

DNA-Reparatur

Thomas Carell*

Biochemie · DNA-Reparatur · DNA-Schäden ·
Genetische Information · Medizinische Chemie

Die DNA-Doppelhelix kodiert die genetische Information von fast allen Organismen auf der Welt. Durch Friedrich Miescher wurden 1869 die Nukleinsäuren, welche er Nuklein nannte, entdeckt. Erwin Chargaff entschlüsselte die Grundbausteine der DNA als Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T) und beschrieb die heutzutage bekannten Chargaff-Regeln, welche die Zusammensetzung der Basen A und T sowie G und C in einem Verhältnis von jeweils 1:1 beschreiben.^[1] Diese Entdeckungen, zusammen mit röntgenspektroskopischen Daten von Rosalind Franklin und Maurice Wilkins, legten den Grundstein für die Entdeckung der berühmten DNA-Doppelhelixstruktur, welche von James Watson und Francis Crick aufgeklärt wurde.^[2] Basierend auf dieser Struktur konzipierten sie die molekularen Prinzipien der komplementären Basenpaarung, welche die Basis der präzisen Replikation des DNA-Duplex sind. Schließlich wird dadurch sichergestellt, dass die genetische Information von Generation zu Generation weitergegeben werden kann.

Seit der Entdeckung der DNA-Doppelhelixstruktur stellte sich immer die Frage, wie dieses komplexe Molekül in der Lage ist, Informationen sicher zu speichern. Selbst wenn die Replikationsmaschinerie, welche die DNA durch Paarung von A mit T und G mit C vervielfältigt, nur einen Fehler pro einer Millionen aufeinanderfolgende Schritte macht, würde das immer noch zu tausenden Fehlpaarungen bei z. B. einem ganzen menschlichen Genom von 10^9 Basen führen. Selbst wenn die Halbwertszeit von z. B. Cytosin, welches leicht zu Uracil deaminieren kann, eine Millionen Jahre wäre, so würde man bei einem humanen Genom von 10^9 Basen, in dem jede vierte Base ein Cytosin ist, tausende Deaminierungsreaktionen pro Tag und Zelle erwarten.^[3] Des Weiteren ist das Erbgut von Mitochondrien umgeben, welche reaktive Sauerstoffspezies (ROS) generieren können. Einige dieser reaktiven Spezies können die DNA angreifen und eine Vielzahl an oxidativen Schäden produzieren. Weiterhin kann die DNA durch UV-Licht ($\lambda < 300$ nm), welches Teil des Sonnenlichts ist, zu sogenannten DNA-Photoschäden degradiert werden. Zusammengefasst führen alle diese Läsionen zu einem ständigen Verlust genetischer Information. Im Endeffekt würden diese Vorgänge verhindern, dass ein DNA-Duplex

den Bauplan eines komplexen Lebewesens, z. B. des Menschen, kodieren kann.

An diesem Punkt kommt die DNA-Reparatur ins Spiel, für deren Erforschung der diesjährige Nobelpreis für Chemie an Tomas Lindahl (Basenexzisionsreparatur), Paul Modrich (Mismatch-Reparatur) und Aziz Sancar (Reparatur chemisch komplexer Schäden) vergeben wurde. Diese Forscher sind Pioniere im Feld der DNA-Reparatur. Sie klärten zentrale biochemische Prozesse auf, welche die DNA ständig nach auftretenden Schäden durchsuchen. Sobald ein Schaden entdeckt wird, lösen die Reparatursysteme eine Serie von Vorgängen aus, welche letzten Endes zur Entfernung der beschädigten Base aus dem DNA-Duplex und zur Wiederherstellung der genetischen Information führen.

Tomas Lindahl erkannte früh, dass die DNA, obwohl überraschend robust, viel zu fragil ist, um ihre Funktion als genetisches Speichermedium zu erfüllen.^[3,4] Daraus folgte er, dass so etwas wie eine DNA-Reparatur existieren muss. Tomas Lindahl arbeitete größtenteils an der Basenexzisionsreparatur (BER), welche beschädigte Basen aus dem Genom entfernt. Das BER-System stützt sich auf unterschiedliche schadensspezifische DNA-Glykosylasen.^[5] Diese Enzyme erkennen entweder eine spezifische Läsion oder eine kleine Gruppe von DNA-Schäden, welche ein gemeinsames Strukturmotiv besitzen. Die Enzyme setzen dabei einen ausgefeilten molekularen Erkennungsmechanismus ein, der es ihnen erlaubt, beschädigte von unbeschädigten Basen zu unterscheiden. Bis dato sind viele dieser Glykosylasen bekannt, und für die meisten gibt es sogar Kristallstrukturen zusammen mit ihren jeweiligen Substraten.^[6] Tomas Lindahl entdeckte vor allem die Uracil-Glykosylase, welche fehlgepaartes Uracil aus einem U:G-Basenpaar, in dem die Base C zu U deaminiert wurde, entfernt (Abbildung 1).^[7] Andere Glykosylasen sind z. B. das humane Protein hOGG1, das 8-oxo-dG entfernt,^[8] und die bakterielle Glykosylase MutM, die FaPy-dG-Schäden aus dem Genom ausschneidet (Abbildung 2).^[9] Diese beiden Verbindungen werden jeweils nach einer oxidativen Schädigung der Guanin-Base gebildet.^[10] Andere Reparatur-Glykosylasen, wie z. B. MBD4^[11] oder die Thymin-DNA-Glykosylase (TDG),^[12] können T:G-Fehlpaarungen erkennen. Sie entfernen die Base T nach z. B. erfolgter Deaminierung von 5mC. Alle diese Glykosylasen verwenden einen mehr oder weniger gleichen Reparaturmechanismus, welcher das Herausdrehen der beschädigten Base aus dem Duplex in das aktive Zentrum des Enzyms beinhaltet.^[13] Ein Nukleophil im aktiven Zentrum greift dann das C1'-Kohlenstoffatom der glykosidischen Bindung an, wobei diese ge-

[*] Prof. Dr. T. Carell

Center for Integrated Protein Science, CiPS^M, Department für Chemie, Ludwig-Maximilians Universität München
Butenandtstraße 5-13, 81377 München (Deutschland)
E-Mail: thomas.carell@lmu.de
Homepage: <http://www.carellgroup.de>

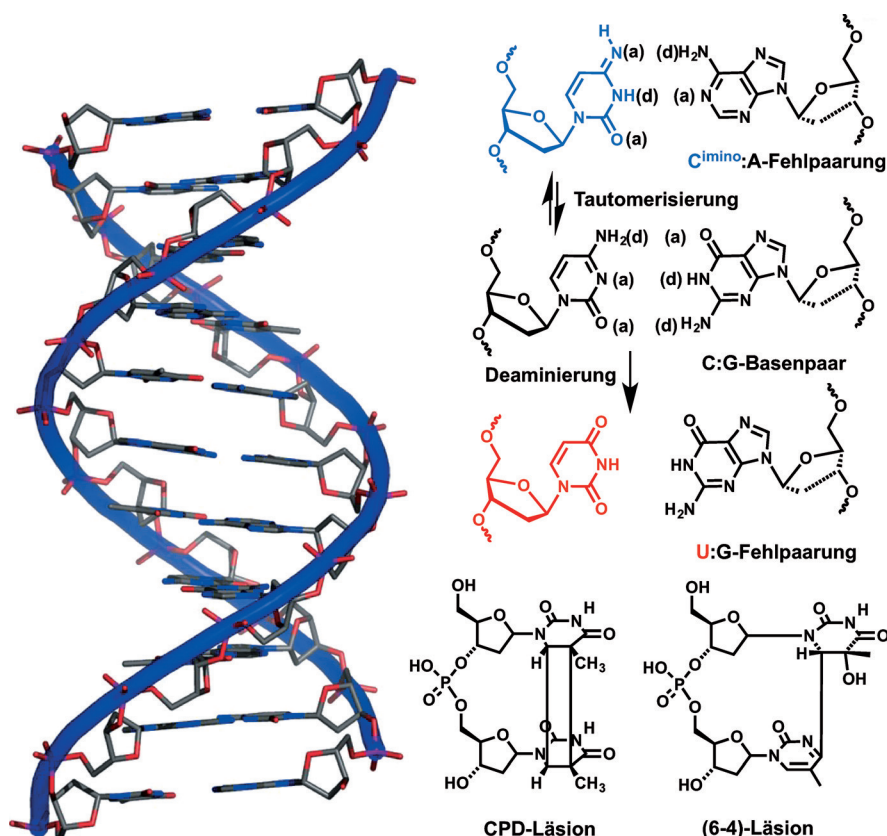


Abbildung 1. Links: DNA-Doppelhelix (B-Form) mit Zucker-Phosphodiester-Rückgrat (blau) und zueinander gerichteten DNA-Basen. Rechts: G:C-Basenpaar (schwarz). Die Base C kann zu U deaminieren, wobei eine U:G-Fehlpaarung entsteht. Diese wird durch die Uracil-DNA-Glykoxylase (UDG) repariert. Die Base U ist rot gezeichnet. Die Base C kann des Weiteren tautomerisieren, und diese Form (blau) ist dann in der Lage, mit A unter Bildung eines C^{imino}:A-Basenpaares zu reagieren, welches durch das Mismatch-Reparatursystem, in Bakterien bestehend aus MutS, MutH und MutL, entfernt wird. Des Weiteren sind die UV-induzierten Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) und die (6-4)-Schäden gezeigt.

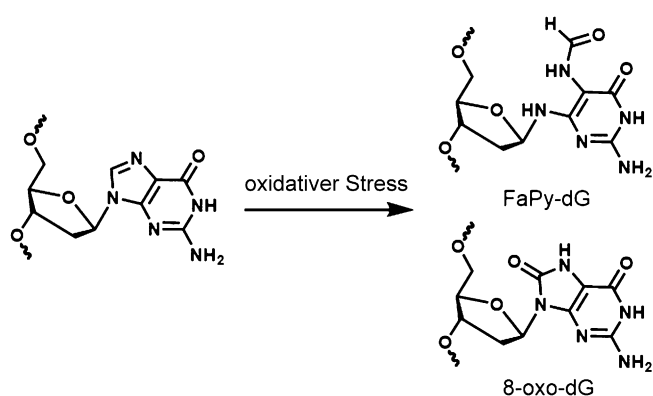


Abbildung 2. Oxidativer Stress: Die Reaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies führt zur Bildung von 8-oxo-dG- und FaPy-dG-Läsionen.^[10a]

brochen und das kovalente DNA-Glykosylase-Addukt unter Ausbildung einer abasischen Stelle hydrolysiert wird. Diese abasischen Stellen werden wiederum von Endonukleasen erkannt, welche daraufhin die Phosphodiesterbindung schneiden und somit eine Lücke erzeugen, die schließlich durch Einfügen einer neuen Base wieder geschlossen wird. Die Basenexzisionsreparatur ist ein vielseitiges Reparatursystem, welches viele Schäden aus unserem Genom relativ

direkt entfernt. Dieser Mechanismus schützt unser Genom vor Schäden, welche durch Deaminierung, Alkylierung und oxidativen Stress entstehen. Alle diese Schäden haben jedoch nur einen geringen deformierenden Einfluss auf den DNA-Duplex.

Paul Modrich war ein Wegbereiter im Bereich der Mismatch-Reparatur, welche ein komplexer DNA-Reparaturmechanismus ist, der fehlgepaarte Basen, die während der Replikation durch das Enzym DNA-Polymerase erzeugt werden, eliminiert.^[14] Die Basis dieser Schäden auf chemischer Ebene ist dabei oft eine Tautomerisierung der DNA-Base. DNA-Basen können in unterschiedlichen tautomeren Formen vorliegen, und obwohl die Formen, die für die Ausbildung von Watson-Crick-Basenpaaren verantwortlich sind, mit Abstand die stabilsten sind, können andere Tautomere der DNA-Basen ebenfalls vorkommen. Sollten diese während der Replikation in der DNA-Polymerase vorhanden sein, kann es zu einer Fehlinkorporation der Gegenbase während der Elongationsphase kommen. Ein berühmtes Beispiel ist die DNA-Base Cytosin (Abbildung 1). Das am häufigsten vorkommende Tautomer besitzt eine Anordnung H-Brücken-Donor (d)/H-Brücken-Akzeptor (a)/H-Brücken-Akzeptor (a), welche eine Watson-Crick-Basenpaarung mit Guanin und dessen komplementärer (a)-(d)-(d)-Wasserstoffbrückenanordnung eingehen kann. Wenn Cytosin jedoch zur Imino-

Form tautomerisiert, entsteht eine Anordnung (a)-(d)-(a), welche eine Fehlpaarung mit dem (d)-(a)-Motiv von Adenin eingehen kann. DNA-Polymerasen sind überraschend tolerant bezüglich solcher Fehlpaarungen. Vor kurzem wurden sogar Kristallstrukturen einer tautomerisierten DNA-Base im aktiven Zentrum einer DNA-Polymerase veröffentlicht.^[15]

Da bei Fehlpaarungen zwischen dem (alten) DNA-Strang, welcher das Templat für die DNA-Replikation enthält, und dem neu synthetisierten Strang, in dem der Fehler entstanden ist, unterschieden werden muss, ist die Mismatch-Reparatur ein komplizierter Prozess. Wichtig dabei ist, dass das Reparatursystem entscheiden muss, ob es die Base C oder A, wie es im obigen Beispiel der Fall ist, aus der Fehlpaarung entfernt. Obwohl der Prozess der Strangerkennung noch nicht komplett aufgeklärt ist, ist er am weitesten entschlüsselt in Bakterien. Die drei Enzyme MutS,^[16] MutH und MutL werden in diesem Fall für die Reparaturreaktion verwendet. Diese Enzyme nutzen die Tatsache aus, dass manche Adenin-Basen an Position N6 methyliert sind.^[17] Während der Replikation der DNA fehlt dem neu synthetisierten Tochterstrang dieses Methylierungsmuster, wodurch das Reparatursystem diesen erkennen kann. Während der Mismatch-Reparatur bindet das bakterielle MutS (als Dimer, (MutS)₂) die fehlgepaarte Base und MutH bindet den hemimethylierten Strang. MutL übernimmt dabei eine Mediatorfunktion zwischen MutS und MutH, wobei diese in räumliche Nähe gebracht werden, um dadurch MutH zu aktivieren. Daraufhin wird das Phosphordiesterückgrat in unmittelbarer Umgebung der Fehlpaarung des unmethylierten Strangs geschnitten. Der gesamte Enzymkomplex verschiebt sich daraufhin entlang des Duplex, um ein ganzes Stück DNA um die Fehlpaarung herum zu

entfernen, wobei eine einzelsträngige Lücke entsteht. Es folgt eine De-novo-DNA-Synthese, bei der diese Lücke aufgefüllt und schließlich die Enden verbunden werden. In Menschen ist der Mechanismus der Mismatch-Reparatur immer noch Gegenstand aktueller Forschung.^[18]

Aziz Sancar ist ein Pionier im Bereich von DNA-Reparaturprozessen, die dazu da sind, chemisch komplexe DNA-Schäden wie z. B. UV-induzierte Schäden zu reparieren.^[19] Es existieren speziell für UV-Schäden Reparaturenzyme, welche in der Lage sind, diese direkt in doppelsträngiger DNA zu reparieren. Diese Reparaturenzyme sind die CPD- und (6-4)-Photolyasen.^[19b] Mit diesen Enzymen wird es Bakterien ermöglicht, selbst nach langer Exposition von UV-Licht in Gegenwart von langwelligem Sonnenlicht zu überleben. Dieser als Photoreaktivierung bezeichnete Prozess ist außerdem wichtig in Pflanzen.^[20] Durch UV-Strahlung werden aus zwei benachbarten T-Basen entweder durch eine $[2\pi+2\pi]$ -Cycloaddition in einem sehr schnellen Vorgang^[21] Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) oder über eine Paternó-Büchi-Reaktion die (6-4)-Photoaddukte gebildet (Abbildung 1). Um diese Dimere zu reparieren, führen die DNA-Photolyasen einen komplizierten Reparaturprozess durch, welcher auf Energie- und Elektronentransfervorgängen basiert.^[19b] Photolyasen beinhalten zwei Kofaktoren, von denen einer (entweder ein Methenyltetrahydrofolat oder ein Deazaflavin) Licht der Wellenlänge 350–400 nm absorbiert und die Anregungsenergie durch einen Förster-Mechanismus auf ein reduziertes und deprotoniertes Flavin (FADH^-), welches im aktiven Zentrum vorhanden ist, überträgt. Kristallstrukturen von Photolyasen^[22] und Kokristallstrukturen der CPD-^[23] und (6-4)-Photolyasen^[24] (Abbildung 3) mit DNA, die ei-

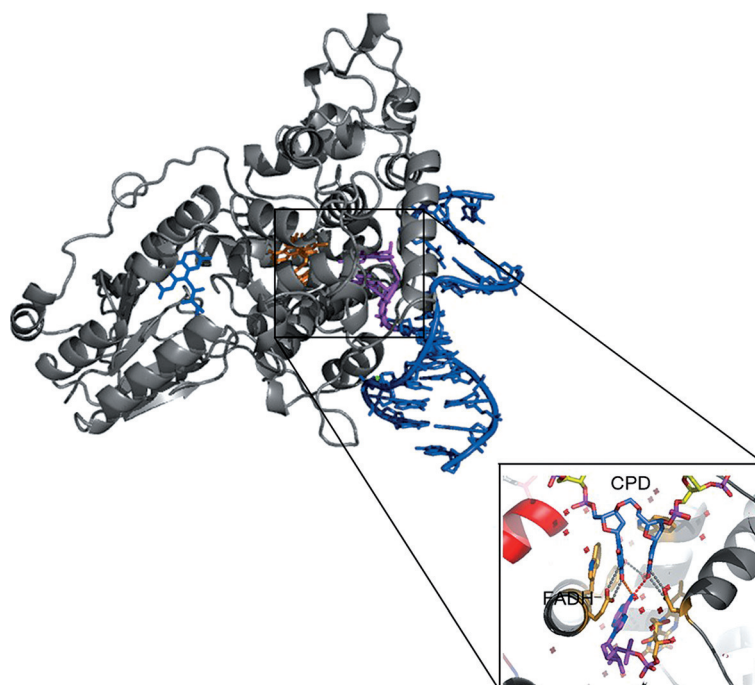


Abbildung 3. Kristallstruktur der CPD-Photolyase (grau) mit dem Deazaflavin-Kofaktor F_{420} (blau) und dem FAD-Kofaktor (orange). Der DNA-Duplex ist dunkelblau gezeichnet, mit der herausgedrehten CDP-Läsion (magenta), welche sich zwischen den DNA-Basen T7 und T8 bildet. Das aktive Zentrum ist durch den Kasten hervorgehoben. Unten rechts: Blick in das aktive Zentrum, welches den reparierten CPD-Schaden im Komplex mit FADH^- zeigt. Das FADH^- hat eine U-Konformation.^[22a,23] Einige Wassermoleküle sind ebenfalls im aktiven Zentrum vorhanden (+).

nen Schaden enthielt, konnten zeigen, dass die Enzyme das gesamte Dinukleotid aus den Duplex in das aktive Zentrum herausdrehen, um es in räumliche Nähe des FADH⁺ zu bringen. Der Schlüsselschritt in diesem Reparaturprozess ist dabei ein Elektronentransport vom FADH⁺ zum Schaden, welcher daraufhin sofort zu Thymin-Monomeren zerfällt.

Obwohl Mismatch-Reparatur, Basenexzisionsreparatur und Photoreaktivierung zentrale Elemente von genomischen Reparatursystemen sind, besitzen die meisten Spezies in der Natur, Menschen inbegriffen, zusätzlich ein weiteres, komplexes Reparatursystem, welches Nukleotidexzisionsreparatur (NER) genannt wird. Dieses Reparatursystem, welches ebenfalls u.a. von A. Sancar ausführlich untersucht wurde, entfernt nicht nur UV-Schäden,^[25,26] sondern auch eine Reihe von Bulky-Addukt- und Cisplatin-Schäden, welche während der Chemotherapie mit Cisplatin entstehen, aus dem Genom. Dazu wird ein kompliziertes Zusammenspiel vieler Proteine benötigt.^[27] Heutzutage unterscheiden wir zwischen globalen NER-Prozessen^[28] und NER-Prozessen, die an die Transkription gekoppelt sind,^[29] und wir verstehen, dass Defizite des NER-Systems, in welchem Unterkompartiment auch immer, besonders für uns Menschen extrem schädlich sind.^[30] Die Proteine, die sowohl in globaler als auch in transkriptionsgekoppelter NER eine Rolle spielen, sind mittlerweile identifiziert. Ihre molekularen Details, die letztendlich zur Schadenserkenkung führen, sind jedoch immer noch nicht komplett verstanden. Kürzlich erschienene Kristallstrukturen der Schlüsselproteine der NER im Komplex mit spezifischen DNA-Schäden geben jedoch nach und nach Einblicke, wie diese unterschiedlichen Schäden erkannt werden.^[31–33] Die Historie der Entdeckung des NER-Reparaturprozesses ist spannend. Interessierten Lesern sei ein früher exzellenter Übersichtsartikel zu diesem Thema ans Herz gelegt.^[34]

Danksagung

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die großzügige Unterstützung durch die Zuschüsse SPP1784 (CA275/10-1), SFB749 (A5), SFB646 (B1), SFB1032 (A4).

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 15330–15333
Angew. Chem. **2015**, *127*, 15546–15549

- [1] a) E. Chargaff, *Science* **1971**, *172*, 637–642; b) R. Dahm, *Hum. Genet.* **2008**, *122*, 565–581.
- [2] J. D. Watson, F. H. Crick, *Nature* **1953**, *171*, 737–738.
- [3] T. Lindahl, B. Nyberg, *Biochemistry* **1974**, *13*, 3405–3410.
- [4] a) T. Lindahl, A. Andersson, *Biochemistry* **1972**, *11*, 3618–3623; b) T. Lindahl, B. Nyberg, *Biochemistry* **1972**, *11*, 3610–3618; c) T. Lindahl, O. Karlstrom, *Biochemistry* **1973**, *12*, 5151–5154.
- [5] T. Lindahl, *Nature* **1976**, *259*, 64–66.
- [6] a) R. Savva, K. McAuley-Hecht, T. Brown, L. Pearl, *Nature* **1995**, *373*, 487–493; b) S. S. Parikh, C. D. Putnam, J. A. Tainer, *Mutat. Res.* **2000**, *460*, 183–199; c) J. C. Fromme, A. Banerjee, G. L. Verdine, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 43–49.
- [7] T. Lindahl, S. Ljungquist, W. Siebert, B. Nyberg, B. Sperens, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 3286–3294.
- [8] A. Klungland, M. Hoss, D. Gunz, A. Constantinou, S. G. Clarkson, P. W. Doetsch, P. H. Bolton, R. D. Wood, T. Lindahl, *Mol. Cell* **1999**, *3*, 33–42.
- [9] F. Coste, M. Ober, T. Carell, S. Boiteux, C. Zelwer, B. Castaing, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 44074–44083.
- [10] a) J. Cadet, T. Douki, J. L. Ravanat, *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41*, 1075–1083; b) J. Cadet, T. Douki, J. L. Ravanat, *Hum. Genet.* **2010**, *49*, 9–21.
- [11] B. Hendrich, U. Hardeland, H. H. Ng, J. Jiricny, A. Bird, *Nature* **1999**, *401*, 301–304.
- [12] P. Gallinari, J. Jiricny, *Nature* **1996**, *383*, 735–738.
- [13] a) A. R. Dinner, G. M. Blackburn, M. Karplus, *Nature* **2001**, *413*, 752–755; b) K. Sadeghian, D. Flaig, I. D. Blank, S. Schneider, R. Strasser, D. Stathis, M. Winnacker, T. Carell, C. Ochsenfeld, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 10044–10048; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 10208–10212.
- [14] R. R. Iyer, A. Pluciennik, V. Burdett, P. L. Modrich, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 302–323.
- [15] W. Wang, H. W. Hellinga, L. S. Beese, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 17644–17648.
- [16] J. J. Warren, T. J. Pohlhaus, A. Changela, R. R. Iyer, P. L. Modrich, L. S. Beese, *Mol. Cell* **2007**, *26*, 579–592.
- [17] a) A. L. Lu, S. Clark, P. Modrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 4639–4643; b) P. J. Pukkila, J. Peterson, G. Herman, P. Modrich, M. Meselson, *Genetics* **1983**, *104*, 571–582.
- [18] J. Pena-Diaz, J. Jiricny, *Trends Biochem. Sci.* **2012**, *37*, 206–214.
- [19] a) A. Sancar, C. S. Rupert, *Gene* **1978**, *4*, 295–308; b) A. Sancar, *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 2203–2237.
- [20] a) A. Kelner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1949**, *46*, 73–79; b) R. Dulbecco, *Nature* **1949**, *163*, 949.
- [21] W. J. Schreier, T. E. Schrader, F. O. Koller, P. Gilch, C. E. Crespo-Hernandez, V. N. Swaminathan, T. Carell, W. Zinth, B. Kohler, *Science* **2007**, *315*, 625–629.
- [22] a) H. W. Park, S. T. Kim, A. Sancar, J. Deisenhofer, *Science* **1995**, *268*, 1866–1872; b) T. Tamada, K. Kitadokoro, Y. Higuchi, K. Inaka, A. Yasui, P. E. de Ruiter, A. P. Eker, K. Miki, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 887–891.
- [23] A. Mees, T. Klar, P. Gnau, U. Hennecke, A. P. Eker, T. Carell, L. O. Essen, *Science* **2004**, *306*, 1789–1793.
- [24] M. J. Maul, T. R. Barends, A. F. Glas, M. J. Cryle, T. Domratheva, S. Schneider, I. Schlichting, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10076–10080; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 10230–10234.
- [25] J. T. Reardon, A. Sancar, *Genes Dev.* **2003**, *17*, 2539–2551.
- [26] J. H. Hoeijmakers, *Nature* **2001**, *411*, 366–374.
- [27] W. L. de Laat, N. G. Jaspers, J. H. Hoeijmakers, *Genes Dev.* **1999**, *13*, 768–785.
- [28] L. C. Gillet, O. D. Scharer, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 253–276.
- [29] P. C. Hanawalt, G. Spivak, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 958–970.
- [30] E. C. Friedberg, *Nat. Rev. Cancer* **2001**, *1*, 22–33.
- [31] J. H. Min, N. P. Pavletich, *Nature* **2007**, *449*, 570–575.
- [32] a) E. S. Fischer, A. Scrima, K. Bohm, S. Matsumoto, G. M. Lingaraju, M. Faty, T. Yasuda, S. Cavadini, M. Wakasugi, F. Hanaoka, S. Iwai, H. Gut, K. Sugawara, N. H. Thoma, *Cell* **2011**, *147*, 1024–1039; b) A. Scrima, R. Konickova, B. K. Czyzewski, Y. Kawasaki, P. D. Jeffrey, R. Groisman, Y. Nakatani, S. Iwai, N. P. Pavletich, N. H. Thoma, *Cell* **2008**, *135*, 1213–1223.
- [33] S. C. Koch, J. Kuper, K. L. Gasteiger, N. Simon, R. Strasser, D. Eisen, S. Geiger, S. Schneider, C. Kisker, T. Carell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 8272–8277.
- [34] P. C. Hanawalt, R. H. Haynes, *Sci. Am.* **1967**, *216*, 36–43.

Eingegangen am 19. Oktober 2015

Online veröffentlicht am 19. November 2015

Übersetzt von René Rahimoff, München