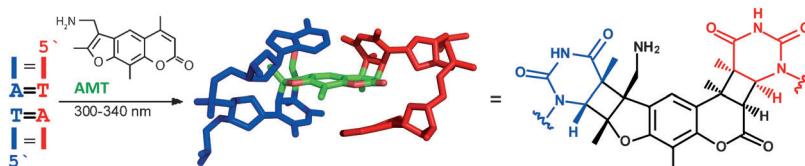


Photolyase-artige Reparatur Psoralen-quervernetzter Nucleinsäuren**

Thorsten Stafforst* und Donald Hilvert*

Psoralene sind pflanzliche Naturstoffe, die DNA und RNA lichtabhängig schädigen.^[1] Dazu interkalieren sie bevorzugt an 5'-d(TA) und 5'-r(UA) in den Doppelstrang und reagieren dort durch [2 + 2]-Photocycloaddition mit den Thymidin- bzw. Uridinbasen zu Cyclobutanen (Schema 1). Die Verknüpfung der beiden Stränge unterbindet ihre Entpaarung und bewirkt damit eine gravierende Störung fundamentaler biologischer Prozesse wie Replikation^[2] und Transkription.^[3]



Schema 1. Durch zwei aufeinanderfolgende [2 + 2]-Photocyclisierungen mit dem 5'-TA-Motiv vernetzt Aminomethyltrisorale (AMT) Strang und Gegenstrang der DNA. Die Konfiguration der resultierenden Quervernetzung ist dargestellt.^[1b]

Wegen dieser Eigenschaften erwiesen sich Psoralene als nützlich zur Aufklärung der Struktur und Funktion von Nucleinsäuren und zur Therapie von Psoriasis und anderen Hautkrankheiten.^[1,4]

Die Reparatur der hoch mutagenen Psoralenquervernetzung in der Zelle ist eine schwierige, komplexe Aufgabe, an der mehrere Reparaturwege beteiligt sind.^[5] Durch UV-Licht verursachte Läsionen, die sich als Intrastrang-Cyclobutan-pyrimidindimere (CPDs) manifestieren, hingegen werden recht einfach durch Nucleotidexzision oder durch einen lichtabhängigen Flavoenzym-katalysierten Prozess repariert.^[6] In letzterem Fall initiiert der photoinduzierte Elektronentransfer (PET) von einem reduzierten, deprotonierten Flavin-Cofaktor in der DNA-Photolyase die [2 + 2]-Cycloreversion des CPD, und nach Rücktransfer des Elektrons zum Cofaktor sind die beiden Pyrimidinmonomere regeneriert. Photolyaseaktivität wurde erfolgreich in kleinen Modellsystemen nachgeahmt, die den Flavinchromophor in die Nähe

von CPDs oder verwandten DNA-Schäden brachten.^[7] Obwohl die psoraleninduzierte Quervernetzung im Hinblick auf die Cyclobutanarchitektur durchaus Ähnlichkeit mit dem CPD-Schaden hat (Schema 1), wurde bislang keine Photolyase-artige Reparatur oder psoralenspezifische Photolyase beschrieben. Die lichtgesteuerte Öffnung der Psoralenquervernetzung wäre für eine Reihe von Photoaktivierungsanwendungen ausgesprochen nützlich,^[8] und so haben wir untersucht, ob sich die PET-Strategie auf die ortsselektive Reparatur solcher Schäden erweitern lässt.

Der Elektronentransfer ist stark abstandsabhängig. Daher ist es notwendig, den Elektronendonator in unmittelbare Nähe der Quervernetzung zu bringen.^[9] Hierfür sind Peptidnucleinsäuren (PNAs) eine attraktive Option. PNAs sind DNA-Analoga mit einem Pseudopeptidrückgrat aus neutralen, achiralen *N*-(2-Aminoethyl)glycinmonomeren.^[10] Sie hybridisieren mit hoher Affinität und Selektivität mit komplementärer einsträngiger

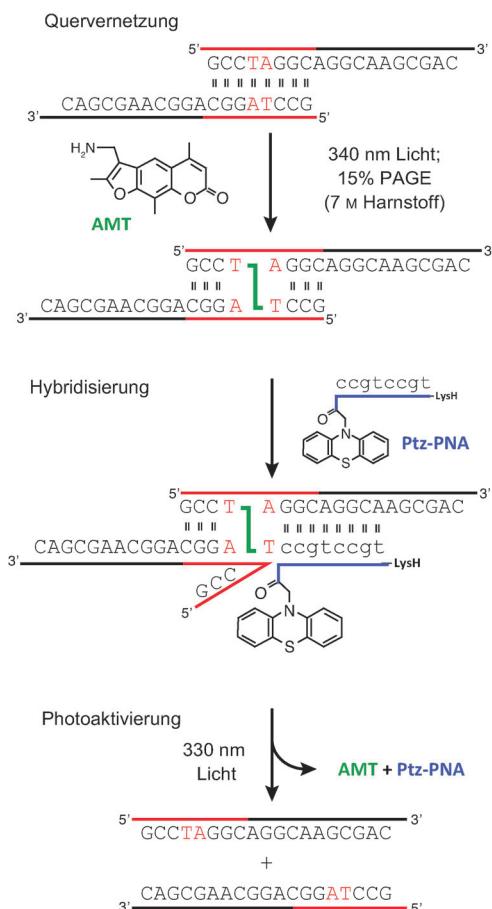
DNA und RNA und können sogar doppelsträngige Sekundärstrukturen aufbrechen.^[11] Folglich nahmen wir an, dass eine kurze, mit dem PET-Chromophor verknüpfte PNA diesen sequenzspezifisch an eine Quervernetzung adressieren und somit die gezielte Photoreparatur ermöglichen kann (Schema 2). Als Elektronendonator wählten wir ein Phenothiazin(Ptz)-Derivat, das im Gegensatz zum von natürlichen Photolyasen genutzten Flavin keine In-situ-Reduktion benötigt und besser anzuregen ist.^[12] Der Chromophor wurde in einen Fmoc-Aminoethylglycin-Baustein eingebracht und durch Festphasensynthese in PNA-Oligomere eingebaut (siehe Hintergrundinformationen).^[13]

Als Substrat für die Reparatur verwendeten wir ein partiell selbstpaarendes DNA-Oligomer, das eine einzelne Quervernetzung enthielt (Schema 2). Dieses wurde durch Belichten [(340 ± 10) nm, 7 h] von 5'-d(GCCTAGGCAGG-CAAGCGAC) in neutralem Tris-HCl-Puffer (50 mM, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, pH 7.5) bei konstanter Temperatur (4°C) in Gegenwart des Psoralenderivats AMT^[14] erzeugt. Der quervernetzte Duplex wurde mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) gereinigt und seine Zusammensetzung durch Massenspektrometrie bestätigt (Hintergrundinformationen, Abbildung S1). Angrenzend an die Quervernetzung lag die komplementäre Bindungsstelle für das PNA-Derivat tgcctgcc-Ptz, das zur Paarung in 1.3-fachem Überschuss bezogen auf die DNA-Bindungsstellen (20 ng μL⁻¹ = 1.7 μM) in Phosphatpuffer (10 mM, 100 mM NaCl, pH 7.0) zugesetzt wurde. Die Hybridisierung startete an einem kurzen, ungepaarten DNA-Abschnitt, von dem aus die PNA in den DNA-Duplex unter Verdrängen eines DNA-Strangs eindringen konnte. Aufgrund starker PNA-DNA-Wechsel-

[*] Dr. T. Stafforst, Prof. Dr. D. Hilvert
Laboratorium für Organische Chemie, ETH Zürich
Wolfgang-Pauli-Strasse 10, Zürich (Schweiz)
E-Mail: thorsten.stafforst@uni-tuebingen.de
hilvert@org.chem.ethz.ch
Homepage: <http://www.ifib.uni-tuebingen.de/forschung/stafforst.html>
<http://www.protein.ethz.ch>

[**] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina (Bundesministerium für Bildung und Forschung BMBF-LPD 9901/8-158) und der ETH Zürich großzügig unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201103611> zu finden.



Schema 2. Strategie zur Photoaktivierung durch Psoralen quervernetzter DNA. An einem spezifischen 5'-d(TA)-Motiv wird die AMT-Quervernetzung (grün) in ein teilweise selbstpaarendes DNA-Oligomer eingebracht (oben). Die komplementäre PNA (blau) bringt den Ptz-Chromophor zur Schadensstelle (Mitte). Belichtung des Komplexes bei 330 nm repariert den Schaden (unten).

wirkungen wurde selbst bei physiologischer Ionenstärke der Ptz-Chromophor neben die Quervernetzung platziert (Schema 2).

Nach der Inkubation (15 min) wurde die Photoaktivierung durch Belichten der Proben mit einer 75-W-Xenonlampe [(330 ± 20) nm, 310-nm-Kantenfilter] gestartet. In regelmäßigen Zeitabständen wurden Proben (5 µL = 100 ng) entnommen und der Fortschritt der Reaktion mittels PAGE analysiert (Abbildung 1 A). Durch Densitometrie wurde die Halbwertszeit für das Öffnen der Quervernetzung zu etwa 26 min bestimmt (Abbildung S3).

Die Reaktion ergab zunächst zwei Produkte, die nach PAGE-Reinigung massenspektrometrisch als das einsträngige DNA-Oligomer und ein Psoralenmonoaddukt identifiziert wurden (Hintergrundinformationen, Abbildung S4). Letzteres wird bei fortgesetzter Belichtung vollständig in Ersteres umgewandelt, was die exzellente Photoaktivierung unterstreicht. Kontrollexperimente belegten, dass die Reaktion weder in Abwesenheit der Ptz-PNA noch in Anwesenheit einer fehlpaarenden Ptz-PNA wie tgctcgcc-Ptz erfolgt (Abbildung 1 B). Folglich ist die sequenzspezifische Paarung eine zwingende Voraussetzung effizienter Photoaktivierung.^[15]

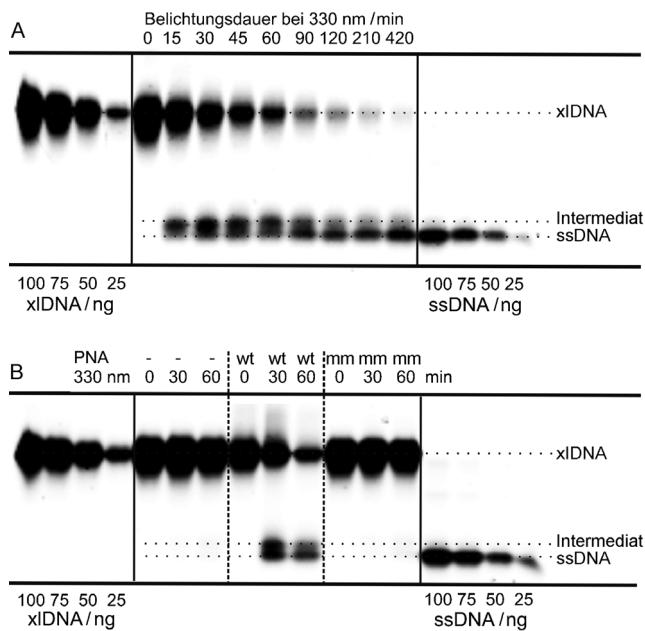
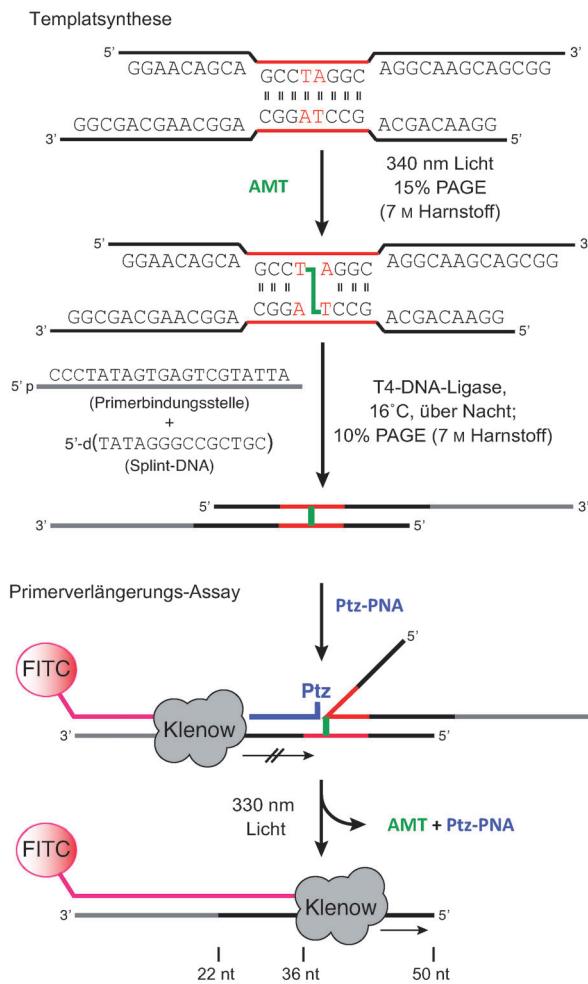


Abbildung 1. PET-induzierte DNA-Reparatur. A) Nach Paarung quervernetzter xIDNA (1.7 µM) mit tgctcgcc-Ptz (4.5 µM) in 10 mM Phosphatpuffer, 100 mM NaCl, pH 7.0, wurden die Proben mit monochromatischem Licht [(330 ± 20) nm, 20°C] bestrahlt. Kleine Mengen wurden regelmäßig entnommen, per denaturierender 15% PAGE (7 M Harnstoff) getrennt und mit SYBR-Gold angefärbt. Die xIDNA wird mit einer Halbwertszeit von 26 min zu einer Mischung aus unmodifizierter DNA (ssDNA) und einem Psoralenmonoaddukt umgesetzt (Densitometrie siehe Abbildung S3). B) Während vollkomplementäre Wildtyp (wt)-tgctcgcc-Ptz die Reparatur bewirkt, konnte kein Umsatz in deren Abwesenheit (–) oder in Gegenwart von fehlpaarenden tgctcgcc-Ptz (mm) beobachtet werden. Zur Abschätzung der Reparaturausbeuten wurden Verdünnungsreihen (25–100 ng) des Edukts (xIDNA) und des Endprodukts (ssDNA) aufgetragen.

Ein schlichter Primerverlängerungs-Assay mit einem einfach quervernetzten Templat illustriert den potenziellen Nutzen der Psoralenvernetzung/aktivierung für die Photosteuerung biochemischer Prozesse. Dazu wurde, wie in Schema 3 dargelegt, ein partiell selbstpaarendes 30 nt langes DNA-Oligomer mit AMT quervernetzt und mittels 15% PAGE (7 M Harnstoff) gereinigt. Durch Splint-Ligation wurde anschließend an beide 3'-Enden je eine 20 nt lange Primerbindungsstelle angebracht (siehe Hintergrundinformationen). Das Produkt, ein symmetrisches, 2 × 50 nt langes Konstrukt, war 36 nt stromabwärts quervernetzt; es wurde gereinigt (10% PAGE, 7 M Harnstoff) und massenspektrometrisch charakterisiert (Hintergrundinformationen, Abbildung S2). Es diente als Templat für die Verlängerung eines 5'-FITC-markierten Primers durch das Klenow-Fragment (3' → 5' exo⁻, New England Biolabs). Da die Polymerase nicht durch die Quervernetzung hindurch lesen kann, entstand anstelle des 50 nt langen Transkripts, das man bei einem freien Templat erhalten hätte, ein verkürztes, ca. 36 nt langes Transkript (Abbildung 2). Wurde das quervernetzte Templat mit tgctcgcc-Ptz versetzt und anschließend bei 330 nm belichtet, so erhielt man infolge der PET-induzierten Reparatur des Templat s wieder das 50-nt-Transkript. Die Abhängigkeit der relativen Mengen an kurzem und langem Transkript von der



Schema 3. Anwendung der Psoralen-Photoaktivierung in einem Primerverlängerungs-Assay. Oben: Ein 50-nt-Templat, 36 nt stromabwärts des 3'-Terminus einfach quervernetzt, wurde durch Splint-Ligation erzeugt. Unten: Nach Paarung mit einem 5'-FITC-markierten Primer (rosa) ergibt die Transkription mit dem Klenow-Fragment einen verfrühten Abbruch nach ca. 36 nt. Das vollständige 50-nt-Transkript wird hingegen gebildet, wenn das Templat zuvor mit der Ptz-PNA (blau) gepaart und bei 330 nm belichtet wurde.

Belichtungsdauer ist in Einklang mit der Reparaturkinetik, wie sie für das kürzere Templat beobachtet wurde (Abbildung 2A). Wie zu erwarten blieb die Reparatur des quervernetzten Templatzs in Gegenwart von fehlpaarendem *tgcctgcc*-Ptz aus (Abbildung S6). Folglich sollte es möglich sein, eine einzelne Quervernetzung sequenzspezifisch gezielt zu reparieren, auch wenn weitere Quervernetzungen vorhanden sind.

Wir haben hier gezeigt, dass Interstrang-Psoralenquervernetzungen mittels photoinduziertem reduktivem Elektronentransfer aufgebrochen werden können. Dies eröffnet den Zugang zu selektiven Photoaktivierungsanwendungen, die mit den derzeitigen Methoden nicht möglich sind.^[8] Obwohl heute mRNA, Plasmide und andere Nucleinsäuren durch stochastische Modifikation der Nucleobasen oder des Phosphatkürtzgrats mit Photoschutzgruppen blockiert werden können,^[16] limitiert eine hohe Restaktivität oder unvollstän-

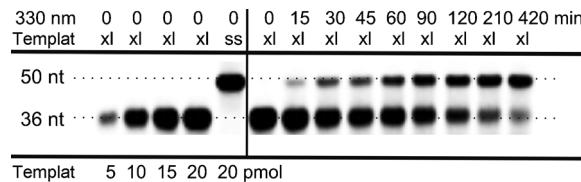


Abbildung 2. Primerverlängerungs-Assay. Das quervernetzte Templat wurde mit wt-*tgcctgcc*-Ptz inkubiert und mit monochromatischem Licht [(330 ± 20) nm, 20°C] 15–420 min vor Zugabe der Polymerase belichtet. Zur Kontrolle wurden Reaktionen mit dem quervernetzten (xl) und dem einsträngigen Templat (ss) ohne PNA und Licht durchgeführt. Die erhaltenen Produkte wurden mittels 15% PAGE (7 M Harnstoff) getrennt. Mit zunehmender Belichtungsdauer nahm die Menge des langen (50 nt) Produkts auf Kosten des kurzen (≤ 36 nt) zu, was auf die Umsetzung des xl- in das ss-Templat zurückzuführen ist. Die Densitometrie ergab, dass die Reaktion nach erster Ordnung mit einer Halbwertszeit von ca. 85 min erfolgt (Abbildung S5). Bedingungen: siehe Lit. [22].

dige Photoaktivierung oftmals die praktische Anwendung dieser Systeme. Im Fall von Intrastrang-Quervernetzungen des CPD-Typs wiederum schränkt die Leichtigkeit, mit der diese Läsionen repariert oder umgangen werden,^[17] ihre Eignung für das Photoaktivieren ein. Eine einzelne ortsselkative Psoralenquervernetzung in einem Plasmid^[18] oder Chromosom^[19] hingegen blockiert fundamentale biochemische Prozesse vollständig. Die Verwendung eines externen PET-Chromophors zur Reparatur von Psoralenquervernetzungen eröffnet einen Zugang zu einer einfachen, zielgerichteten Reaktivierung der durch die Vernetzung gestörten Prozesse. Da bereits PNAs zur hochaffinen Erkennung einer Reihe ein- und doppelsträngiger RNA- und DNA-Strukturen existieren,^[10,11] sollte es möglich sein, PET-PNAs zu entwickeln, die beinahe jeden beliebigen Psoralenschaden adressieren. Dabei kann die einfache Watson-Crick-Paarung genutzt werden, um die Reparatur gezielt an einen Ort zu lenken, ohne dass dabei andere Quervernetzungen beeinträchtigt werden. Dies garantiert ein Maß an Kontrolle, das mit den üblichen Photoschutzgruppen nicht zugänglich ist. Die Erweiterung der Strategie auf andere sequenzspezifische DNA-Binder wie triplexbildende Oligomere^[20] und Polyamide^[21] sowie auf weitere Chromophore etwa mit starker rotverschobener Absorption oder der Fähigkeit zur Zweiphotonenabsorption sollte die Nützlichkeit dieser Strategie weiter steigern.

Eingegangen am 26. Mai 2011
Online veröffentlicht am 29. August 2011

Stichwörter: DNA-Reparatur · Peptidnucleinsäuren · Photoaktivierung · Photolyasen · Psoralene

- [1] a) G. D. Cimino, H. B. Gamper, S. T. Isaacs, J. E. Hearst, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 1151; b) H. P. Spielmann, T. J. Dwyer, J. E. Hearst, D. E. Wemmer, *Biochemistry* **1995**, *34*, 12937.
- [2] S. Diviaco, V. Rapozzi, L. Xodo, C. Hélène, F. Quadrifoglio, C. Giovannangeli, *FASEB J.* **2001**, *15*, 2660.
- [3] a) Y.-H. Ping, T. M. Rana, *Biochemistry* **2005**, *44*, 2501; b) K.-H. Kim, X.-J. Fan, P. E. Nielsen, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 567.

- [4] J. F. Thompson, J. E. Hearst, *Cell* **1983**, *32*, 1355.
- [5] P. A. Muniandy, J. Liu, A. Majumdar, S.-T. Liu, M. M. Seidman, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2010**, *45*, 23.
- [6] a) A. Sancar, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2203; b) M. Müller, T. Carell, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 277.
- [7] a) O. Wiest, C. B. Harrison, N. J. Saettel, R. Cibulka, M. Sax, B. König, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 8183; b) T. Carell, J. Butenandt, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 1590; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1461; c) R. Epple, E.-U. Wallenborn, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7440; d) M. K. Cichon, S. Arnold, T. Carell, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 793; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 767; e) T. Stafforst, U. Diederichsen, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5502; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 5376; f) T. Ito, A. Kondo, S. Terada, S.-I. Nishimoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10934.
- [8] a) G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 5020; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900; b) X. Tang, I. Dmochowski, *Mol. BioSyst.* **2007**, *3*, 100.
- [9] R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Bioenerg.* **1985**, *811*, 265.
- [10] a) M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Nordén, P. E. Nielsen, *Nature* **1993**, *365*, 566; b) P. Wittung, P. E. Nielsen, O. Burchardt, M. Egholm, B. Nordén, *Nature* **1994**, *368*, 561.
- [11] Eine Übersicht bietet „*Pseudo-Peptides in Drug Discovery*“, (Hrsg.: P. E. Nielsen), Wiley-VCH, Weinheim, **2004**.
- [12] C. Wagner, H.-A. Wagenknecht, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 1871.
- [13] T. Stafforst, U. Diederichsen, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 681.
- [14] a) S. T. Isaacs, C.-K. J. Shen, J. E. Hearst, H. Rapoport, *Biochemistry* **1977**, *16*, 1058; b) H. Gamper, J. Piette, J. E. Hearst, *Photochem. Photobiol.* **1984**, *40*, 29.
- [15] Weiterführende mechanistische Studien könnten klären, ob das Elektron direkt auf den Photoschaden oder zunächst auf den DNA-Duplex übertragen wird: B. Giese, B. Carl, T. Carl, T. Carell, C. Behrens, U. Hennecke, O. Schiemann, E. Feresin, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 1884; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 1848.
- [16] a) W. T. Monroe, M. M. McQuain, M. S. Chang, J. S. Alexander, F. R. Haselton, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20895; b) H. Ando, T. Furuta, R. Y. Tsien, H. Okamoto, *Nat. Genet.* **2001**, *28*, 317; c) S. Shah, S. Rangarajan, S. H. Friedman, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1352; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1328.
- [17] M. Ogino, D. Okamura, K. Fujimoto, *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2007**, *8*, 318.
- [18] a) W. A. Saffran, M. Goldenberg, C. R. Cantor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 4594; b) M. Raha, G. Wang, M. M. Seidman, P. M. Glazer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 2941; c) G. Wang, D. D. Levy, M. M. Seidman, P. M. Glazer, *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 1759.
- [19] a) A. Majumdar, A. Khorlin, N. Dyatkina, F.-L. M. Lin, J. Powell, J. Liu, Z. Fei, Y. Khrapine, K. A. Watanabe, J. George, P. M. Glazer, M. M. Seidman, *Nat. Genet.* **1998**, *20*, 212; b) K.-H. Kim, P. E. Nielsen, P. M. Glazer, *Biochemistry* **2006**, *45*, 314; c) A. K. Thazhathveetil, S.-T. Liu, F. E. Indig, M. M. Seidman, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 431; d) K.-H. Kim, P. E. Nielsen, P. M. Glazer, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 7604.
- [20] N. T. Thuong, C. Hélène, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 697; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 666.
- [21] P. B. Dervan, B. S. Edelson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, *13*, 284.
- [22] Experimentelle Bedingungen für Abbildung 2: PET-induzierte Reparatur: $[xIDNA] = 1.7 \mu\text{M}$, $[PNA] = 4.3 \mu\text{M}$ in 10 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, pH 7.9. Transkription: 20 pmol 5'-FITC-T7forw-Primer, 6 μL PET-Reparatur-Mix, 250 μM eines jeden dNTP, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 0.75 μL Klenow-Fragment, alles in 10 mM Tris/HCl, 50 mM NaCl, pH 7.9, Gesamtvolumen 10 μL , 55°C für 45 s, 42°C für 1 h. PAGE: Die Proben (10 μL) wurden mit 10 μL 1 × TBE-Puffer (89 mM Tris-Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, 7 M Harnstoff, 3% Formaldehyd) versetzt und vor dem Gelstart 5 min auf 90°C erhitzt.