson, M. Santibanez-Koref, G. P. Margison, *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 3837–3844.
- [13] S. J. Pearson, S. Wharton, A. J. Watson, G. Begum, A. Butt, N. Glynn, D. M. Williams, T. Shibata, M. F. Santibanez-Koref, G. P. Margison, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 2347–2354.
- [14] G. P. Margison, A. Butt, S. J. Pearson, S. Wharton, A. J. Watson, A. Marriott, C. M. P. F. Caetano, J. J. Hollins, N. Rukazenkova, G. Begum, M. F. Santibanez-Koref, *DNA Repair* **2007**, *6*, 1222–1228.
- [15] R. Morita, N. Nakagawa, S. Kuramitsu, R. Masui, *J. Biochem.* **2008**, *144*, 267–277.
- [16] C.-S. Chen, E. Korobkova, H. Chen, J. Zhu, X. Jian, S.-C. Tao, C. He, H. Zhu, *Nat. Methods* **2008**, *5*, 69–74.
- [17] J. L. Tubbs, V. Latypov, S. Kanugula, A. Butt, M. Melikishvili, R. Kraehenbuehl, O. Fleck, A. Marriott, A. J. Watson, B. Verbeek, G. McGown, M. Thorncroft, M. F. Santibanez-Koref, C. Millington, A. S. Arvai, M. D. Kroeger, L. A. Peterson, D. M. Williams, M. G. Fried, G. P. Margison, A. E. Pegg, J. A. Tainer, *Nature* **2009**, *459*, 808–813.
- [18] G. W. Hsu, M. Ober, T. Carell, L. S. Beese, *Nature* **2004**, *431*, 217–221.

Eingegangen am 22. Juli 2009

Online veröffentlicht am 8. September 2009