

Fehlpaarungsreparatur

Deutsche Ausgabe: DOI: 10.1002/ange.201601412
Internationale Ausgabe: DOI: 10.1002/anie.201601412Mechanismen der Fehlpaarungsreparatur in *E. coli* und im Menschen (Nobel-Aufsatz)**

Paul Modrich*

Basenfehlpaarung · DNA-Reparatur · Endonukleasen ·
Nobel-Aufsatz

Die Idee, dass fehlgepaarte Basenpaare in Zellen auftreten und solche Schäden ihre eigene Reparatur induzieren, wurde vor rund 50 Jahren durch Robin Holliday im Zusammenhang mit der genetischen Rekombination vorgeschlagen.^[1] Während dieses Prozesses werden DNA-Helices gebrochen und neu miteinander verknüpft.^[2] Die Präzision der Wiederverknüpfung wurde in Zusammenhang gebracht mit der Bildung von Heteroduplexübergängen, einer Region in der Helix, in der die Doppelstränge der Rekombinationspartner zusammenlaufen. Holliday führte aus, dass für den Fall, dass in der Heteroduplexregion Sequenzdifferenzen zwischen den beiden DNA-Strängen herrschen, ein oder mehrere fehlgepaarte Basenpaare auftreten. Er erwog, dass die Prozessierung solcher Fehlpaarungen das rekombinationsassoziierte Phänomen der Genkonversion erklären könnte.^[1] Er schrieb: „Wenn es Enzyme gäbe, welche solche geschädigten Stellen in der DNA reparieren könnten, dann wäre es möglich, dass dieselben Enzyme Abweichungen bei der Basenpaarung erkennen, welche sie durch Austauschreaktionen berichtigen könnten.“

Direkte Evidenz, dass Fehlpaarungen Reparaturreaktionen auslösen, wurde dann in bakteriellen Transformationsexperimenten gefunden.^[3–5] Unser Interesse an diesem Effekt wurde durch Arbeiten an *Escherichia coli* (*E. coli*) im Labor von Matt Meselson in Harvard initiiert. Wagner und Meselson brachten artifiziell konstruierte Heteroduplex-DNA mit mehreren fehlgepaarten Basenpaaren in *E. coli*-Zellen ein und fanden, dass die Fehlpaarungen eine Reparaturreaktion auslösten.^[6] Sie zeigten auch, dass bei dicht beieinander liegenden Fehlpaarungen, d.h. Fehlpaarungen, die nur etwa 1000 Basenpaare voneinander getrennt sind, üblicherweise die Reparatur am gleichen DNA-Strang erfolgt. Basierend auf diesem Effekt der Strangbevorzugung schlugen Wagner und Meselson vor, dass die Fehlpaarungsreparatur neben ihrer Rolle in der genetischen Rekombination „... auch Mutationen korrigieren könnte, die durch Replikationsfehler entstehen. In diesem Fall könnte es sein, dass die Fehlpaarungsreparatur in gerichteter Weise erfolgt und mit dem Austausch von Schwesterchromatiden verknüpft ist oder dass sie mit besonders hoher Effizienz an neu synthetisierten DNA-Strängen stattfindet, möglicherweise wegen deren Untermethylierung oder aufgrund einer speziellen Beziehung zur Replikationsgabel.“ Es zeigte sich, dass diese Vermutung richtig war, und wir wissen heute durch Ergebnisse vieler Laboratorien, dass

das primäre Ziel der Fehlpaarungsreparatur die Beseitigung von DNA-Biosynthesefehlern ist.^[7]

Um vernünftig zu funktionieren, muss das Reparatursystem zwei Aufgaben erledigen können: 1) Es muss die fehlgepaarten Basenpaare erkennen, die durch Replikationsfehler entstehen, und 2) es muss die Identität des neu synthetisierten DNA-Strangs erkennen, der den Fehler enthält. Im Labor von Meselson zeigte Pat Pukkila, dass die Strangspezifität der Fehlpaarungsreparatur in *E. coli* durch den Zustand der Adeninmethylierung in d(GATC)-Sequenzen bestimmt ist.^[8] Da diese Methylierungsmodifikation nach der DNA-Synthese eingeführt wird, existiert der neu synthetisierte DNA-Strang vorübergehend zunächst in einem unmodifizierten Zustand. Es ist diese vorübergehende Abwesenheit der Methylierung, welche die Reparaturreaktion auf den neu synthetisierten Strang richtet (Abbildung 1). In Übereinstimmung mit der Idee, dass die Fehlpaarungsreparatur zur Replikationsgenauigkeit beiträgt, zeigten Miro Radman, Barry Glickman und andere,^[9–11] dass die durch die Methylgruppen ausgelöste Strangselektivität des Reparaturweges mit vier *E. coli*-Mutatorgenen zusammenhängt: *mutH*, *mutL*,

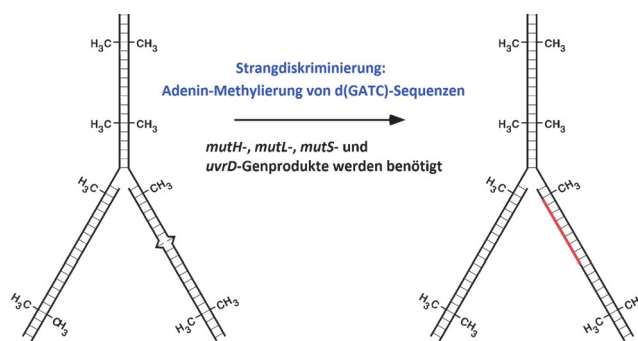


Abbildung 1. Methylgerichtete Fehlpaarungsreparatur in *E. coli*.

[*] Prof. P. Modrich
Howard Hughes Medical Institute and Department of Biochemistry,
Duke University, Medical Center
Durham, NC 27710 (USA)
E-Mail: modrich@biochem.duke.edu

[**] Copyright© The Nobel Foundation 2015. Wir danken der Nobelstiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Abdruck einer deutschen Fassung dieses Vortrages.

mutS und *uvrD*. Die Inaktivierung jeweils eines dieser Gene führt zu deutlich gesteigerten Mutationsraten in *E. coli*-Zellen (Faktor 50 bis 100), was klar verdeutlicht, wie wichtig der Reparaturweg zur Vermeidung von Mutationen und zur Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität ist.

An diesem Punkt betraten wir das Forschungsgebiet. Mich interessierte, wie fehlgepaarte Basen erkannt werden und wie die DNA-Methylierung auf einem Strang der DNA-Helix die Fehlpaarungsreparatur auf den unmethylierten Strang zieht. Um diese Fragen anzugehen, benötigten wir einen biochemischen Assay. Mithilfe verschiedener Kniffe, die Norton Zinder und Mitarbeiter an der Rockefeller University entwickelt hatten,^[12,13] produzierte A-Lien Lu eine Reihe von Heteroduplex-DNAs (z.B. wie in Abbildung 2A gezeigt). Es handelt sich um zirkuläre DNA-Moleküle, deren Stränge sich in einem definierten Zustand der d(GATC)-Methylierung befinden und eine G-T-Fehlpaarung innerhalb einer EcoRI-Restriktionsschnittstelle aufweisen.^[14,15] Da die Fehlpaarung die DNA-Spaltung durch EcoRI verhindert, führt der Verdau der DNA mit den Endonukleasen EcoRI und BamHI zur Bildung eines linearen Volllängenprodukts (Abbildung 2B, unrepariert). Wenn aber die Reparatur am

unmethylierten Strang stattfindet, wie von Meselson vorausgesagt, dann wird die G-T-Fehlpaarung zu einem G-C-Basenpaar repariert, und die EcoRI-Sensitivität wird wiederhergestellt. Verdau mit EcoRI und BamHI führt nun zu zwei kleineren Fragmenten (Abbildung 2B, repariert). Tatsächlich überführte Inkubation dieser DNA mit *E. coli*-Extrakten die zirkuläre DNA in eine EcoRI-empfindliche Form. Wie schon von Meselson und Mitarbeitern angenommen wurde,^[8] ist diese In-vitro-Reaktion vollständig blockiert, wenn beide DNA-Stränge methyliert vorliegen. Wie schon im Fall der methyldirigierten In-vivo-Reparatur^[9–11] ist auch die In-vitro-Reparaturreaktion von den MutH-, MutL-, MutS- und UvrD-Proteinen abhängig.^[14,15]

Michael Su, Bob Lahue und Karin Au wiesen nach, dass die extraktbasierten Reparaturreaktionen alle denkbaren Base-Base-Fehlpaarungen mit der Ausnahme von C-C-Fehlpaarungen reparieren.^[16] Außerdem ist mindestens eine halbmethylierte d(GATC)-Stelle für das Auslösen der Reparaturreaktion notwendig.^[17] Dieses Resultat führte zu einer starken Vereinfachung unserer Substratmoleküle für die Reparaturreaktion, die folglich eine Fehlpaarung und eine einzelne d(GATC)-Stelle enthielten (Abbildung 3, oben), die durch rund 1000 Basenpaare getrennt sind (der kürzere Abschnitt). Im Wesentlichen haben wir alle unsere nachfolgenden Arbeiten mit solchen zirkulären DNA-Molekülen durchgeführt.

A-Lien Lu demonstrierte, dass die extraktbasierte Reparaturreaktion von einer DNA-Synthese begleitet wird, welche am unmethylierten Strang erfolgt, was auf einen Exzisions-Reparaturmechanismus hindeutete.^[14] In Zusammenarbeit mit Jack Griffith an der University of North Carolina bestätigten Michael Su und Michelle Grilley diese Ergebnisse. Die Behandlung der halbmethylierten Heteroduplex-DNA mit dem *E. coli*-Extrakt unter Bedingungen, in denen die DNA-Synthese blockiert ist, führte zur Bildung einer Einzelstranglücke, die sich über den kürzeren Abschnitt zwischen den beiden Stellen auf der zirkulären DNA erstreckt.^[18,19] Das gleiche Ergebnis wurde für die beiden halbmethylierten Konfigurationen beobachtet (Abbildung 3, unten). Da die beiden Stränge der Helix antiparallel verlaufen, besagt dieses Resultat, dass keine obligate Polarität der beiden DNA-Stränge vorherrscht und die methyldirigierte Reparatur eine bidirektionale Exzision unterstützt.

Um den Reparaturmechanismus zu untersuchen, isolierten wir die MutH-, MutL-, MutS- und UvrD-Proteine in aufgereinigter Form.^[20–23] Wir wussten von vorhergehenden Arbeiten von Peter Emmerson,^[24] dass das *uvrD*-Genprodukt eine DNA-Helikase II ist, ein Enzym, das die beiden DNA-Stränge der Helix ATP-abhängig entwindet. Die Funktion der anderen drei Proteine war damals unbekannt.

Michael Su wies nach, dass MutS für die Erkennung der Fehlpaarung zuständig ist (Abbildung 4A).^[16,20] Der ultimative Beweis für diese

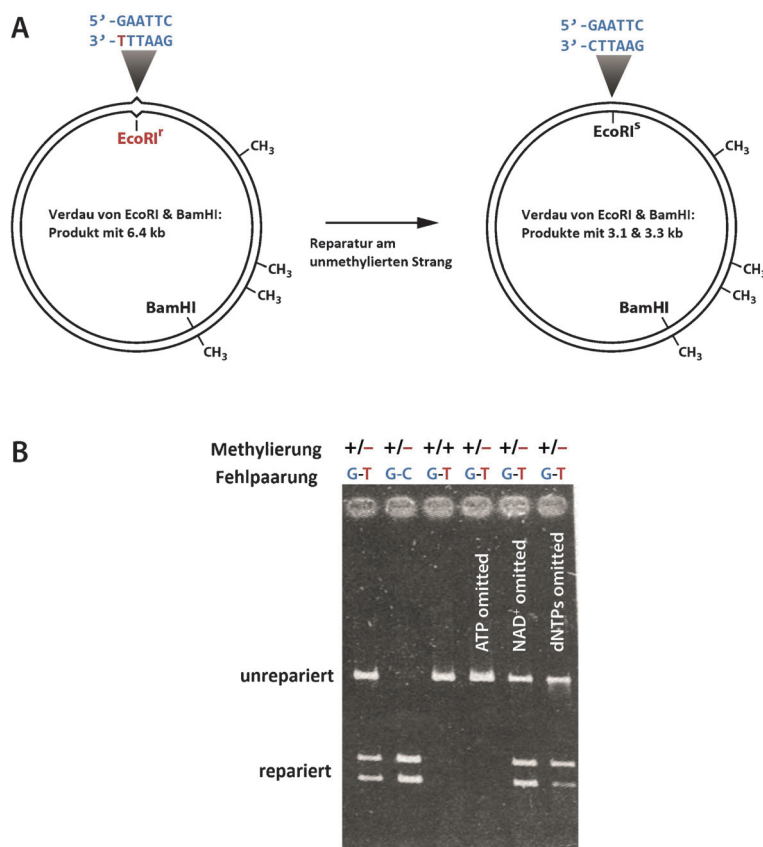


Abbildung 2. Methyldirigierte Fehlpaarungsreparatur in *E. coli*-Extrakten. A) In-vitro-Assay zur Untersuchung der Fehlpaarungsreparatur. Eine G-T-Fehlpaarung innerhalb einer EcoRI-Restriktionsschnittstelle in unreparierter DNA blockiert die DNA-Spaltung durch die Endonuklease. B) In-vitro-Reparatur der Heteroduplex-DNA aus (A). Die Reparatur residualer Heteroduplex-DNA in Abwesenheit von exogenen dNTPs (rechte Spur) ist auf die Gegenwart von DNA-Biosynthesevorläufern im Zellextrakt zurückzuführen.^[18] Teil (A) mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [15]; Teil (B) mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [14].

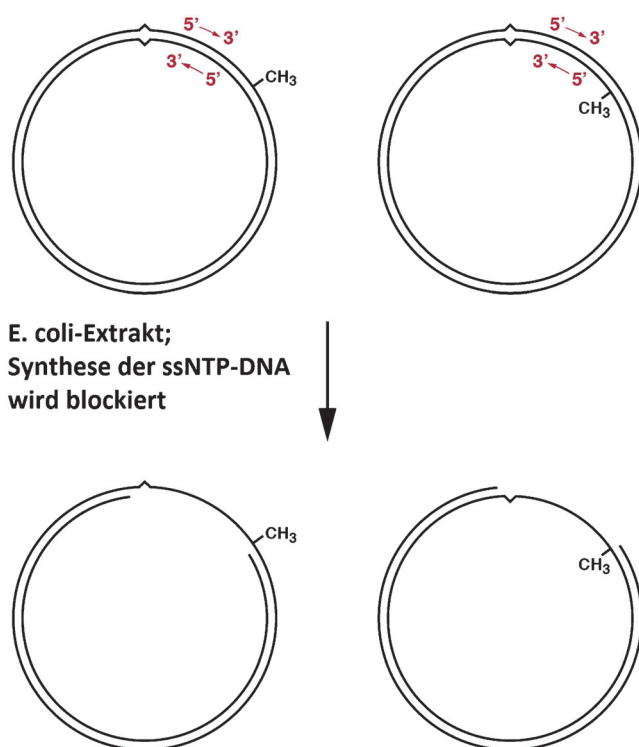


Abbildung 3. Methyldirigierte Reparatur in *E. coli*-Extrakten unterstützt die bidirektionale Exzision. Inkubation von 5'-(links) oder 3'-halb-methylierter (rechts) G-T-Heteroduplex-DNA in *E. coli*-Extrakten in Gegenwart von Didesoxynukleosid-5'-Triphosphat führt zur Bildung einer Einzelstranglücke, die sich über den kürzeren Abschnitt zwischen den beiden Stellen auf der zirkulären DNA erstreckt.^[18, 19]

A

effektive Affinitäten des mutS-Proteins für Basenfehlpaarungen

Fehlpaarung	effektive Dissoziationskonstante
	<i>nM</i>
G-T	39 ± 4
A-C	53 ± 4
A-A	110 ± 7
T-T	140 ± 9
G-G	150 ± 10
A-G	270 ± 30
C-T	370 ± 40
C-C	480 ± 50

B

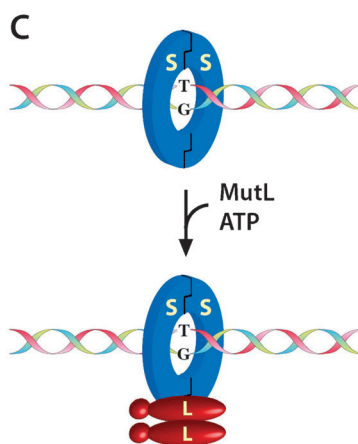
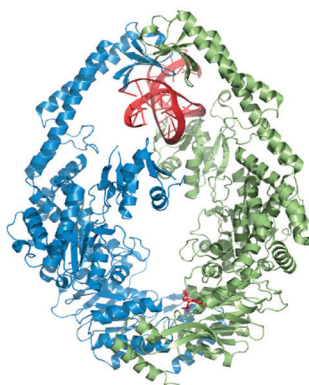


Abbildung 4. Biologische Aktivitäten von MutS und MutL. A) MutS bindet fehlgepaarte Basenpaare. B) Kristallstruktur des MutS-Dimers aus *E. coli* im Komplex mit einem DNA-Strang mit einer G-T-Fehlpaarung (Titia Sixma und Mitarbeiter).^[25] C) MutL bindet an den MutS-Heteroduplex-Komplex in einer ATP-abhängigen Reaktion. Teil (A) mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [16]; die Kristallstruktur in (B) wurde von Titia Sixma zur Verfügung gestellt.

Schlussfolgerung war die schöne Kristallstruktur des MutS-Dimers aus *E. coli* im Komplex mit einem DNA-Strang mit G-T-Fehlpaarung (Abbildung 4B), die von Titia Sixma und Mitarbeitern am Netherlands Cancer Institute gelöst wurde.^[25] Michelle Grilley zeigte, dass MutL anschließend in einer ATP-abhängigen Reaktion an den MutS-Heteroduplex-Komplex bindet (Abbildung 4C), ansonsten aber nicht die kovalent kontinuierliche Struktur der DNA-Helix verändert.^[22] Kate Welsh und A-Lien Lu fanden heraus, dass das MutH-Protein eine eng assoziierte, aber nahezu inaktive Endonuklease-Aktivität besitzt (< 1 Turnover/Stunde), die DNA an der unmethylierten d(GATC)-Sequenz schneiden kann.^[21] Wie unten diskutiert, führt die Assemblierung des ternären MutL-MutS-Heteroduplex-Komplexes zu einer dramatischen Aktivierung dieser latenten MutH-d(GATC)-Endonuklease.

Die vier Proteine allein sind nicht ausreichend, um die Fehlpaarungsreparatur durchzuführen. Bob Lahue und Karin Au nutzten daher biochemische und genetische Ansätze, um andere notwendige Faktoren zu identifizieren – und sie fanden vier: 1) Die Exonuklease I, die Einzelstrang-DNA mit 3'→5'-Polarität hydrolysiert, 2) das Einzelstrang-DNA-Bindeprotein SSB aus *E. coli*, 3) das DNA-Polymerase-III-Holoenzym, das in der DNA-Replikation eine Rolle spielt, und 4) DNA-Ligase.^[23] Sie demonstrierten, dass ein System bestehend aus MutH, MutL, MutS, UvrD (DNA-Helikase II), Exonuklease I (Exo I), SSB, DNA-Polymerase-III-Holoenzym und DNA-Ligase ausreichend ist, um die methyldirigierte Fehlpaarungsreparatur *in vitro* zu rekonstituieren.

Der für diese Rekonstitutionsexperimente verwendete Assay war eine verfeinerte Version des in Abbildung 1 beschriebenen Systems. In dem in Abbildung 5A gezeigten Beispiel ist eine G-T-Fehlpaarung in überlappenden Erkennungsstellen der zwei Restriktionsenzyme HindIII und XhoI platziert. Auf diese Weise blockiert die Fehlpaarung die Inzision der DNA durch beide Enzyme. Eine Reparatur des unteren Strangs produziert ein A-T-Basenpaar und damit eine gute Schnittstelle für HindIII. Eine Reparatur des oberen Strangs ergibt ein G-C-Basenpaar und somit eine gute Erkennungsstelle für die Endonuklease XhoI. Damit kann die Reparatur an jedem dieser beiden Stränge direkt quantifiziert werden. Ein Heteroduplex, der die d(GATC)-Stelle nicht enthält, ist kein Substrat für die aufgereinigten Enzyme (Abbildung 5B, Spuren 1 und 2). Ein Heteroduplex, in dem beide Stränge methyliert sind (Spuren 3 und 4), ist ebenfalls kein Substrat. Halbmethylierte DNA wird hingegen repariert.

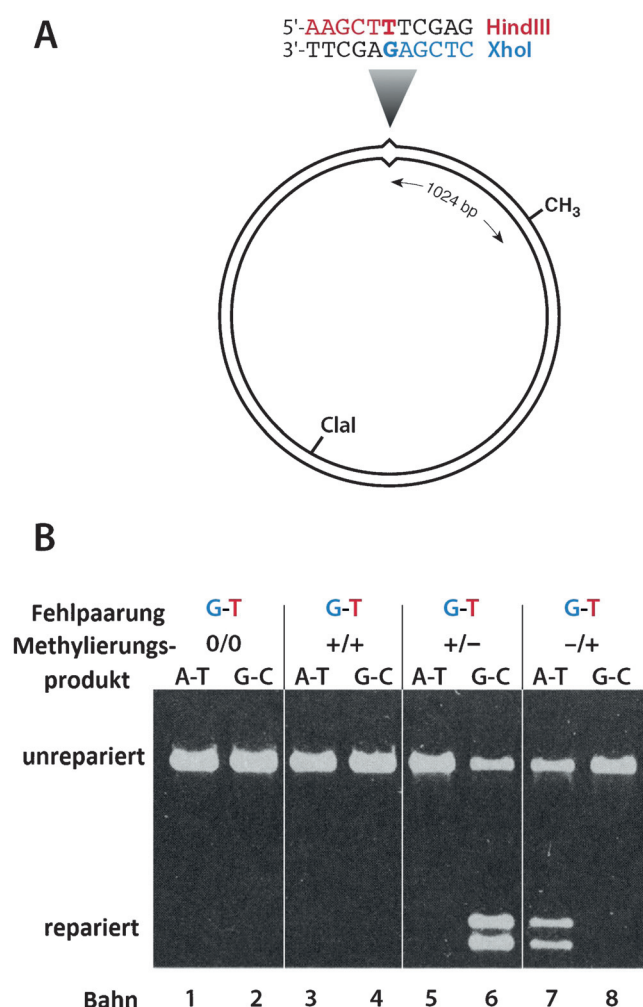


Abbildung 5. Methylgerichtete Fehlpaarungsreparatur in einem aufgereinigten System. A) Die Heteroduplex-DNA, die in diesem Experiment verwendet wurde, enthält eine Basenfehlpaarung in überlappenden Erkennungsregionen zweier Restriktionsenzyme.^[16] Auf diese Weise kann die Reparatur an jedem der beiden Stränge direkt quantifiziert werden. B) Die Reparatur des G-T-Heteroduplex ist methylgerichtet und erfordert die Anwesenheit einer halbmethylierten d(GATC)-Stelle. Teile (A) und (B) aus Lit. [23] mit freundlicher Genehmigung der AAAS.

Wenn die Methylgruppe sich auf dem Strang befindet, der das fehlgepaarte G enthält, führt die Reparatur ausschließlich zu G-C-Basenpaaren (Spuren 5 und 6). Ist der Strang mit dem fehlgepaarten T methyliert, führt die Reparaturreaktion zu einem A-T-Basenpaar (Spuren 7 und 8), so wie es für die methylgerichtete Reparatur erwartet wird. Das rekonstituierte System ermöglicht die Reparatur aller denkbaren Base-Base-Fehlpaarungen mit Ausnahme der C-C-Fehlpaarung.^[23]

Wie oben beschrieben, führte die Analyse der im Extrakt abgelaufenen Reaktion zu der Vermutung, dass das System über eine bidirektionale Exzisionskapazität verfügt, die von 3'→5'- und 5'→3'-Exonukleasen abhängen sollte. Diese Vermutung stellte sich als richtig heraus. Deani Cooper, Vickers Burdett und Celia Baitinger^[26-28] wiesen nach, dass für den Fall, dass sich die unmethylierte d(GATC)-Sequenz in 5'-Richtung zur Fehlpaarung befindet, die In-vitro-Reparatur streng von der Anwesenheit der 5'→3'-direktionalen Exonuklease VII (ExoVII) (oder auch RecJ-Exonuklease) abhängt. Befand sich die d(GATC)-Sequenz in 3'-Richtung zur Fehlpaarung, hing die Reparatur von der 3'→5'-Hydrolyse durch ExoI oder ExoX ab.^[26,28] Auch ExoVII (die sowohl eine 5'→3'- als auch eine 3'→5'-Hydrolyse unterstützt)^[29] kann eine Rolle in der 3'-direktionalen Exzision spielen.^[28] Unsere ursprünglichen Rekonstitutionsexperimente, die alleine mit ExoI durchgeführt wurden,^[23] waren nur deshalb erfolgreich gewesen, weil die damals eingesetzten Präparationen des DNA-Polymerase-III-Holoenzym mit ExoVII kontaminiert waren.^[26]

Obwohl Extrakte, die aus RecJ-, ExoVII-, ExoI- und ExoX-defizienten *E. coli*-Zellen gewonnen wurden, nicht in der Lage sind, die 3'- und 5'-direktionalen Fehlpaarungsreparaturen durchzuführen, zeigen diese Stämme nur eine siebenfach erhöhte Mutationsrate, was deutlich weniger ist als der Mutationsanstieg von 30–100, den man erhält, wenn man mit MutS- oder UvrD-defizienten Zellen arbeitet.^[28] Diese Diskrepanz wurde aufgelöst, als gezeigt werden konnte, dass die Entstehung von fehlgepaarten Basenpaaren in RecJ-, ExoVII-, ExoI- und ExoX-defizienten Zellen mit einem Verlust der Lebensfähigkeit einhergeht, und zwar in einer von der Upstream-Aktivität der Proteine MutH, MutL, MutS und UvrD abhängigen Weise.^[27] Diese Beobachtungen bestätigen, dass die vier Exonukleasen direkt an der methylgerichteten Fehlpaarungsreparatur in *E. coli*-Zellen beteiligt sind, und dass die reduzierte Mutabilität der Exonuklease-defizienten Stämme durch die ausbleibende Gesundung der Mutationen infolge von Chromosomenverlust verursacht wird.

Nachdem der notwendige Satz aufgereinigter *E. coli*-Proteine zugänglich war, konnten wir beginnen, den Mechanismus der methylgerichteten Reaktion aufzuklären. Zunächst führt die Erkennung der Fehlpaarung durch MutS zu einer Rekrutierung von MutL an den Heteroduplex (Abbildung 6). MutL dient dazu, die Fehlpaarungserkennung durch MutS mit der Aktivierung nachfolgender Reparaturaktivitäten zu verknüpfen. Eine der nachfolgenden Reaktionen wird durch MutH mit seiner latenten d(GATC)-Endonuklease-Aktivität ausgelöst, die oben bereits erwähnt wurde. Karin Au konnte nachweisen, dass die methylgerichtete Reparatur durch Aktivierung der MutH-Endonuklease durch einen MutS-, MutL- und fehlpaarungsabhängigen Prozess ausgelöst wird.^[30] Die

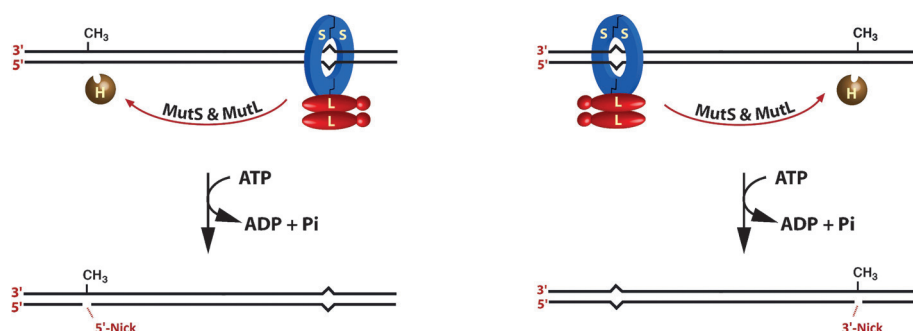


Abbildung 6. Aktivierung der MutH-Endonuklease und Auslösung der methyldirigierten Fehlpaarungsreparatur.

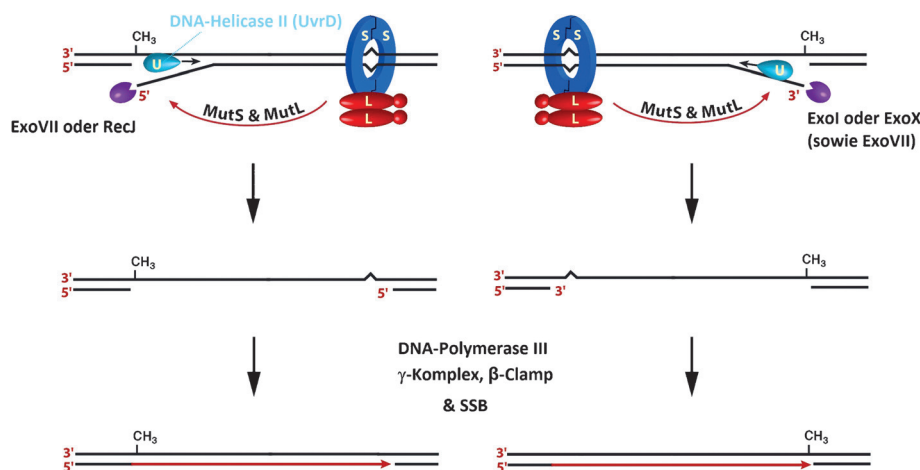


Abbildung 7. Exzisions- und Reparatursyntheseschritte der methyldirigierten Fehlpaarungsreparatur.

Inzision der DNA durch das aktivierte MutH ist auf den unmethylierten DNA-Strang in der halb-methylierten d(GATC)-Sequenz fokussiert und kann 5'- oder 3'-direktional von der Fehlpaarung erfolgen, in Übereinstimmung mit der Bidirektionalität des Mechanismus. Dieser gezielte Strangbruch ist das notwendige Signal, das die Fehlpaarungsreparatur an den unmethylierten DNA-Strang dirigiert.

Die Assemblierung des MutL-MutS-Heteroduplex-Komplexes aktiviert auch das Exzisionssystem, das aus dem *uvrD*-Genprodukt, der DNA-Helikase II und den vier oben erwähnten Einzelstrang-Exonukleasen besteht (Abbildung 7). Vivian Dao und Miyuki Yamaguchi demonstrierten, dass MutS und MutL die DNA-Helikase II in einer solchen Orientierung an den durch MutH erzeugten Strangbruch dirigiert, dass die Entwindung der Helix zum Schaden hin erfolgt.^[31,32] Diese Richtungsselektivität wird für beide Heteroduplexorientierungen beobachtet, unabhängig davon, ob der Strangbruch in 5'- oder 3'-Richtung zur Fehlpaarung liegt. Der Einzelstrang, der durch die Entwindung der Helikase freigelegt wird, wird anschließend durch ExoVII oder RecJ abgebaut, wenn der Strangsnitt in 5'-Richtung zur Fehlpaarung durchgeführt wurde. Erfolgt der Strangbruch in 3'-Richtung zur Fehlpaarung, bauen ExoI und ExoX den Einzelstrang ab. Die auf diese Weise entstehende Einzelstranglücke wird durch die Komponenten des DNA-Polymerase-III-Holoenzym repariert. Anna Pluciennik zeigte, dass sich

die Funktion des Polymerase-III-Holoenzym auf die Reparatursynthese der Fehlpaarungskorrektur in *E. coli* beschränkt. Die Komponenten des Holoenzym spielen dagegen keine Rolle in der MutH-Aktivierung oder der Inzision.^[33] Das ist bemerkenswert, weil der Reparaturweg beim Menschen in dieser Hinsicht deutlich anders ist.

Der methyldirigierte Reparaturprozess erfordert die Interaktion zweier DNA-Stellen, die in unseren Substraten 1000 Basenpaare auseinander liegen. Der Mechanismus dieses Prozesses ist seit 20 Jahren Gegenstand der Debatte.^[34,35] Die orientierungsabhängige Beladung der Helikase II, die in Abbildung 7 zusammengefasst ist, lässt darauf schließen, dass das Reparatursystem die relative Orientierung der Fehlpaarung und der d(GATC)-Stelle erkennen kann. Das impliziert, dass die Signalübertragung entlang der DNA-Helixkonturen zwischen den beiden Stellen erfolgen muss. Es gibt starke Hinweise aus verschiedenen Laboratorien, dass MutS und vermutlich auch der MutL-MutS-Komplex in einer ATP-abhängigen Weise am DNA-Strang entlang gleiten können.^[34–36]

Wir favorisieren die Idee, dass die Kommunikation zwischen den beiden Stellen durch diese Art von Bewegung erzeugt wird – der letzte Beweis steht allerdings noch aus.

Im Verlauf unserer Arbeiten zur Fehlpaarungsreparatur in *E. coli* begannen wir uns dafür zu interessieren, ob ein ähnlicher strangabhängiger Reparaturweg auch in höheren Zellen existiert. Ergebnisse verschiedener Laboratorien zeigten, dass Fehlpaarungen auch in eukaryotischen Zellen repariert werden,^[37–40] aber es gab keinen Hinweis auf eine strangdirigierte Reparatur. Das Problem, das bei der Untersuchung dieser Frage auftrat, war das Fehlen jeglicher Informationen bezüglich der Natur des biologischen Strangsignals. Um dieses Problem zu adressieren, griff mein Doktorand Jude Holmes auf die Befunde zurück, die wir zuvor mit dem *E. coli*-System erhalten hatten – nämlich dass MutH und halb-methylierte d(GATC)-Stellen die Voraussetzung für den Strangbruch sind. Der Strangbruch ist das Signal, das die methyldirigierte Fehlpaarungsreparatur steuert. Jude konstruierte Heteroduplex-DNAs, die einen spezifischen Einzelstrangbruch (Nick) enthielten (Abbildung 8 A). Er fand, dass der geschnittene Strang nach Zugabe von Extrakten aus humanen Zellen (Abbildung 8 B) oder Zellen aus *Drosophila melanogaster* repariert wurde.^[41] Der nicht geschnittene Strang wurde nicht repariert. Ohne einen Einschnitt findet keine Reparatur statt. Darüber hinaus demonstrierte Woei-horn Fang, dass die hydrolytischen Prozesse an der DNA auf

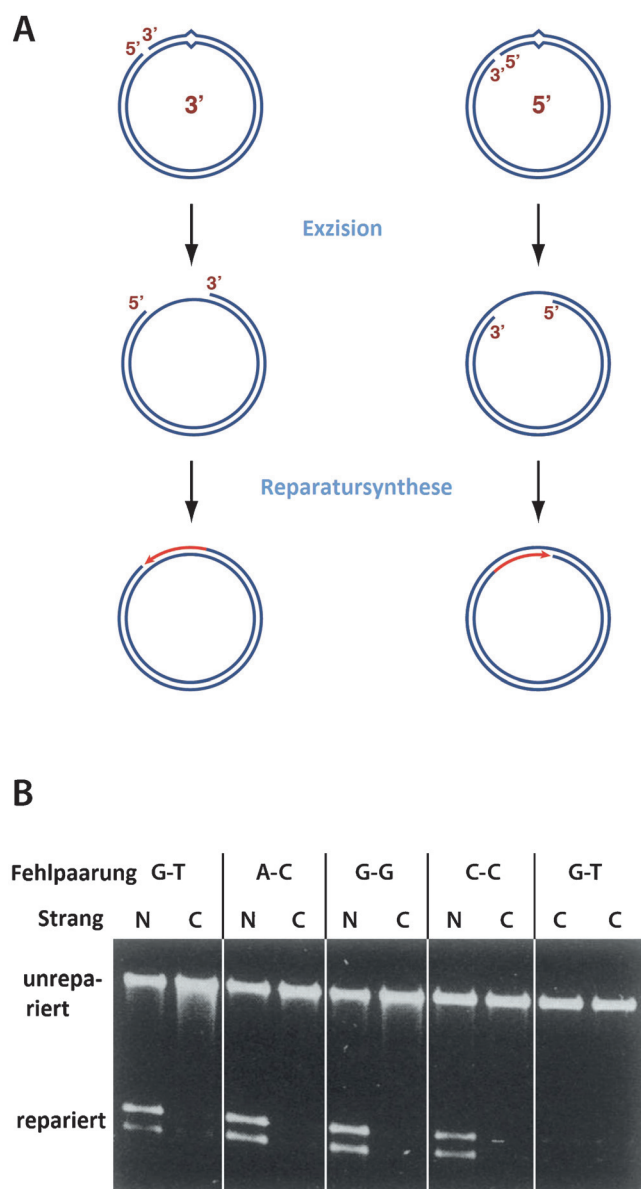


Abbildung 8. Fehlpaarungsreparatur einer Heteroduplex-DNA, die einen Einzelstrangbruch enthält, in humanen Zellextrakten. A) Prinzip des Substrat-Designs und Mechanismus der Fehlpaarungsreparatur. B) Die Fehlpaarungsreparatur der DNA in humanen Zellkernextrakten findet an demjenigen Strang statt, der den Einzelstrangbruch enthält (N). Am kovalent kontinuierlichen Strang (C) ist keine signifikante Reparatur erkennbar. Teil (B) aus Lit. [41].

dem kürzeren Stück zwischen dem Strangbruch und der Fehlpaarung lokalisiert sind, unabhängig von einer 5'- oder 3'-Orientierung der beiden Stellen (Abbildung 8A). Dieser Befund erinnert an die bidirektionale methyldirigierte Reparatur in *E. coli* – wie aber unten gezeigt wird, unterscheiden sich die Reparaturmechanismen beim Menschen in einigen Punkten fundamental von denen in *E. coli*.

Zwei Veröffentlichungen der Arbeitsgruppen um de la Chapelle, Vogelstein und Perucho aus dem Jahr 1993 erlaubten es uns, die entscheidenden Proteine zu identifizieren, die für die Auslösung der Fehlpaarungsreparatur beim Menschen benötigt werden.^[42,43] Diese Arbeiten zeigten, dass

die große Häufigkeit von Mutationen in einfachen Mononukleotid- und Dinukleotid-Repeats (ein als Mikrosatelliteninstabilität bezeichneter Phänotyp) für bestimmte Krebsarten charakteristisch ist, unter anderem beim Lynch-Syndrom (erblicher nicht-polypöser Darmkrebs, HNPCC). Das Lynch-Syndrom ist ein vererbbarer Krebs, der rund 5 % aller Darmkrebsfälle und 15 % aller spontan auftretenden Krebse mit Lynch-ähnlichen Symptomen ausmacht.^[44,45]

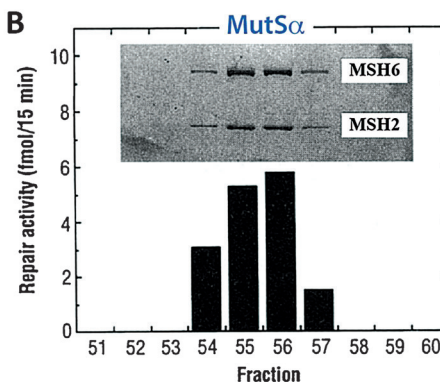
Wir wussten bereits, dass Mikrosatellitenmutationen ein verbreitetes Phänomen in *E. coli*-Zellen mit defekter Fehlpaarungsreparatur sind.^[46] Es war deshalb plausibel anzunehmen, dass diese Tumorzellen auch eine defekte Fehlpaarungsreparatur aufweisen. Wir besorgten uns eine Reihe von Tumorzelllinien mit Mikrosatelliteninstabilitäten, zunächst von Bert Vogelstein (John Hopkins University, School of Medicine), später aus anderen Quellen (Abbildung 9A). Guo-Min Li, Woei-hong Fang, Matt Longley und Jim Drummond bestimmten tatsächlich, dass alle diese Zelllinien eine defekte Fehlpaarungsreparatur aufweisen.^[47,50] Damit war es uns möglich, die den Zellen fehlenden Reparaturkomponenten zu identifizieren und zu isolieren (Abbildung 9B,C). Jim Drummond und Guo-Min Li zeigten, dass vielen dieser Linien das Protein MutSα fehlte. MutSα ist ein Heterodimer der beiden MutS-Homologen MSH2 und MSH6,^[48,51] und es erwies sich als das primäre humane Protein für die Fehlpaarungserkennung.^[52] Guo-Min Li identifizierte die den anderen Zellen fehlende Reparaturaktivität als MutLα, ein Heterodimer aus den MutL-Homologen MLH1 und PMS2.^[49] Während wir die biochemischen Arbeiten vorantrieben, beschäftigten sich andere Forschungsgruppen, insbesondere die von Richard Kolodner und Bert Vogelstein, mit der Sequenzierung der MutS- und MutL-homologen Gene in den Lynch-Familien. Sie zeigten, dass die Mutationen in diesen Genen mit unterschiedlichen Krankheitsphänotypen korrelieren.^[53,54] Es ist heute relativ klar, dass viele Lynch-Krebse durch Defekte in einem dieser beiden Heterodimere erzeugt werden.^[44,45] Die Inaktivierung der Fehlpaarungsreaktion in den Tumorzellen erhöht die Mutationsrate um den Faktor 100 bis 1000,^[55–57] und es wird vermutet, dass dies für die Entwicklung dieser Krebse direkt verantwortlich ist.

Die letzten vier Tumorzelllinien, die in Abbildung 9A aufgeführt sind, erwiesen sich als außergewöhnlich: Jede dieser Zelllinien entstammt einem sporadisch auftretenden Krebs mit Mikrosatelliteninstabilitäten, und in jedem Fall war die Fehlpaarungsreparatur defekt. Jim Drummond und Guo-Min Li konnten zeigen, dass diese Zelllinien unfähig sind, die MLH1-Untereinheit von MutLα zu produzieren, und dass durch Zugabe von aufgereinigtem MutLα die Reparatur in Extrakten dieser Zellen wiederhergestellt werden kann.^[50] Als wir diese Ergebnisse unseren mit den Sequenzierungen befassten Kollegen mitteilten, reagierten sie skeptisch. Sie hatten das *MLH1*-Gen in verschiedenen dieser Zelllinien sequenziert und fanden es in normaler Form vor. Wer unsere Ergebnisse sehr ernst nahm, war Sandy Markowitz an der Case Western Reserve University, mit dem wir über verschiedene dieser Zelllinien eng kooperiert hatten. Gemeinsame Experimente, die zum größten Teil in Sandys Labor durchgeführt wurden, zeigten dann, dass das *MLH1*-Gen in

A

Tumorzelllinie	Mikrosatelliten- instabilität	Heteroduplex- reparatur 3'-G-T (fmol)	Defekt
HeLa (cervix)	No	9	--
SW480 (colon)	No	13	--
Vaco 410 (colon)	No	7.4	--
LoVo (colon)	Yes	< 0.3	MutS α
HCT-15 (colon)	Yes	< 0.3	MutS α
HEC-59 (endometrial)	Yes	< 0.3	MutS α
HCT 116 (colon)	Yes	< 0.3	MutL α
Vaco 481 (colon)	Yes	< 0.3	MutL α
RKO (colon)*	Yes	< 0.3	MutL α
Vaco 5 (colon)*	Yes	0.4	MutL α
Vaco 6 (colon)*	Yes	< 0.3	MutL α
AN3CA (endometrial)*	Yes	< 0.3	MutL α

B



C

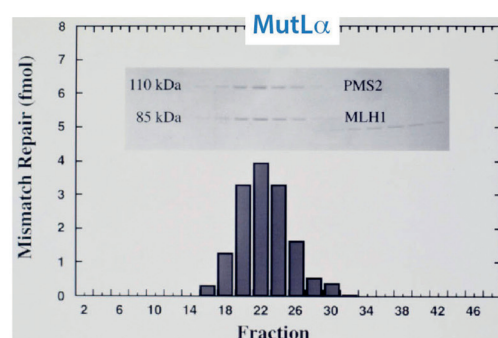


Abbildung 9. Tumorzelllinien mit Mikrosatelliteninstabilitäten sind durch eine defekte Fehlpaarungsreparatur und das Fehlen der Proteine MutS α oder MutL α charakterisiert. A) Fehlpaarungsreparatur in Zelllinien mit Mikrosatellitenstabilität und -instabilität. B) Isolierung von MutS α (MSH2-MSH6-Heterodimer). C) Isolierung von MutL α (MLH1-PMS2-Heterodimer). Teil (B) aus Lit. [48] mit freundlicher Genehmigung der AAAS. Teil (C) mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [49], Copyright 1995 National Academy of Sciences, USA.

diesen Zelllinien durch eine CpG-Methylierung innerhalb der Promotorregion epigenetisch stillgelegt ist.^[50] Das Gen ist also normal, aber es wird nicht transkribiert – und demzufolge wird die MLH1-Polypeptidkette nicht produziert, was letztendlich zum Defekt der Fehlpaarungsreparatur führt. Der Beweis für diese Schlussfolgerung ist in Abbildung 10 gezeigt. Behandelt man die sporadischen Krebszellen mit 5-Azacytidin resultiert eine transiente Cytosin-Demethylierung, die sich in einer transienten Expression von MLH1 äußert. Dies ist ein äußerst wichtiges Ergebnis für die klinische Praxis, da man annimmt, dass die Stilllegung des *MLH1*-Lokus für etwa 15 % aller Darmkrebs verantwortlich ist.^[58]

Zusätzlich zu MutS α (welches Base-Base-Fehlpaarungen und kleine Insertions-/Deletionsfehlpaarungen von ein bis

drei extrahelikalen Basen erkennt) und MutL α zeigen genetische und biochemische Studien, dass sechs weitere Proteine an der eukaryotischen Fehlpaarungsreparatur beteiligt sind: MutS β (MSH2-MSH3-Heterodimer; präferiert Insertions-/Deletionsfehlpaarungen von zwei bis etwa zehn extrahelikalen Basen),^[52,59–61] Exonuklease 1,^[62–64] das Einzelstrang-DNA-Bindeprotein RPA (Replikationsprotein A),^[65,66] die DNA-Klammer PCNA (Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen),^[67] den Clamp-Loader RFC (Replikationsfaktor C)^[68] und die DNA-Polymerase δ .^[69] Diese 8 Proteine sind ausreichend, um ein minimales System zu rekonstituieren, das als humane bidirektionale Fehlpaarungsreparatur in vitro fungieren kann.^[68,70] Wir identifizierten zwei strangspezifische Reaktionen, die jeweils durch Subsets dieser Proteine unterstützt werden und Einblicke in den Mechanismus der Fehlpaarungsreparatur beim Menschen liefern.

Die einfachste dieser Reaktionen (Abbildung 11) ist ein triviales Beispiel dafür, wie Strangspezifität aufgebaut wird. Die einzige Exonuklease, die definitiv an der eukaryotischen Fehlpaarungsreparatur beteiligt ist, ist die Exonuklease 1 (Exo1), die Duplex-DNA mit 5'→3'-Polarität hydrolysiert.^[62–64] Jochen Genschel demonstrierte, dass Exo1 in einer von der Fehlpaarung abhängigen Weise durch MutS α aktiviert wird,^[64,71] ähnliche Resultate erzielten auch Guo-Min Li und Mitarbeiter.^[72] Wie schon im Fall des bakteriellen Proteins MutS ist MutS α zu einer ATP-abhängigen Bewegung entlang der Helix fähig.^[34–36] Wir glauben, dass eine solche Bewegung wahrscheinlich dazu dient, die Aktivitäten an den

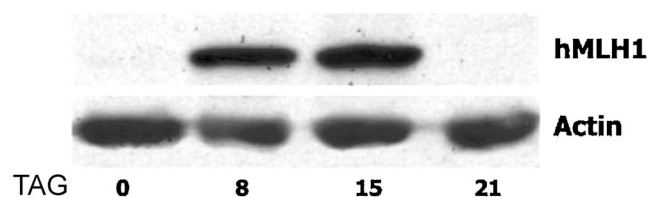


Abbildung 10. Behandlung von AN3CA-Tumorzellen mit 5-Azacytidin resultiert in einer transienten MLH1-Expression. Die Zellen wurden an Tag 2 und 5 über 24 h mit 5-Azacytidin behandelt. Die Konzentrationen von MLH1 und Actin (Kontrolle) wurden durch Western-Blot bestimmt. Mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [50], Copyright 1998 National Academy of Sciences, USA.

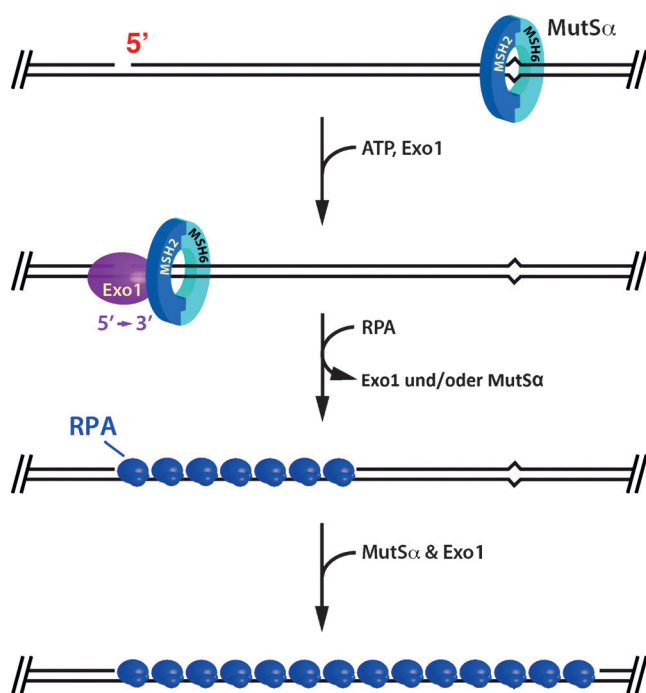


Abbildung 11. Aktivierung von Exo1 durch MutSα und Kontrolle der Prozessivität des MutSα-Exo1-Komplexes durch RPA.

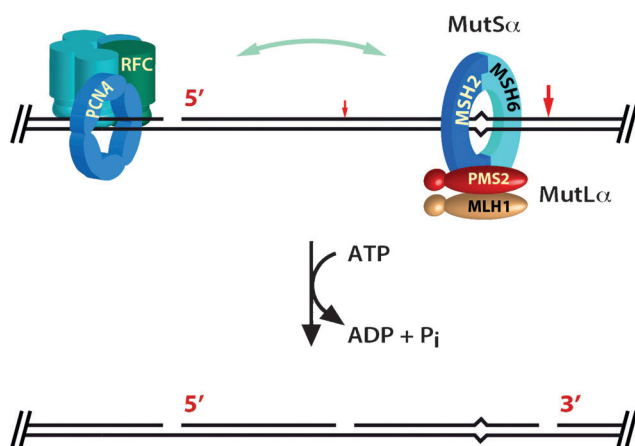
beiden DNA-Stellen zu koppeln. Die Aktivierung von MutSα führt dazu, dass Exo1 stark prozessiv wird. Die Prozessivität des MutSα-Exo1-Komplexes wird durch das Einzelstrang-Bindeprotein RPA kontrolliert, das nach Entfernen von ungefähr 200 Nukleotiden den prozessiven Komplex von der Helix verdrängt.^[71,73] Die resultierende, mit dem RPA aufgefüllte Einzelstranglücke ist ein schlechtes Substrat für Exo1, und das Enzym kann ohne die fehlpaarungsabhängige Unterstützung von MutSα nicht an den Strang binden. Dies führt zu einem iterativen Zyklus, in dem pro Bindeereignis von Exo1 200 Nukleotide solange entfernt werden, bis die Fehlpaarung entfernt ist. An diesem Punkt ist die Exzisions-

aktivität drastisch reduziert, weil MutSα die Exo1-Bindung an die DNA nicht länger unterstützen kann. MutLα wird für diese Reaktion nicht benötigt, aber es verstärkt die Fehlpaarungsabhängigkeit der Exzision, indem es die hydrolytische Abbaureaktion an fehlpaarungsfreier Homoduplex-DNA unterdrückt. Des Weiteren potenziert die Poly[ADP-Ribose]-Polymerase PARP-1 die Fehlpaarungsabhängigkeit des gesamten Systems.^[74]

Die zweite strangspezifische Reaktion ist interessanter (Abbildung 12). Farid Kadyrov, Leo Dzantiev und Nicoleta Constantin demonstrierten, dass humanes MutLα, im Gegensatz zu MutL aus *E. coli*, eine latente Endonuklease ist, deren Aktivierung von mehreren Faktoren abhängt: einer Fehlpaarung, einem vorhandenen Strangbruch, MutSα, dem PCNA und dem RFC (der Clamp Loader, der PCNA auf der Helix platziert).^[75] Die Aktivität der Endonuklease ist strangspezifisch: Sie wird an denjenigen Heteroduplexstrang geleitet, der den vorhandenen Strangbruch enthält. Inzision durch das aktivierte MutLα kann an verschiedenen Stellen des bereits eingeschnittenen Strangs erfolgen, aber die einleitenden Prozesse scheinen bevorzugt an der distalen Seite der Fehlpaarung anzusetzen. Die Reaktion erfolgt sowohl am 5'- als auch am 3'-Heteroduplex und ergibt Moleküle, in denen die Fehlpaarung durch 5'- und 3'-Strangbrüche eingeklammert ist. Farid Kadyrov zeigte, dass diese 5'-Termini als Bindestelle dienen, um zwei unterschiedliche Mechanismen der Fehlpaarungsentfernung einzuleiten: Hydrolytische Exzision durch MutSα-aktivierte Exo1^[75] oder eine syntheseabhängige Strangverdrängung durch die DNA-Polymerase δ (Abbildung 13). Andere Exzisionsmechanismen könnten auch möglich sein.

Wir glauben, dass die Endonukleaseaktivität eine primäre Funktion von MutLα in der eukaryotischen Fehlpaarungsreparatur ist. Die Grundlage für diese Schlussfolgerung ist in Abbildung 14 dargestellt. Farid identifizierte ein metallbindendes Endonukleasemotiv DQHA(X)₂E(X)₄E innerhalb der C-terminalen Domäne der PMS2-Untereinheit von MutLα (Abbildung 14, rot hervorgehoben). Aminosäuresubstitutionen innerhalb dieses Motivs haben keine Auswir-

5'-gerichtet



3'-gerichtet

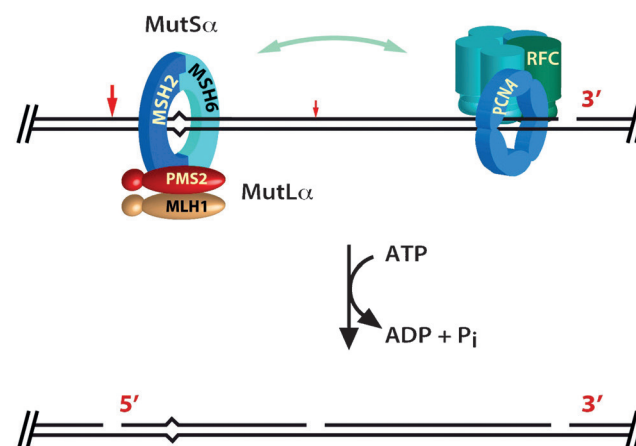


Abbildung 12. MutLα ist eine strangspezifische Endonuklease, deren Aktivierung von einer Fehlpaarung, einem vorhandenen Einzelstrangbruch, MutSα, PCNA und RFC abhängt.

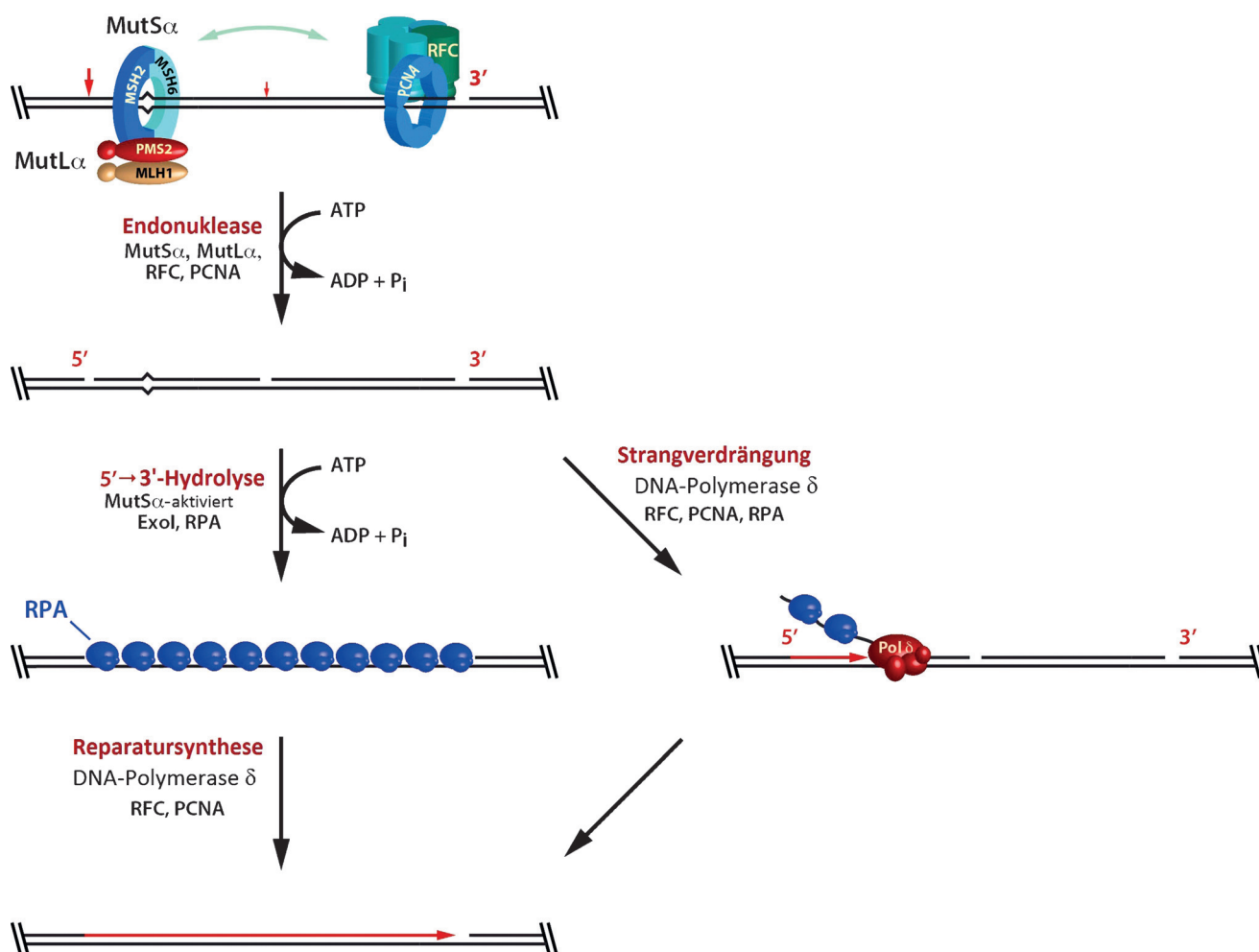


Abbildung 13. Fehlpaarungsreparatur einer MutLα-inzitierten Heteroduplex-DNA durch MutSα-aktivierte Exo1 (links) oder durch syntheseabhängige Strangverdrängung durch die DNA-Polymerase δ (rechts).

kungen auf die Stabilität des MLH1-PMS2-Heterodimers, die ATPase-Aktivität von MutLα oder die Assemblierung des ternären MutLα-MutSα-Heteroduplex-Komplexes, aber sie inaktivieren die Endonuklease und führen zu einem totalen Verlust der Fehlpaarungsreparatur in humanen, Hefe- und Mäusezellen.^[75–77] In Mäusen ist die Inaktivierung der MutLα-Endonukleasefunktion mit einer sehr starken Krebsprädisposition und einem partiellen Defekt im Immunoglobulinklassenwechsel assoziiert.^[77]

Obwohl es nicht in Mitgliedern der MLH1-Familie vorkommt, ist das DQHA(X)₂E(X)₄E-Endonukleasemotiv in den eukaryotischen PMS2-Homologen konserviert und findet sich außerdem in vielen bakteriellen MutL-Proteinen (Abbildung 14). Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass, ähnlich wie humanes MutLα und Hefe-MutLα, zumindest einige dieser bakteriellen MutL-Proteine Endonukleasefunktion besitzen.^[78] Eine erwähnenswerte Ausnahme sind die MutL-Proteine von Bakterien wie *E. coli* und verwandten Organismen, deren Fehlpaarungsreparatur von der d(GATC)-Methylierung abhängt. Auffälligerweise fehlt diesen Proteinen das Motiv, und sie verlieren offenbar ihre Endonukleaseaktivität.^[22,76] Daraus folgt, dass es in der Natur zwei völlig unter-

schiedliche Mechanismen der Strang-Erkennung in der Fehlpaarungsreparatur gibt.

Der Mechanismus der MutLα-Aktivierung ist komplex, Anna Pluciennik und Leo Dzantiev konnten jedoch etliche Aspekte aufklären,^[79] z.B. dass die einzige Funktion des präexistierenden Strangbruchs im Heteroduplex (Abbildung 12) darin besteht, eine Bindestelle für die DNA-Klammer PCNA bereitzustellen, und dass die Funktion des RFC in der MutLα-Aktivierung auf die Zuführung der DNA-Klammer zur Helix beschränkt ist. Das auf die Helix geladene PCNA hat zwei wichtige Funktionen in der Reparaturreaktion. Die physikalische Interaktion von MutLα mit dem gebundenen PCNA ist entscheidend für die Aktivierung der Endonuklease, und die Orientierung, in welcher der PCNA auf die DNA geladen wird, bestimmt die Strangdirektionalität der Endonukleasewirkung.^[79] Diese Funktionen des gebundenen PCNA sind in Abbildung 15 illustriert. Die zwei Seiten des PCNA sind nicht äquivalent. Der RFC lädt das PCNA in definierter Orientierung auf einen 3'-Doppelstrang-Einzelstrang-Übergang (Abbildung 15; die goldfarbene Seite ist zum 3'-Terminus orientiert). Die Arbeitsgruppen von Jiricny und Kolodner wiesen nach, dass MutSα über eine physikali-

			N	K		
H. sapiens	PMS2	696	FIVDQHATDEKYNFEM	711		
H. sapiens	MLH3	1220	VLVDQHAAHERIRLEQ	1235		
D. melanogaster	PMS2	715	FIVDQHATDEKYNFET	730		
C. elegans	PMS2	639	FIVDQHASDEKYNFER	654		
A. thaliana	PMS1	725	FIVDQHAADKFNFEH	740		
S. cerevisiae	MLH3	520	VLVDQHACDERIRLEE	535		
S. cerevisiae	PMS1	729	FIVDQHASDEKYNFET	744		
N. pharaonis	MutL	533	VLIDQHAADERINYEY	548		
M. mazei	MutL	510	VIIDQHAAHERILYEY	538		
B. subtilis	MutL	459	YIIDQHAAQERIKYEY	474		
L. innocua	MutL	418	YIIDQHAAQERIKYEF	450		
L. casei	MutL	473	YILDQHAAQERVNYEY	488		
S. aureus	MutL	501	YMIDQHAAQERIKYEY	516		
T. aquaticus	MutL	360	YIVDQHAAHERILFEE	375		
H. sapiens	MLH1	304	DVNVHPTKHEVHFLHE	319		
H. sapiens	PMS1	36	GATSDVKLENYGFDK	51		
S. cerevisiae	MLH2	243	IVEENFVIDEKINLDL	258		
E. coli	MutL	300	DVNVHPAKHEVRFHQ	315		
S. typhimurium	MutL	300	DVNVHPAKHEVRFHQ	315		

Abbildung 14. MutL α -Endonukleasemotiv. Das C-terminale PMS2-Endonukleasemotiv DQHA(X)₂E(X)₄E ist in eukaryotischen PMS2-Homologen (PMS1 aus *S. cerevisiae* ist homolog zu humaner PMS2) und vielen bakteriellen MutL-Proteinen konserviert, mit Ausnahme des MutL-Proteins von Bakterien wie *E. coli*, deren direkte Fehlpaarungsreparatur von der d(GATC)-Methylierung abhängt. Oben blau dargestellte Aminosäuren wurden als Mutationen eingeführt, um den Einfluss des Motivs auf die MutL α -Funktion zu untersuchen. Mit freundlicher Genehmigung aus Lit. [75], Copyright Elsevier, 2006.

sche Interaktion mit dem PCNA an die Replikationsgabel gebunden wird.^[80,81] Beide Proteine sind dazu befähigt, sich entlang der Helix zu bewegen.^[34–36,82] Die Fehlpaarungserkennung durch MutSa führt zur Rekrutierung von MutLa, welches in der Lage ist, mit beiden Proteinen zu interagieren. Die Idee ist nun, dass die Asymmetrie der PCNA-Beladung in diesem MutLa-PCNA-Komplex erhalten bleibt und dieser Umstand dazu dient, das aktive Zentrum der MutLa-Endonuklease zu den beiden DNA-Strängen der Helix zu orientieren.

Als wir mit unseren Arbeiten zur Fehlpaarungsreparatur beim Menschen begannen, hatten wir keine Vorstellung von der Natur der biologischen Strangsignale, wenngleich wir und andere damals vermuteten, dass die im Verlauf der DNA-Replikation natürlich auftretenden DNA-Termini in dieser Hinsicht ausreichend sein könnten.^[41,67,83] Die strangspezifischen Reaktionen, die oben beschrieben wurden, sind mit dieser Sichtweise im Einklang. 5'-Termini am Rückwärtsstrang der Replikationsgabel unterstützen vermutlich die Beladung mit dem MutSa-aktivierten Exo1, und genetische Studien von Kolodner und Kunkel untermauern diese Vorstellung.^[81,84] Darüber hinaus wird die Strangdirektionalität der MutLa-Endonukleasewirkung durch die Orientierung des PCNA auf der Helix gesteuert, was wiederum von den 3'-Termini am Führungs- und Rückwärtsstrang der Replikationsgabel bestimmt wird. Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass 5'- und 3'-DNA-Termini, die im Verlauf der DNA-Replikation natürlicherweise auftreten, als Signale für die Steuerung der Fehlpaarungsreparatur in eukaryotischen Zellen dienen.

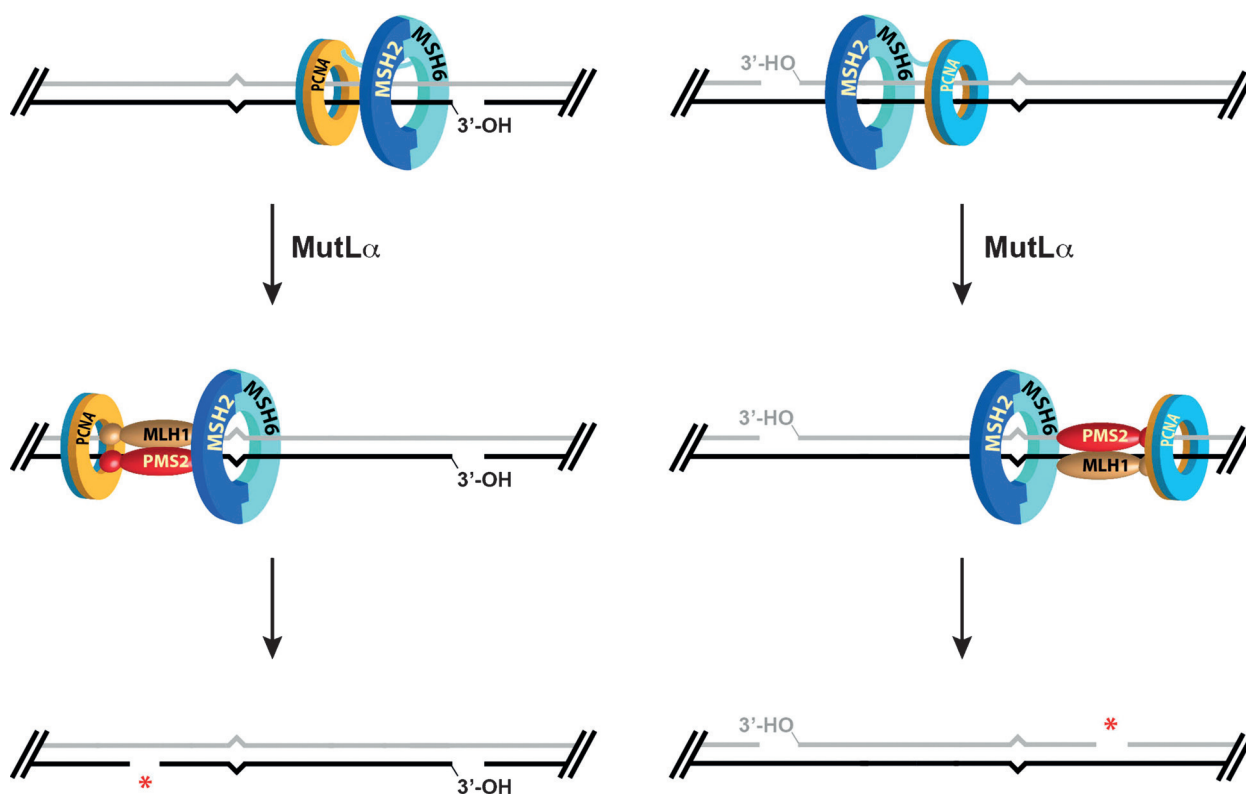


Abbildung 15. Die Strangdirektionalität der MutL α -Endonuklease wird dadurch bestimmt, in welcher Orientierung die DNA-Klammer PCNA auf die DNA-Helix geladen wird.

Danksagung

Ich danke den vielen herausragenden Studenten, Doktoranden und Postdoktoranden, mit denen gemeinsam ich die hier beschriebenen Arbeiten zur Fehlpaarungsreparatur durchgeführt habe. Ich danke außerdem dem Howard Hughes Medical Institute und den National Institutes of Health für die großzügige Unterstützung.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 8490–8501
Angew. Chem. **2016**, 128, 8630–8642

- [1] „A mechanism for gene conversion in fungi“: R. Holliday, *Genet. Res.* **1964**, 5, 282–304.
- [2] „Chromosome breakage accompanying genetic recombination in bacteriophage“: M. Meselson, J. J. Weigle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1961**, 47, 857–868.
- [3] „Genetic studies of recombining DNA in pneumococcal transformation“: H. Ephrussi-Taylor, T. C. Gray, *J. Gen. Physiol.* **1966**, 49, 211–231.
- [4] „Genetic consequences of transfection with heteroduplex bacteriophage lambda DNA“: R. L. White, M. S. Fox, *Mol. Gen. Genet.* **1975**, 141, 163–171.
- [5] „Mismatch repair in heteroduplex DNA“: J. Wildenberg, M. Meselson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, 72, 2202–2206.
- [6] „Repair tracts in mismatched DNA heteroduplexes“: R. Wagner, M. Meselson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, 73, 4135–4139.
- [7] „Postreplicative mismatch repair“: J. Jiricny, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2013**, 5, a012633.
- [8] „Effects of high levels of DNA adenine methylation on methyl-directed mismatch repair in *Escherichia coli*“: P. J. Pukkila, J. Peterson, G. Herman, P. Modrich, M. Meselson, *Genetics* **1983**, 104, 571–582.
- [9] „*Escherichia coli* mutants *uvrD uvrE* deficient in gene conversion of lambda heteroduplexes“: P. Nevers, H. Spatz, *Mol. Gen. Genet.* **1975**, 139, 233–243.
- [10] „Bromouracil mutagenesis and mismatch repair in mutator strains of *Escherichia coli*“: B. Rydberg, *Mutat. Res.* **1978**, 52, 11–24.
- [11] „*Escherichia coli* mutator mutants deficient in methylation-structured DNA mismatch correction“: B. W. Glickman, M. Radman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, 77, 1063–1067.
- [12] „Restriction endonuclease B and fl heteroduplex DNA“: G. F. Vovis, K. Horiuchi, N. Hartman, N. D. Zinder, *Nat. New Biol.* **1973**, 246, 13–16.
- [13] „Genetic studies with heteroduplex DNA of bacteriophage fl. Asymmetric segregation, base correction, and implications for the mechanism of genetic recombination“: V. Enea, G. F. Vovis, N. D. Zinder, *J. Mol. Biol.* **1975**, 96, 495–509.
- [14] „Methyl-directed repair of DNA base-pair mismatches in vitro“: A. L. Lu, S. Clark, P. Modrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, 80, 4639–4643.
- [15] „Repair of DNA base-pair mismatches in extracts of *Escherichia coli*“: A. L. Lu, K. Welsh, S. Clark, S. S. Su, P. Modrich, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1984**, 49, 589–596.
- [16] „Mispair specificity of methyl-directed DNA mismatch correction in vitro“: S.-S. Su, R. S. Lahue, K. G. Au, P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 6829–6835.
- [17] „Requirement for d(GATC) sequences in *Escherichia coli* *mutHLS* mismatch correction“: R. S. Lahue, S. S. Su, P. Modrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 1482–1486.
- [18] „Gap formation is associated with methyl-directed mismatch correction under conditions of restricted DNA synthesis“: S. S. Su, M. Grilley, R. Thresher, J. Griffith, P. Modrich, *Genome* **1989**, 31, 104–111.
- [19] „Bidirectional excision in methyl-directed mismatch repair“: M. Grilley, J. Griffith, P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 11830–11837.
- [20] „*Escherichia coli* *mutS*-encoded protein binds to mismatched DNA base pairs“: S.-S. Su, P. Modrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 5057–5061.
- [21] „Isolation and characterization of the *Escherichia coli* *mutH* gene product“: K. M. Welsh, A. L. Lu, S. Clark, P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 15624–15629.
- [22] „Isolation and characterization of the *Escherichia coli* *mutL* gene product“: M. Grilley, K. M. Welsh, S.-S. Su, P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 1000–1004.
- [23] „DNA mismatch correction in a defined system“: R. S. Lahue, K. G. Au, P. Modrich, *Science* **1989**, 245, 160–164.
- [24] „The *E. coli* *uvrD* gene product is DNA helicase II“: I. D. Hickson, H. M. Arthur, D. Bramhill, P. T. Emmerson, *Mol. Gen. Genet.* **1983**, 190, 265–270.
- [25] „The crystal structure of DNA mismatch repair protein MutS binding to a G-T mismatch“: M. H. Lamers, A. Perrakis, J. H. Enzlin, H. H. Winterwerp, N. de Wind, T. K. Sixma, *Nature* **2000**, 407, 711–717.
- [26] „Methyl-directed mismatch repair is bidirectional“: D. L. Cooper, R. S. Lahue, P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 11823–11829.
- [27] „*In vivo* requirement for RecJ, ExoVII, ExoI, and ExoX in methyl-directed mismatch repair“: V. Burdett, C. Baitinger, M. Viswanathan, S. T. Lovett, P. Modrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 6765–6770.
- [28] „Redundant exonuclease involvement in *Escherichia coli* methyl-directed mismatch repair“: M. Viswanathan, V. Burdett, C. Baitinger, P. Modrich, S. T. Lovett, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 31053–31058.
- [29] „Exonuclease VII of *Escherichia coli*: mechanism of action“: J. W. Chase, C. C. Richardson, *J. Biol. Chem.* **1974**, 249, 4553–4561.
- [30] „Initiation of methyl-directed mismatch repair“: K. G. Au, K. Welsh, P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 12142–12148.
- [31] „Mismatch, MutS, MutL, and helicase II-dependent unwinding from the single-strand break of an incised heteroduplex“: V. Dao, P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 9202–9207.
- [32] „MutS and MutL activate DNA helicase II, in a mismatch-dependent manner“: M. Yamaguchi, V. Dao, P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 9197–9201.
- [33] „Involvement of the beta clamp in methyl-directed mismatch repair in vitro“: A. Pluciennik, V. Burdett, O. Lukianova, M. O'Donnell, P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 32782–32791.
- [34] „DNA Mismatch Repair“: T. A. Kunkel, D. A. Erie, *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, 74, 681–710.
- [35] „DNA mismatch repair: functions and mechanisms“: R. R. Iyer, A. Pluciennik, V. Burdett, P. L. Modrich, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 302–323.
- [36] „Mismatch Repair“: R. Fishel, *J. Biol. Chem.* **2015**, 290, 26395–26403.
- [37] „Mismatch correction catalyzed by cell-free extracts of *Saccharomyces cerevisiae*“: C. Muster-Nassal, R. Kolodner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 7618–7622.
- [38] „DNA mismatch repair detected in human cell extracts“: P. M. Glazer, S. N. Sarkar, G. E. Chisholm, W. C. Summers, *Mol. Cell. Biol.* **1987**, 7, 218–224.
- [39] „Different base/base mispairs are corrected with different efficiencies and specificities in monkey kidney cells“: T. C. Brown, J. Jiricny, *Cell* **1988**, 54, 705–711.
- [40] „Mismatch repair involving localized DNA synthesis in extracts of *Xenopus* eggs“: P. Brooks, C. Dohet, G. Almouzni, M. Mechali, M. Radman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 4425–4429.

- [41] „Strand-specific mismatch correction in nuclear extracts of human and *Drosophila melanogaster* cell lines“: J. Holmes, S. Clark, P. Modrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 5837–5841.
- [42] „Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer“: L. A. Aaltonen, P. Peltomäki, F. S. Leach, P. Sistonen, L. Pylkkänen, J.-P. Mecklin, H. Järvinen, S. M. Powell, J. Jen, S. R. Hamilton, G. M. Petersen, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, A. de la Chapelle, *Science* **1993**, *260*, 812–816.
- [43] „Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis“: Y. Ionov, M. A. Peinado, S. Malkhosyan, D. Shibata, M. Perucho, *Nature* **1993**, *363*, 558–561.
- [44] „Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer“: P. Peltomäki, *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 1174–1179.
- [45] „Inherited susceptibility to colorectal cancer“: P. T. Rowley, *Annu. Rev. Med.* **2005**, *56*, 539–554.
- [46] „High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12“: G. Levinson, G. A. Gutman, *Nucleic Acids Res.* **1987**, *15*, 5323–5338.
- [47] „Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER⁺ tumoral cells“: R. Parsons, G. M. Li, M. J. Longley, W. H. Fang, N. Papadopoulos, J. Jen, A. de la Chapelle, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, P. Modrich, *Cell* **1993**, *75*, 1227–1236.
- [48] „Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores mismatch repair to tumor cells“: J. T. Drummond, G.-M. Li, M. J. Longley, P. Modrich, *Science* **1995**, *268*, 1909–1912.
- [49] „Restoration of mismatch repair to nuclear extracts of H6 colorectal tumor cells by a heterodimer of human MutL homologs“: G. M. Li, P. Modrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 1950–1954.
- [50] „Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers“: M. L. Veigl, L. Kasturi, J. Olechnowicz, A. H. Ma, J. D. Lutterbaugh, S. Periyasamy, G. M. Li, J. Drummond, P. L. Modrich, W. D. Sedwick, S. D. Markowitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 8698–8702.
- [51] „MSH6, a *Saccharomyces cerevisiae* protein that binds to mismatches as a heterodimer with MSH2“: I. Iaccarino, F. Palombo, J. Drummond, N. F. Totty, J. J. Hsuan, P. Modrich, J. Jiricny, *Curr. Biol.* **1996**, *6*, 484–486.
- [52] „Isolation of hMutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of hMutSbeta and hMutSalpha“: J. Genschel, S. J. Littman, J. T. Drummond, P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 19895–19901.
- [53] „Identification of mismatch repair genes and their role in the development of cancer“: R. Fishel, R. D. Kolodner, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1995**, *5*, 382–395.
- [54] „Lessons from hereditary colorectal cancer“: K. W. Kinzler, B. Vogelstein, *Cell* **1996**, *87*, 159–170.
- [55] „Increased mutation rate at the *hprt* locus accompanies microsatellite instability in colon cancer“: J. R. Eshleman, E. Z. Lang, G. K. Bowerfind, R. Parsons, B. Vogelstein, J. K. Willson, M. L. Veigl, W. D. Sedwick, S. D. Markowitz, *Oncogene* **1995**, *10*, 33–37.
- [56] „Mutation rate at the *hprt* locus in human cancer cell lines with specific mismatch repair-gene defects“: W. E. Glaab, K. R. Tindall, *Carcinogenesis* **1997**, *18*, 1–8.
- [57] „Functional overlap in mismatch repair by human MSH3 and MSH6“: A. Umar, J. I. Risinger, W. E. Glaab, K. R. Tindall, J. C. Barrett, T. A. Kunkel, *Genetics* **1998**, *148*, 1637–1646.
- [58] „Mutator pathways unleashed by epigenetic silencing in human cancer“: F. V. Jacinto, M. Esteller, *Mutagenesis* **2007**, *22*, 247–253.
- [59] „hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6“: S. Acharya, T. Wilson, S. Gradia, M. F. Kane, S. Guerrette, G. T. Marsischky, R. Kolodner, R. Fishel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 13629–13634.
- [60] „Binding of insertion/deletion DNA mismatches by the heterodimer of yeast mismatch repair proteins MSH2 and MSH3“: Y. Habraken, P. Sung, L. Prakash, S. Prakash, *Curr. Biol.* **1996**, *6*, 1185–1187.
- [61] „hMutSb, a heterodimer of hMSH2 and hMSH3, binds to insertion/deletion loops in DNA“: F. Palombo, I. Iaccarino, E. Nakajima, M. Ikejima, T. Shimada, J. Jiricny, *Curr. Biol.* **1996**, *6*, 1181–1184.
- [62] „A role for exonuclease I from *S. pombe* in mutation avoidance and mismatch correction“: P. Szankasi, G. R. Smith, *Science* **1995**, *267*, 1166–1169.
- [63] „Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* EXO1, a gene encoding an exonuclease that interacts with MSH2“: D. X. Tishkoff, A. L. Boerger, P. Bertrand, N. Filosi, G. M. Gaida, M. F. Kane, R. D. Kolodner, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 7487–7492.
- [64] „Human exonuclease I is required for 5' and 3' mismatch repair“: J. Genschel, L. R. Bazemore, P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 13302–13311.
- [65] „The evolutionarily conserved zinc finger motif in the largest subunit of human replication protein A is required for DNA replication and mismatch repair but not for nucleotide excision repair“: Y. L. Lin, M. K. Shivji, C. Chen, R. Kolodner, R. D. Wood, A. Dutta, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 1453–1461.
- [66] „Partial reconstitution of human DNA mismatch repair in vitro: characterization of the role of human replication protein A“: C. Ramilo, L. Gu, S. Guo, X. Zhang, S. M. Patrick, J. J. Turchi, G. M. Li, *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 2037–2046.
- [67] „Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis“: A. Umar, A. B. Buermeier, J. A. Simon, D. C. Thomas, A. B. Clark, R. M. Liskay, T. A. Kunkel, *Cell* **1996**, *87*, 65–73.
- [68] „A defined human system that supports bidirectional mismatch-provoked excision“: L. Dzantiev, N. Constantin, J. Genschel, R. R. Iyer, P. M. Burgers, P. Modrich, *Mol. Cell* **2004**, *15*, 31–41.
- [69] „DNA polymerase delta is required for human mismatch repair in vitro“: M. J. Longley, A. J. Pierce, P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 10917–10921.
- [70] „Human mismatch repair: Reconstitution of a nick-directed bidirectional reaction“: N. Constantin, L. Dzantiev, F. A. Kadyrov, P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 39752–39761.
- [71] „Mechanism of 5'-directed excision in human mismatch repair“: J. Genschel, P. Modrich, *Mol. Cell* **2003**, *12*, 1077–1086.
- [72] „Reconstitution of 5'-directed human mismatch repair in a purified system“: Y. Zhang, F. Yuan, S. R. Presnell, K. Tian, Y. Gao, A. E. Tomkinson, L. Gu, G. M. Li, *Cell* **2005**, *122*, 693–705.
- [73] „Functions of MutL[alpha], RPA, and HMGB1 in 5'-directed mismatch repair“: J. Genschel, P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 21536–21544.
- [74] „PARP-1 enhances the mismatch-dependence of 5'-directed excision in human mismatch repair in vitro“: Y. Liu, F. A. Kadyrov, P. Modrich, *DNA Repair* **2011**, *10*, 1145–1153.
- [75] „Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair“: F. A. Kadyrov, L. Dzantiev, N. Constantin, P. Modrich, *Cell* **2006**, *126*, 297–308.
- [76] „*Saccharomyces cerevisiae* MutLa is a mismatch repair endonuclease“: F. A. Kadyrov, S. F. Holmes, M. E. Arana, O. A. Lukianova, M. O'Donnell, T. A. Kunkel, P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 37181–37190.
- [77] „PMS2 endonuclease activity has distinct biological functions and is essential for genome maintenance“: J. M. van Oers, S. Roa, U. Werling, Y. Liu, J. Genschel, H. Hou, Jr., R. S. Sellers, P.

- Modrich, M. D. Scharff, W. Edelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 13384–13389.
- [78] „Mismatch repair in Gram-positive bacteria“: J. S. Lenhart, M. C. Pilon, A. Guarne, J. S. Biteen, L. A. Simmons, *Res. Microbiol.* **2016**, in press.
- [79] „PCNA function in the activation and strand direction of MutLalpha endonuclease in mismatch repair“: A. Pluciennik, L. Dzantiev, R. R. Iyer, N. Constantin, F. A. Kadyrov, P. Modrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 16066–16071.
- [80] „hMSH3 and hMSH6 interact with PCNA and colocalize with it to replication foci“: H. E. Kleczkowska, G. Marra, T. Lettieri, J. Jiricny, *Genes Dev.* **2001**, *15*, 724–736.
- [81] „Visualization of eukaryotic DNA mismatch repair reveals distinct recognition and repair intermediates“: H. Hombauer, C. S. Campbell, C. E. Smith, A. Desai, R. D. Kolodner, *Cell* **2011**, *147*, 1040–1053.
- [82] „Replication clamps and clamp loaders“: M. Hedglin, R. Kumar, S. J. Benkovic, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2013**, *5*, a010165.
- [83] „Heteroduplex deoxyribonucleic acid base mismatch repair in bacteria“: J.-P. Claverys, S. A. Lacks, *Microbiol. Rev.* **1986**, *50*, 133–165.
- [84] „Exonuclease 1 preferentially repairs mismatches generated by DNA polymerase alpha“: S. E. Liberti, A. A. Larrea, T. A. Kunkel, *DNA Repair* **2013**, *12*, 92–96.

Eingegangen am 9. Februar 2016

Online veröffentlicht am 20. Mai 2016

Übersetzt von Prof. Dr. Thomas Carell und Dr. Dorothea Matschkal, München