

Kristallstruktur eines Cisplatin-(1,3-GTG)-Schadens im Komplex mit DNA-Polymerase η^{**}

Thomas Reißner, Sabine Schneider, Stephanie Schorr und Thomas Carell*

Dr. Klaus Römer zum 70. Geburtstag gewidmet

Cisplatin (*cis*-Diammin dichloroplatin(II)) ist eines der am weitest verbreiteten Antikrebsmedikamente und wird gegen Eierstock-, Hals-, Kopf- und Nackenkrebs sowie nicht-kleinzeligen Lungenkrebs eingesetzt.^[1] Es ist als eines der wenigen Therapeutika in der Lage, Krebs zu heilen. Allerdings beschränkt sich diese Eigenschaft auf Hodenkrebs mit Heilungsraten von bis zu 90%.^[2,3] Die Antitumorwirkung von Cisplatin beruht auf der Bildung stabiler DNA-Addukte (Abbildung 1).^[1,4–6] Die Hauptaddukte sind 1,2- (Pt-GG (**1**), 47–50%; Pt-AG, 23–28%) und 1,3-Intrastrangverknüpfungen (Pt-GNG, 8–10%), wobei in letzterem Fall die beiden Guanine durch eine weitere Nucleobase getrennt sind.^[6–8] Erst kürzlich wurde gezeigt, dass 1,2-Intrastrangaddukte von Zellen toleriert werden. Zwei spezialisierte DNA-Polymerasen (Pol η und Pol ζ) ermöglichen durch ihr Zusammenspiel die Replikation über Schaden **1**. Dieser komplexe Prozess

wird durch Pol η initiiert, die fehlerfrei ein dC gegenüber dem Schaden einbaut. Anschließend verlängert Pol ζ diese Struktur zum Endprodukt. Dieser Prozess wirkt dem therapeutischen Effekt von Cisplatin entgegen und trägt somit zu Resistenzbildung bei.^[9] Derzeit wird vermutet, dass 1,3-Intrastrangaddukte die Replikation stärker behindern und somit zytotoxischer sind.^[10,11]

Hier berichten wir, wie Pol η den Pt-GTG-Schaden partiell mit zwei Nukleobasen paart und somit die Replikation ermöglicht. Röntgenkristallographische Daten zeigen einen Pt-GTG-Schaden (**2**) in Komplex mit Pol η und erklären den Mechanismus der partiellen Replikation.^[12–15] Zur Aufklärung des Mechanismus wurde der DNA-Templatstrang **3** hergestellt, der ein einzelnes Cisplatin-(1,3-GTG)-Intrastrangaddukt enthielt. Dazu wurde ein kurzes DNA-Oligomer mit einer isolierten GTG-Sequenz mit aktiviertem Cisplatin umgesetzt.^[16] Der Pt-GTG-geschädigte DNA-Strang wurde durch Umkehrphasen-HPLC und anschließende Anionentauscher-HPLC gereinigt. Mit diesem zweistufigen Isolierungs-/Reinigungsprotokoll wurde das Pt-GTG-geschädigte Oligonukleotid **3** mit einer Reinheit von über 98% isoliert.^[17] Um das Überlesen des Schadens durch Pol η zu untersuchen, wurden Primerverlängerungsstudien durchgeführt (Abbildung 2).

Der DNA-Strang **3** (18mer) mit dem Pt-GTG-Schaden und, als Kontrolle, derselbe Strang ohne Pt-GTG-Schaden wurden mit einem 5'-Fluorescein-markierten DNA-Primer hybridisiert. Die beiden DNA-Konstrukte wurden anschließend mit gereinigter Pol η aus *Saccharomyces cerevisiae* inkubiert. Dabei variierte die Konzentration der vier Nukleotidtriphosphate von 1 bis 1000 nm (Abbildung 2a). Die Reaktion wurde durch Gelektrophorese untersucht. Pol η verlängert das ungeschädigte DNA-Templat (Abbildung 2a), während eine komplette Verlängerung des geschädigten DNA-Templats nicht möglich ist. Dies wird durch kürzlich veröffentlichte Daten von humaner Pol η bestätigt.^[18] Pol η aus *S. cerevisiae* baut gegenüber vom Schaden die erste Base effizient ein, während eine Verlängerung um eine zweite Base nur gezwungenermaßen erfolgt.

Als nächstes interessierte uns, welche Base Pol η während des partiellen Überlesens einbaut. Dazu fügten wir dem Primerverlängerungssassay die einzelnen Triphosphate hinzu (Abbildung 2b,c). Die Daten zeigen, dass das Enzym gegenüberliegend zu 3'dG des Pt-GTG-Schadens korrekt ein dC einbaut. Der zweite Nukleotidyltransfer dagegen ist viel langsamer (Abbildung 2c), erfolgt bei höheren Enzymkonzentrationen aber dennoch (350 nm, Abbildung 2c, rechts). Während dieses Schrittes baut das Enzym entweder dA oder

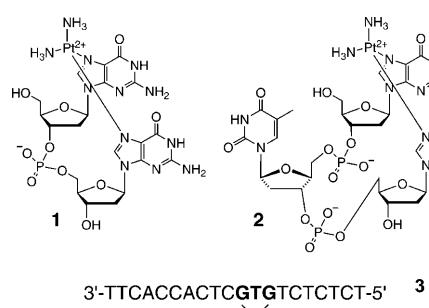


Abbildung 1. Strukturen des Cisplatin-(1,2-GG)-Schadens **1** und des Cisplatin-(1,3-GTG)-Schadens **2**. Darstellung der DNA-Sequenz **3**, die den Schaden **2** enthält.

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

[+] Diese Autoren haben gleichmäßig zur Publikation beigetragen.

[**] Wir danken dem Exzellenzcluster CiPS^M, dem SFB 646 und dem SFB 749 für die großzügige Unterstützung. T.R. dankt dem Boehringer-Ingelheim-Fonds für ein Promotionsstipendium, S.S. dankt dem Verband der chemischen Industrie (VCI) für ein Kekulé-Stipendium. Zudem danken wir den Wissenschaftlern an der Synchrotron-Lichtquelle Schweiz (SLS) und an der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) für ihre Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201000414> zu finden.

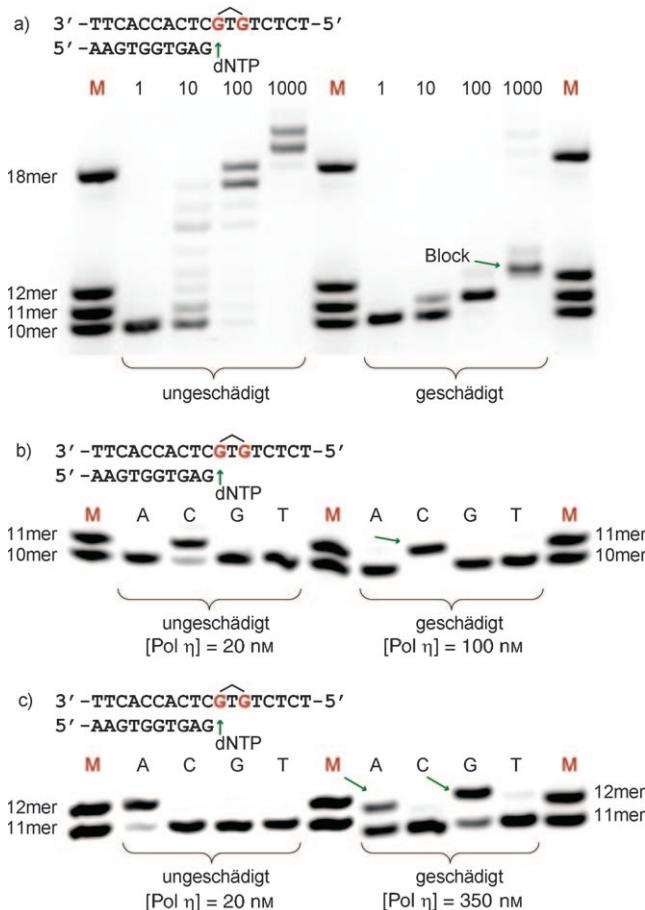


Abbildung 2. Primerverlängerungsstudie mit Pol η und Fluorescein-markierten Primern. a) Primerverlängerungsstudien in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration; Endkonzentrationen von 1–1000 nM Pol η mit einem Überschuss an Substrat (10 μ M Templat-DNA und 100 μ M Nukleotidtriphosphat) in 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol (DTT), pH 7.9. b) Korrekter Einbau von dC gegenüberliegend zu 3'dG des Pt-GTG-Schadens. c) Selektivität des Nukleotideinbaus gegenüberliegend zum zentralen dT des Schadens (entweder Einbau von dA oder dG).

dG ein, wobei dG bevorzugt wird. Für eine abasische Stelle ist dieser Effekt bekannt: Das Hefe-Enzym bevorzugt den Einbau von dG gegenüber dA, da dG eine bessere Basenstapelung eingeht.^[19] Nach diesem zweiten Verlängerungsschritt wird das Enzym blockiert (Abbildung 2a).

Um den Mechanismus der Inkorporation von zwei Basen durch Pol η gegenüberliegend zum drei Nukleobasen umfassenden Pt-GTG-Schaden zu untersuchen, haben wir Pol η aus *S. cerevisiae* zusammen mit einem Templat-Primer-Komplex, der einen Pt-GTG-Schaden im zweiten Verlängerungsschritt enthält, kristallisiert. Für das Experiment wurde der Primer mit einem 2',3'-Didesoxycytosin am Ende versehen. Die Di-desoxybase endet dabei direkt gegenüberliegend zum 3'dG des Pt-GTG-Schadens, um eine weitere Verlängerung durch die Polymerase zu verhindern. Die Kristallisation wurde mit dATP in der Kristallisationslösung durchgeführt. Kristalle des Enzyms im Komplex mit Pt-GTG und dATP in der aktiven Tasche beugten die Röntgenstrahlung bis 2.5 Å (detaillierte Informationen über Datensammlung, Auswertung und

Strukturverfeinerung sind in den Hintergrundinformationen zu finden). Die Struktur wurde durch Kombination der experimentellen Pt-SAD-Phasen (SAD = single-wavelength anomalous dispersion) mit den Phasen, die durch den molekularen Ersatz mit dem Apoenzym erhalten wurden, gelöst.^[20]

Abbildung 3a zeigt die Struktur des Komplexes mit der für die Y-Familie der DNA-Polymerasen typischen „Rechte-Hand-Struktur“ und einer zusätzlichen Polymerase-assoziierten Domäne (PAD).^[20] Ein Beispiel für die Elektronendichte des Pt-GTG-Schadens ist in Abbildung 3b zu sehen. In der Elementarzelle des Kristalls befinden sich zwei Komplexe A und B, die den DNA-Primer-Komplex in unterschiedlichen Konformationen zeigen (Abbildung 3c,d). Met74 befindet sich im Komplex A zwischen den Nukleotiden -2 (dC) und

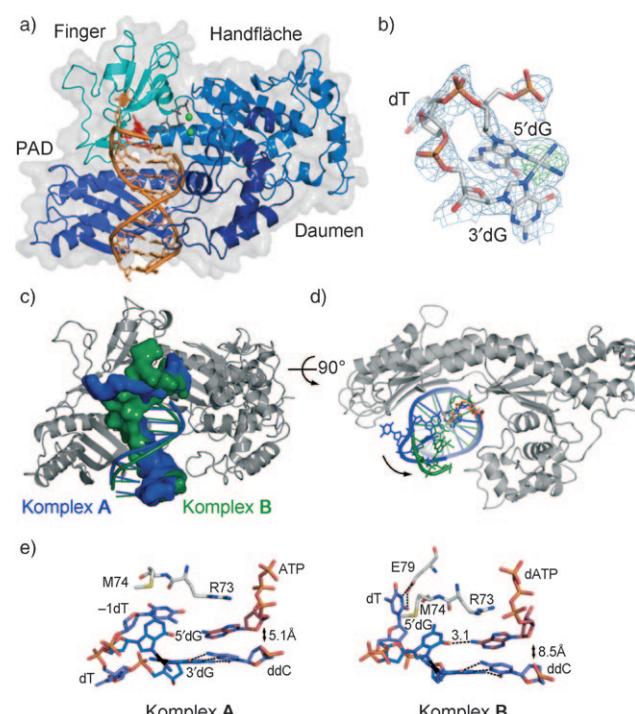


Abbildung 3. Kristallstruktur eines DNA(Templat-Primer)-Duplex mit einem Cisplatin-(1,3-GTG)-Schaden im Komplex mit Pol η . a) Gesamtstruktur des Komplexes mit dem Protein in Bänderdarstellung. Der Schaden ist als rotes und dATP als graues Stabmodell dargestellt. Die beiden für die Katalyse notwendigen Ca²⁺-Ionen sind als grüne Kugeln dargestellt. b) Elektronendichtekarte ($F_{\text{obs}} - F_{\text{calcd}}$) für den Pt-GTG-Schaden (Komplex B), konturiert mit 2 σ (blau); überlagert (grün) ist die anomale Differenz-Fourier-Elektronendichtekarte des Platin-Atoms (3 σ). Die beiden Guanine des Schadens sind mit einem internen Winkel von ca. 70° fixiert. c) Drehung der DNA um etwa ein Nukleotid in die aktive Tasche; Komplex A blau, Komplex B grün. d) Ansicht um 90° gedreht. Zur Veranschaulichung wurde die Finger-Domäne in der Bänderdarstellung entfernt. e) Detaillierte Ansicht der aktiven Taschen. Das 3'dG des Schadens bildet ein Watson-Crick-Basenpaar mit dem ddC-Ende des Primers. R73 fixiert von oben das hereinkommende dATP. In Komplex B ist die DNA weiter in die aktive Tasche des Enzyms gedreht, wobei Glu79 Wasserstoffbrücken zum zentralen, ungepaarten Thymin des Schadens bildet. Das 5'dG bildet eine H-Brücke mit dem dATP. Dies verursacht jedoch eine Vergrößerung des Abstands von 5.1 Å auf 8.5 Å zwischen der modellierten Hydroxygruppe und dem Nukleotid in der aktiven Tasche.

-1 (dT) des Pt-GTG-Schadens. In Komplex **B** dagegen ist dieses Methionin durch die Drehung der DNA um ein Nukleotid in die aktive Tasche zwischen dem 5'dG des Pt-GTG-Schadens und der -1 -Base (dT) positioniert (Abbildung 3e). Solche Schwefel-Aren-Wechselwirkungen stellen einen beträchtlichen Anteil an stabilisierender Dispersionsenergie bereit.^[21] Die konservierte Aminosäure Arg73, die durch die Stabilisierung für das Überlesen eines DNA-Schadens essenziell ist,^[12] stapelt in Abwesenheit einer Templatbase über dem hereinkommenden dATP. Dadurch wird das dATP für den nukleophilen Angriff durch die 3'OH-Gruppe des Primers fixiert (Abbildung 3e und Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen).

In beiden Komplexen **A** und **B** bildet das ddC-3'-Primerende mit dem 3'dG des Pt-GTG-Schadens ein ideales Watson-Crick-Basenpaar (Abbildung 3e). Die perfekte Watson-Crick-Basenpaarung ermöglicht den effektiven und korrekten Einbau von dCTP gegenüberliegend zum 3'dG-Teil von Pt-GTG während des ersten Replikationsschrittes. Die Pt-GTG-Verknüpfung verursacht eine starke Verformung der DNA, da das Platinatom die zwei Guanine mit einem internen Winkel von ca. 70° fixiert (Abbildung 3b). Das Hauptmerkmal der beschriebenen Struktur ist das zentrale Thymin des Schadens **2**. Es befindet sich nicht zwischen den beiden Guaninen, sondern ist komplett aus dem DNA-Doppelstrang herausgedreht und teilweise flexibel (Abbildung 3).^[10] Folglich ist das zentrale Thymin unfähig, den zweiten Verlängerungsschritt zu dirigieren, der nun gegenüberliegend zum 5'dG (Pt-GTG) erfolgt. Tatsächlich beobachten wir in der Kristallstruktur eine Wechselwirkung zwischen dem hereinkommenden dATP mit dem 5'dG-Teil des Schadens. Zusätzlich verhindert das herausgedrehte zentrale dT des Pt-GTG-Schadens eine weitere Bewegung des Enzyms entlang des Templat-Primer-Doppelstrangs. Dies erklärt, warum Pol η nach dem zweiten Verlängerungsschritt stoppt. Abbildung 4 zeigt die Blockade im Detail mit dem Protein des Komplexes als graue Oberfläche. Das zentrale dT des Pt-GTG-Schadens ist direkt vor dem Protein positioniert und verhindert somit jegliche weitere Bewegung der Polymerase entlang des DNA-Strangs.

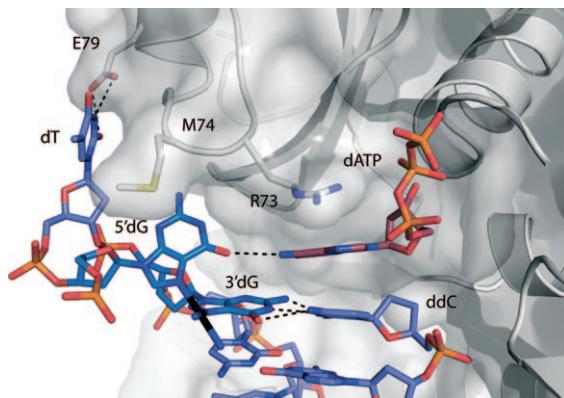


Abbildung 4. Großansicht der aktiven Tasche in Komplex **B**, überlagert mit der semitransparenten Oberfläche des Proteins. Met74 befindet sich zwischen dem zentralen dT und dem 5'dG des Schadens und verhindert dadurch eine weitere Bewegung der Polymerase entlang des DNA-Templatstrangs.

Die Kristallstruktur erklärt ebenfalls die Ineffizienz des zweiten Verlängerungsschrittes. Für eine effiziente Katalyse muss der Templat-Primer-Komplex von Komplex **A** in Komplex **B** drehen. In dieser Konformation ist der Primerstrang für den Angriff des Triphosphats korrekt positioniert. Die Triebkraft für die Drehung ist die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen dem hereinkommenden Triphosphat und der Templatbase. Die Drehbewegung **A** \rightarrow **B** ist nötig, weil dadurch der Abstand zwischen der 3'OH-Gruppe am Primer-Ende und dem α -Phosphat des dNTP verringert wird.^[12,22] In Komplex **B** befindet sich das Templat-Primer-Konstrukt in der korrekten Position für den Nukleotidyltransfer. Tatsächlich ist eine Wasserstoffbrücke (3.1 Å) zwischen dem NH₂(6) des hereinkommenden dATP und dem O(6) des 5'dG des Schadens vorhanden (Abbildung 3e). Jedoch ist der Abstand zwischen der modellierten 3'OH-Gruppe am Primer-Ende und dem α -Phosphat des dNTP nicht verringert, sondern von 5.1 Å (**A**) auf 8.5 Å (**B**) vergrößert. Der vergrößerte Abstand lässt sich durch die starke Verzerrung der DNA durch den Cisplatin-Schaden erklären. Ein Abstand von 8.5 Å ist definitiv zu weit für einen effizienten Nukleotidyltransfer. Zum Vergleich: In den „High-Fidelity“-Polymerasen des T7-Phagen^[23] und von *Bacillus stearothermophilus*^[24] beträgt der Abstand zwischen dem α -Phosphat und dem modellierten 3'OH des Primers ungefähr 3.5 Å.

Unsere Daten zeigen, dass die „Low-Fidelity“-Polymerase Pol η zwei Nukleobasen gegenüberliegend zum Pt-GTG-Schaden einbaut und somit ein Überlesen des Schadens ermöglicht. In der Kristallstruktur erkennt man, dass das herausgedrehte, zentrale dT des Pt-GTG-Addukts eine vollständige Replikation über den Schaden durch Pol η verhindert. Das dT kann durch seinen herausgedrehten Zustand nicht in der aktiven Tasche positioniert werden, wodurch die Bewegung der Polymerase entlang des Primer-Templat-Komplexes verhindert wird. Allerdings sind partiell überlesene Strukturen bekannte Substrate für DNA-Polymerase ζ . Die hier beschriebene partielle Replikation weist auf die Möglichkeit hin, dass sogar die stark Helix-verzerrenden Pt-GNG-Schäden durch die konzertierte Wirkung der beiden Polymerasen η und ζ *in vivo* überlesen werden können.

Eingegangen am 23. Januar 2010
Online veröffentlicht am 23. März 2010

Stichwörter: Cisplatin · DNA-Schäden · Translasiionssynthese · Tumortherapeutika · Polymerasen

- [1] D. Wang, S. J. Lippard, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 307–320.
- [2] Y. Jung, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1387–1407.
- [3] J. Reedijk, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, 1303–1312.
- [4] Z. H. Siddik, *Oncogene* **2003**, *22*, 7265–7279.
- [5] H. Zorbas, B. K. Keppler, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1157–1166.
- [6] E. R. Jamieson, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467–2498.
- [7] A. E. Egger, C. G. Hartinger, H. B. Hamidane, Y. O. Tsibin, B. K. Keppler, P. J. Dyson, *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 10626–10633.
- [8] A. M. Fichtinger-Schepman, J. L. van der Veer, J. H. den Hartog, P. H. Lohman, J. Reedijk, *Biochemistry* **1985**, *24*, 707–713.

- [9] S. Shachar, O. Ziv, S. Avkin, S. Adar, J. Witschibien, T. Reissner, S. Chaney, E. C. Friedberg, Z. Wang, T. Carell, N. Geacintov, Z. Livneh, *EMBO J.* **2009**, *28*, 383–394.
- [10] J. M. Teuben, C. Bauer, A. H. Wang, J. Reedijk, *Biochemistry* **1999**, *38*, 12305–12312.
- [11] A. M. Fichtinger-Schepman, H. C. van Dijk-Knijnenburg, S. D. van der Velde-Visser, F. Berends, R. A. Baan, *Carcinogenesis* **1995**, *16*, 2447–2453.
- [12] a) A. Alt, K. Lammens, C. Chiocchini, A. Lammens, J. C. Pieck, D. Kuch, K. P. Hopfner, T. Carell, *Science* **2007**, *318*, 967–970. Zur Struktur von Pt-GG-DNA im Komplex mit RNA-Polymerase II aus Hefe: b) G. E. Damsma, A. Alt, F. Brueckner, T. Carell, P. Cramer, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 1127–1133.
- [13] E. Bassett, A. Vaisman, J. M. Havener, C. Masutani, F. Hanaoka, S. G. Chaney, *Biochemistry* **2003**, *42*, 14197–14206.
- [14] E. Bassett, A. Vaisman, K. A. Tropea, C. M. McCall, C. Masutani, F. Hanaoka, S. G. Chaney, *DNA Repair* **2002**, *1*, 1003–1016.
- [15] C. Masutani, R. Kusumoto, S. Iwai, F. Hanaoka, *EMBO J.* **2000**, *19*, 3100–3109.
- [16] M. Wei, S. M. Cohen, A. P. Silverman, S. J. Lippard, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 38774–38780.
- [17] J. Butenandt, T. Burgdorf, T. Carell, *Synthesis* **1999**, 1085–1105.
- [18] S. Chijiwa, C. Masutani, F. Hanaoka, S. Iwai, I. Kuraoka, *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 388–393.
- [19] L. Haracska, M. T. Washington, S. Prakash, L. Prakash, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 6861–6866.
- [20] J. Trincao, R. E. Johnson, C. R. Escalante, S. Prakash, L. Prakash, A. K. Aggarwal, *Mol. Cell* **2001**, *8*, 417–426.
- [21] E. A. Meyer, R. K. Castellano, F. Diederich, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 1244–1287; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1210–1250.
- [22] E. Bassett, N. M. King, M. F. Bryant, S. Hector, L. Pendyala, S. G. Chaney, M. Cordeiro-Stone, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 6469–6475.
- [23] L. G. Brieba, B. F. Eichman, R. J. Kokoska, S. Doubbie, T. A. Kunkel, T. Ellenberger, *EMBO J.* **2004**, *23*, 3452–3461.
- [24] G. W. Hsu, J. R. Kiefer, D. Burnouf, O. J. Becherel, R. P. Fuchs, L. S. Beese, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 50280–50285.