

Die intrinsische Fragilität der DNA (Nobel-Aufsatz)**

Tomas Lindahl*

Basenfehlpaarung · DNA-Reparatur · Nobel-Auf-
satz · Reparaturenzyme

Alle Makromoleküle sind zu einem gewissen Grad instabil. Meine eigenen Arbeiten haben sich mit der inhärenten Labilität der DNA befasst.^[1,2] In meinen frühen Studien als Postdoktorand an der Princeton University in den 60er Jahren erforschten wir die hitzeinduzierte Gestaltänderung und Entfaltung der makromolekularen Struktur aufgereinigter Transfer-RNA, jener kleinen RNA-Moleküle, die entscheidende Bestandteile der Proteinsynthese sind.^[3] In diesen zeitaufwändigen Experimenten beobachtete ich zu meiner Überraschung, dass die aufgereinigte tRNA nicht nur bei erhöhten Temperaturen entfaltete, sondern sich auch auf irreversible Weise sehr langsam zersetzte.^[4] Von Kollegen bekam ich den Hinweis, dass an menschlichen Fingern oft beträchtliche Mengen an Ribonuklease hafteten – dem RNA abbauenden Enzym also –, und dass mein Problem verschwinden sollte, wenn ich meine Arbeitstechnik verbessern würde. Das war jedoch nicht das Fall: Ich fand, dass etliche tRNA-Präparationen, die ich auf unterschiedliche Weise hergestellt hatte, sich auf die gleiche Weise zersetzen. Ich vertiefte diese Arbeiten und konnte zeigen, dass die Zersetzung der tRNA mit der Zerstörung einzelner Nukleobasen sowie auch der langsamen Spaltung der Phosphodiesterbindungen einherging, welche die Nukleotidbausteine miteinander verbinden. Ich veröffentlichte sogar einen kurzen Beitrag über die hitzeinduzierte Zersetzung von tRNA, den niemand besonders interessant fand.^[4] Folglich wendete ich mich anderen experimentellen Arbeiten zu und erforschte nun die Ligation und Prozessierung von Strangbrüchen in der DNA durch zuvor unbekannte Sägerenzyme wie DNA-Ligasen und Exonukleasen.^[5,6] Ich hatte aber nicht die rätselhafte Zersetzung der tRNA vergessen. Als ich ein paar Jahre später nach Schweden zurückkehrte und meine eigene Forschungsgruppe in Stockholm gründete, wollte ich untersuchen, ob die DNA, wie die tRNA, der langsamen Zersetzung unterliegt.

Das war eine ziemlich unwahrscheinliche Vorstellung, denn die allgemeine Annahme war, dass die DNA als Träger der genetischen Information in der intrazellulären Umgebung sehr stabil sein sollte (Abbildung 1). Ich stellte keinen Forschungsantrag, da ohnehin kaum Aussicht auf Unterstützung dieser unkonventionellen Arbeiten bestand, sondern setzte schwedische Forschungsmittel ein, die ich für Studien der enzymatischen Prozessierung von DNA-Strangbrüchen in Sägerzellen empfangen hatte. Die anfängliche Strategie bestand darin, einige Pilotexperimente zur Instabilität der DNA durchzuführen, und wären die Ergebnisse nicht viel-

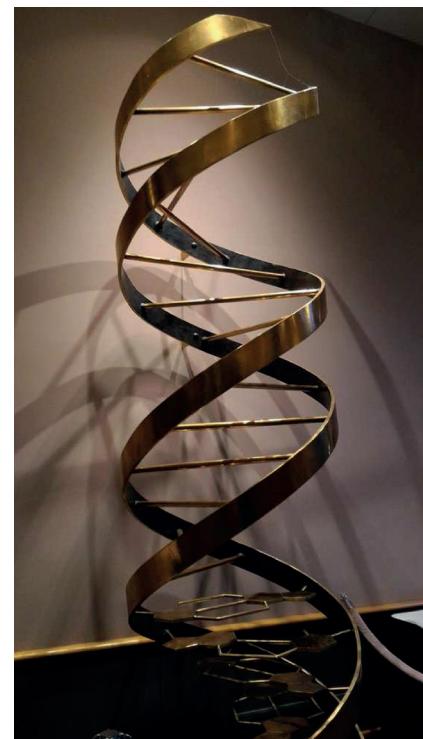


Abbildung 1. Die Stabilität der DNA.

versprechend gewesen, hätten wir das Projekt schnell wieder begraben. Aber es zeigte sich, dass die DNA, obwohl sie deutlich stabiler war als RNA, einer sehr langsamen, jedoch relevanten Zersetzung in neutralem wässrigem Puffer unterlag.

Zusammen mit meinem Laborassistenten Barbro Nyberg entwarf ich eine Serie von zeitaufwändigen Experimenten, mit denen wir versuchten, die langsame Zersetzung von DNA-Lösungen unter physiologischen Bedingungen zu

[*] Prof. T. Lindahl
Cancer Research UK, Clare Hall Laboratories
Hertfordshire EN6 3LD (UK)
E-Mail: tomas.lindahl@crick.ac.uk

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

quantifizieren. Das bedeutete, dass wir die Stabilität der DNA bei verschiedenen pH-Werten, die nicht allzu sehr vom neutralen pH entfernt lagen, bei erhöhten Temperaturen und unterschiedlichen Ionenstärken untersuchten. Um unsere Analysen zu vereinfachen, führten wir die meisten Studien mit DNA durch, die an einzelnen Baseresten radioaktiv markiert war; solche DNA kann aus mutierten Bakterienstämmen durch Züchtung in Gegenwart kommerziell erhältlicher radioaktiver Basereste hergestellt werden. DNA aus entweder *B. subtilis* oder *E. coli* wurde verwendet, um mögliche Komplikationen aufgrund der Gegenwart der modifizierten Basen 6-Methyladenin und 5-Methylcytosin zu vermeiden. Darüber hinaus wurde mit ^{14}C (statt mit ^3H) markierte DNA eingesetzt, um während der langen Inkubationen den möglichen Austausch von ^3H mit dem wässrigen Lösungsmittel zu vermeiden.

Proben solcher DNA-Lösungen wurden über mehrere Tage inkubiert und dann durch Chromatographie analysiert. Die auffälligste Änderung war, dass kleine Mengen von Baseresten aus der DNA verloren gingen, insbesondere die Purinbasen Guanin und Adenin.^[7] Abbildung 2 zeigt eine Zusammenfassung der gefundenen Änderungen; ein Abschnitt von einem oder zwei DNA-Strängen ist dargestellt, Pfeile zeigen die veränderte Stelle an. Die Spaltung einer Base-Zucker-Bindung führt zum Verlust der genetischen Information und der Bildung einer abasischen Stelle in der

DNA. Die abasischen Stellen, die aus dem Verlust der Basen Guanin oder Adenin resultieren, sind chemisch identisch und wurden mit gleichen Raten eingeführt. Um also die Identität einer fehlenden Base zu erfahren, muss man die Information im Gegenstrang des DNA-Moleküls heranziehen.

Es gibt auch einige Veränderungen an den verbleibenden DNA-Basen; die wichtigste ist die Deaminierung von Cytosinresten zu Uracil. Diese Modifikation verändert die Kodierungsspezifität der DNA, d.h., eine Mutation ist eingetreten.^[8] Ich analysierte all diese Verluste oder Veränderungen in der DNA und fand überraschend hohe Raten (Abbildung 3).^[1] In einer einzigen Sägerzelle gibt es jeden Tag zehn- bis zwanzigtausend Veränderungen; das gilt für doppelsträngige DNA.

Es gibt einen gewissen Schutz der Basen durch die Doppelhelixstruktur der DNA. Während doppel- und einsträngige DNA mit ungefähr gleichen Raten depuriniert werden (3- bis 4-facher Unterschied), ist eine einsträngige DNA 150-fach anfälliger gegen Deaminierung von Cytosin und 5-Methylcytosin als doppelsträngige DNA. Das bedeutet, dass in einer transkriptional aktiven, replizierenden Zelle am Tag ungefähr 300 potenziell mutagene Cytosin- und 5-Methylcytosin-Deaminierungen auftreten. Dieser Abbau an zellulärer DNA würde zu einem inakzeptabel schädigenden Verlust an genetischer Information führen. Die Antwort auf dieses Dilemma muss sein, dass es einen Korrekturmekanismus gibt.

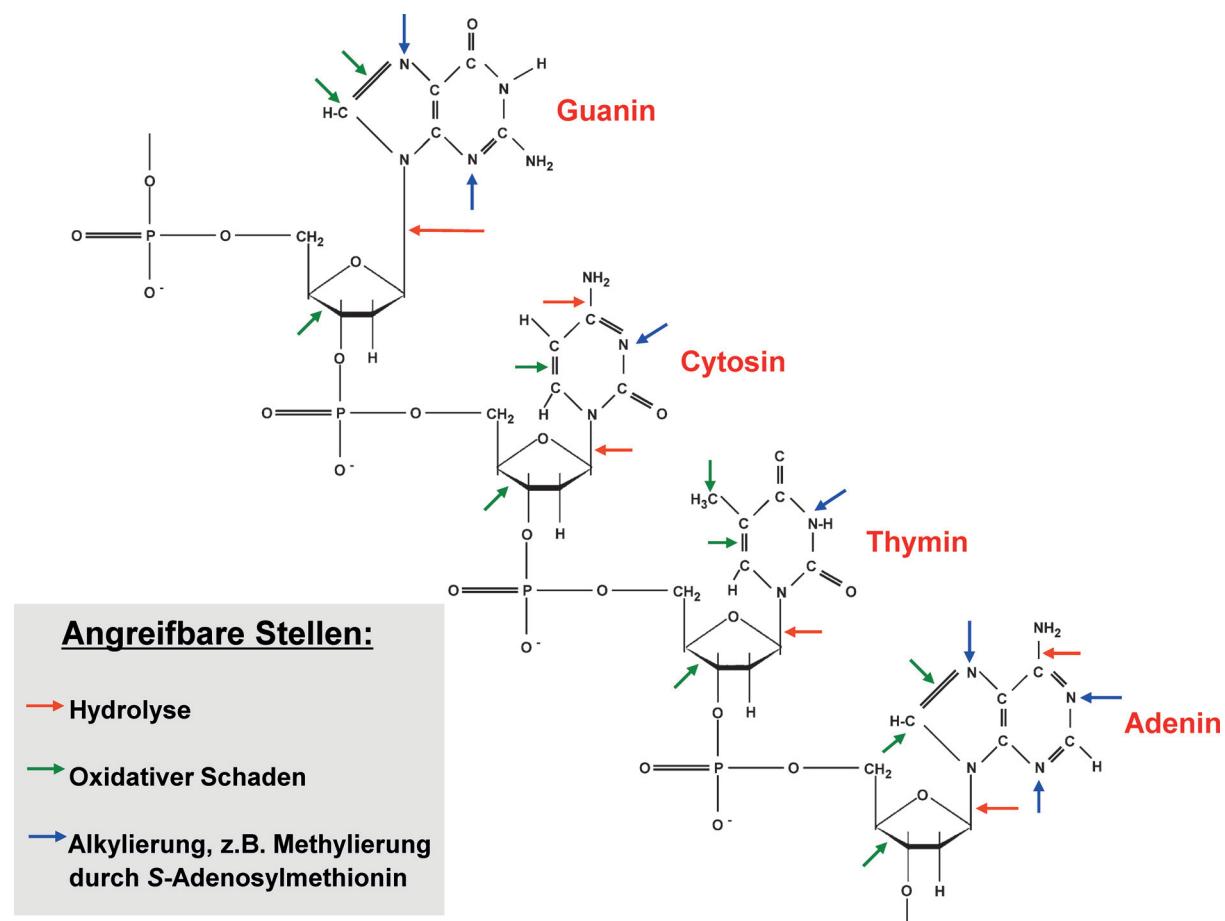


Abbildung 2. DNA-Labilität (insbesondere Depurinierung). Lindahl, *Nature*, 1993.

100% dsDNA	
Hydrolyse	
Depurinierung	9000
Depyrimidierung	300
Deaminierung von Cytosin	50
Deaminierung von 5-Methylcytosin	5
Oxidation	
8-Hydroxyguanin (8-oxoG)	500-1000
Ringgesättigte Pyrimidine (Thyminglycol, Cytosinhydrate)	1000
Lipidperoxidationsprodukte (M,G, Etheno-A, Etheno-C)	1000
Nichtenzymatische Methylierung durch S-Adenosylmethionin	
7-Methylguanin	3000
3-Methyladenin	600
1-Methyladenin/3-Methylcytosin	10-20

Abbildung 3. Spontane DNA-Läsionen in einer Säugerzelle. Angegeben ist jeweils die Zahl der veränderten Nukleotide in einem 3×10^9 Basenpaare großen Genom aus doppelsträngiger DNA nach 24 h bei 37°C.

Bei der Suche nach einem solchen Mechanismus fanden wir, dass abasische Stellen durch „Ausschneiden“ (Exzision) entfernt und ersetzt werden können.^[9] Die gleiche allgemeine Exzisions- und Reparaturstrategie wird für andere Arten von DNA-Schäden benutzt, z.B. solche, die durch ultraviolette Strahlung oder durch Replikationsfehler verursacht werden.

Wenn die DNA eine veränderte Base enthält, etwa ein Uracil, das ein deaminiertes Cytosin sein könnte, kommt eine

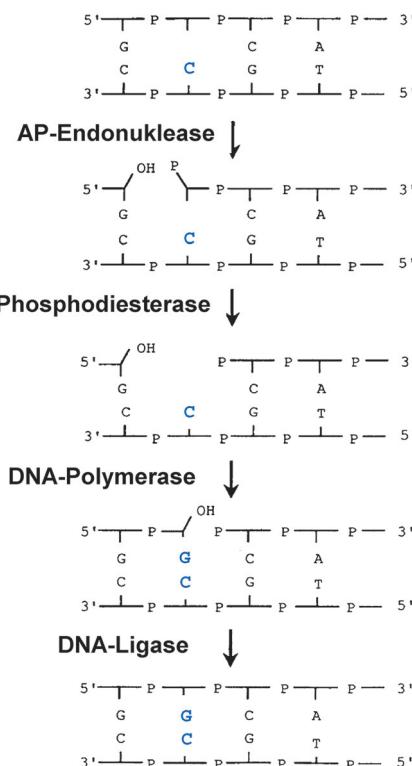


Abbildung 4. Reparatur von abasischen Stellen in DNA. Lindahl, *Nature*, 1993.

- **DNA-Glykosylase entfernt eine beschädigte Base und erzeugt eine AP-Stelle**
- **Das erste entdeckte Enzym dieser Art war die Uracil-DNA-Glykosylase**

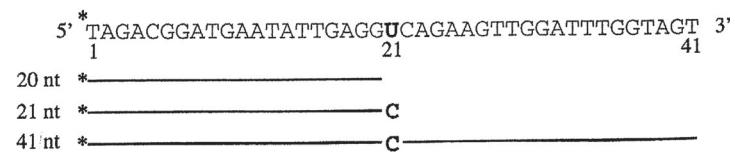
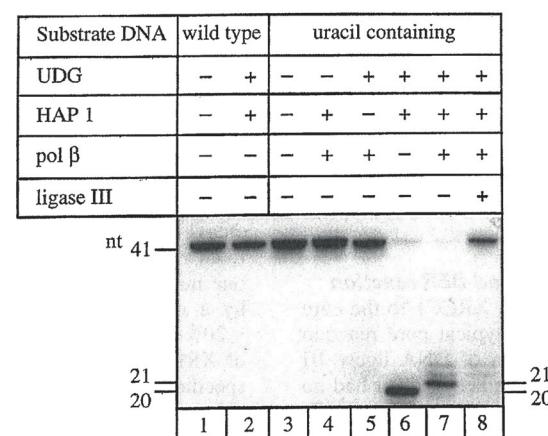
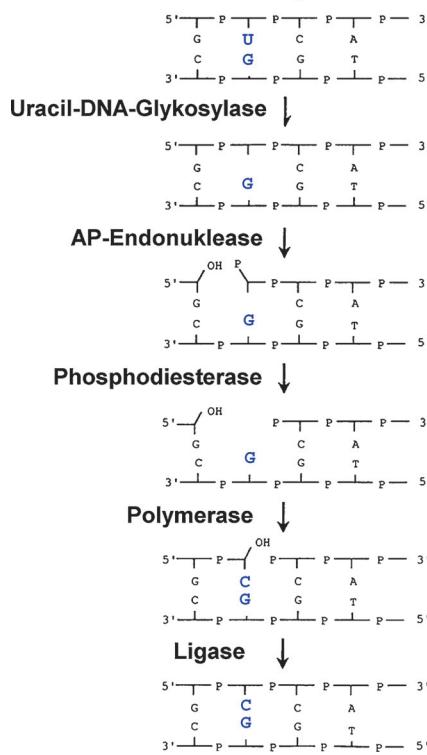


Abbildung 5. Rekonstitution der Basenexzisionsreparatur mit aufgereinigten humanen Proteinen. Kubota et al., *EMBO J.*, 1996.

zuvor unbekannte Klasse von Reparaturenzymen zum Einsatz, nämlich die DNA-Glykolasen, die Base-Zucker-Bindungen in der DNA spalten.^[10] Wir rekonstituierten den Basenexzisionspfad mit aufgereinigten Enzymen, zuerst mit bakteriellen,^[11] später dann mit menschlichen Enzymen (Abbildung 4).^[12]

Für diese Experimente stellten wir einen Abschnitt einer synthetischen doppelsträngigen DNA her, der einen Uracilrest im Zentrum eines der beiden DNA-Stränge aufweist. Nach Trennung der DNA-Stränge kann der Uracilrest durch Gelektrophorese sichtbar gemacht werden. Falls die DNA Uracil enthält, bleibt der DNA-Strang nach Entfernen dieser Base intakt, enthält nun aber eine abasische Stelle, die durch das nächste Enzym im Abbaupfad, die Endonuklease für abasische Stellen, gespalten werden kann. Der Zuckerphosphatrest an der Schadenstelle wird dann entfernt, DNA-Polymerase füllt die kleine Lücke, und die DNA wird schließlich ligiert (Abbildung 5). In Säugerzellen besitzt die lückenfüllende DNA-Polymerase β eine eigene Domäne, die die Freisetzung des basefreien Zuckerphosphats befördert.

Modelle für Aspekte des Abbaupfads wurden von mehreren Arbeitsgruppen vorgeschlagen, einschließlich der unseren. Es ist keine einfache Aufgabe für die DNA-Glykosylase, eine einzelne Uracilbase zu finden, die einen chemisch ähnlichen Cytosin- oder Thyminrest in einem großen DNA-

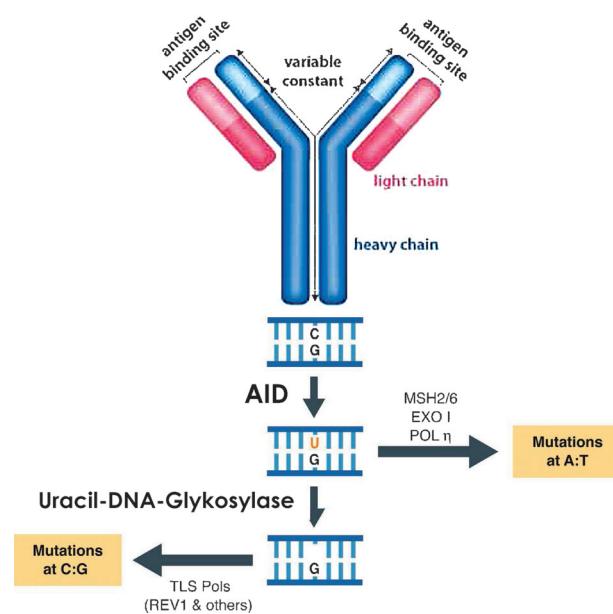


Abbildung 6. Positiver Effekt von DNA-Schäden: Erzeugung von Antikörperfertivität durch somatische Hypermutation. Neuberger & Rada, *J. Exp. Med.*, 2007.

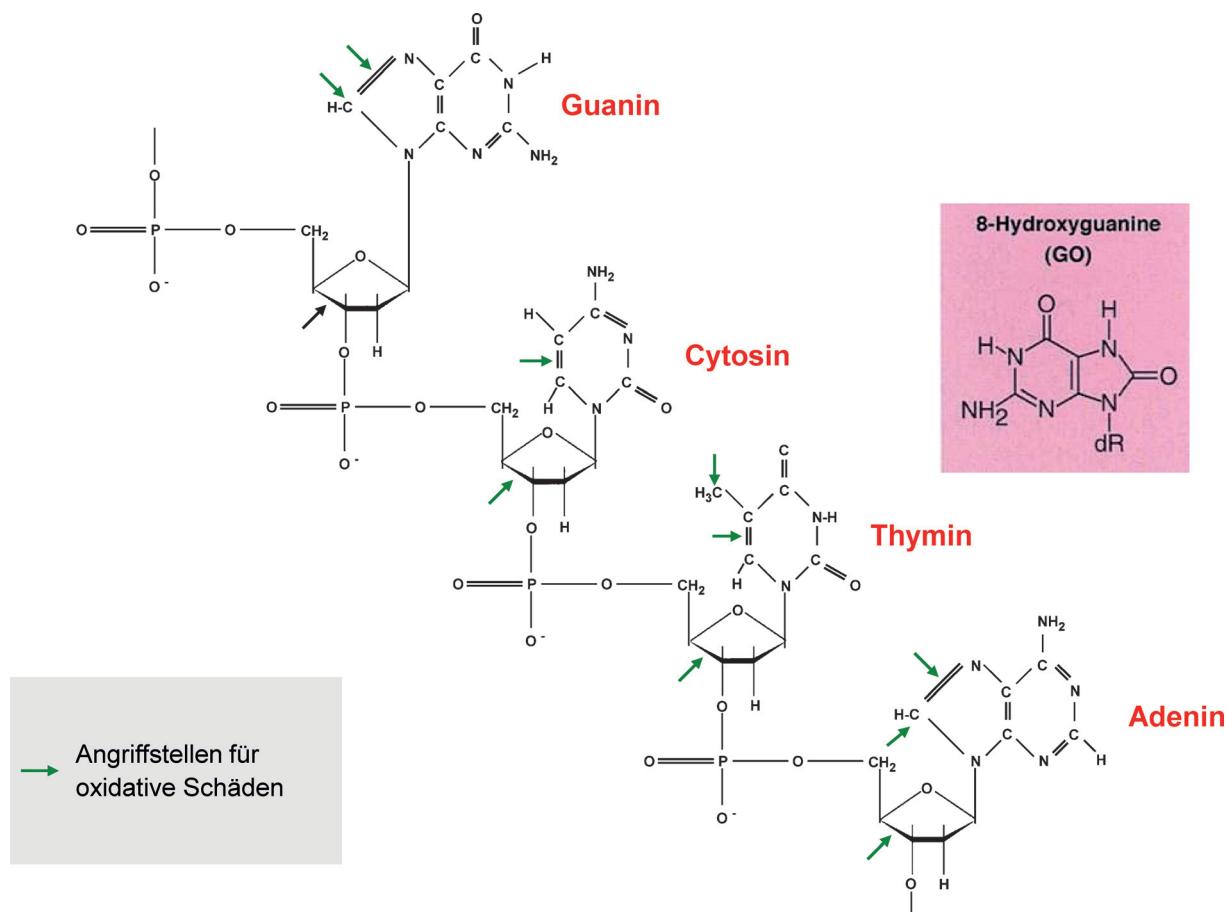


Abbildung 7. DNA-Labilität: oxidativer Schaden. Lindahl, *Nature*, 1993.

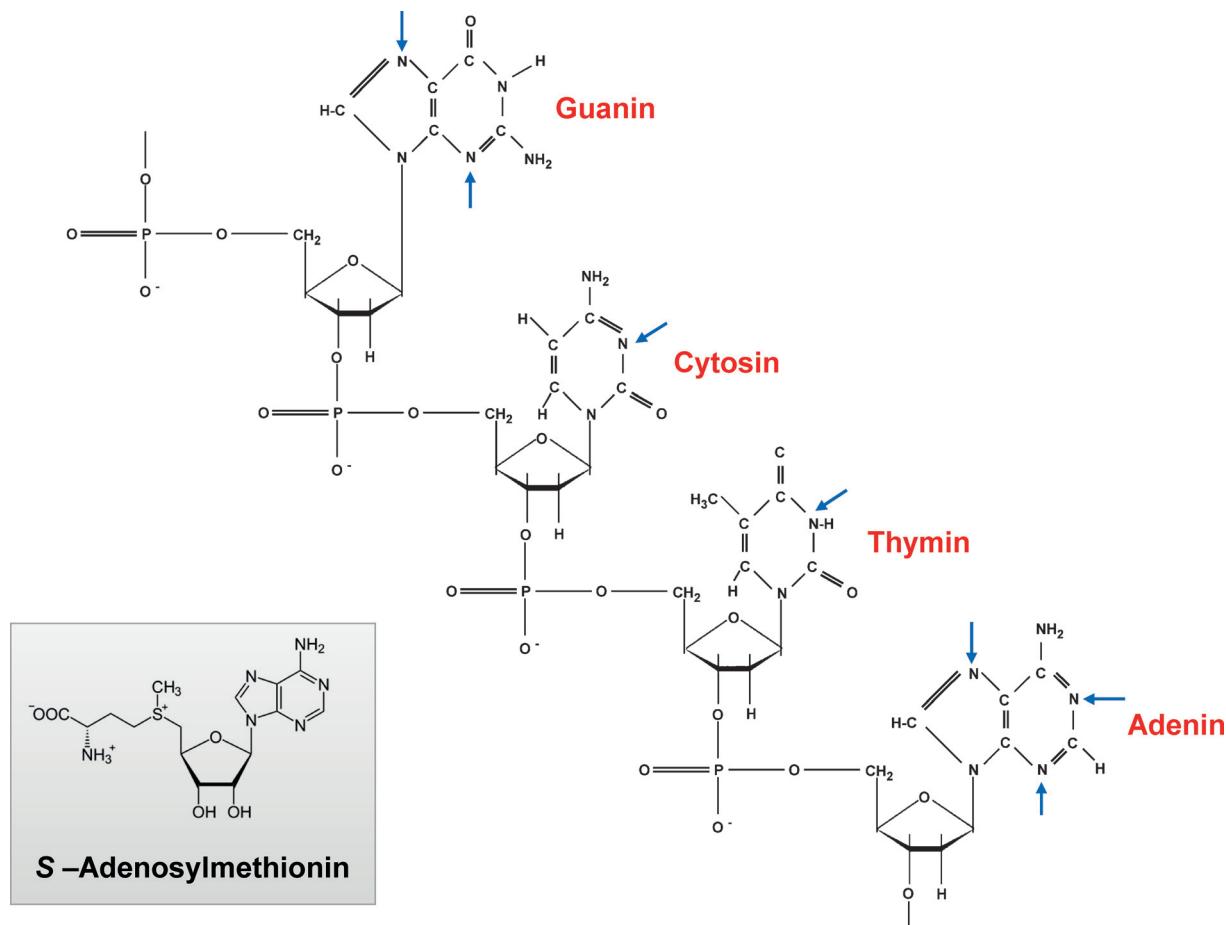


Abbildung 8. DNA-Labilität: Alkylierung. Lindahl, *Nature*, 1993.

Molekül ersetzt hat. Das Enzym sucht die DNA ab, dreht dann üblicherweise die veränderte Base heraus und initiiert den Reparaturprozess.^[13]

Wir haben nun also Reparaturenzyme diskutiert, die geschädigte DNA wiederherstellen können. Gelegentlich jedoch kann ein Organismus induzierte Veränderungen in der DNA-Struktur nutzen, um nützliche genetische Diversität zu erzeugen. Ein spannender Fall ist die effiziente Diversifizierung von Antikörpern. Um das Repertoire an Antikörpern zu vergrößern, besitzt eine antikörperproduzierende Zelle die Fähigkeit, die Struktur antikörperkodierender Gene durch gezielte Deaminierung von Cytosinen in der DNA aktiv zu verändern. Dieses Konzept wurde in brillanter Weise von dem verstorbenen Michael Neuberger am MRC Laboratory of Molecular Biology in Cambridge entwickelt (Abbildung 6). Ich hatte das Vergnügen einer kurzen Zusammenarbeit mit der Neuberger-Gruppe.^[14] Eine spezifische Deaminase, die von T. Honjo entdeckte AID, verursacht die gezielte Deaminierung der Antikörpergene, bevor die Uracil-DNA-Glykosylase dann diese DNA prozessiert und lokale Mutationen anstößt, die letztlich in einer erweiterten und effizienteren Antikörperreaktion resultieren.

Neben den bisher diskutierten hydrolytischen DNA-Schäden gibt es noch andere Arten von DNA-Läsionen, von denen einige von dem Sauerstoff verursacht werden, den wir einatmen und metabolisieren. Eine besonders finstere Form von DNA-Schaden, der durch reaktive Sauerstoffspezies

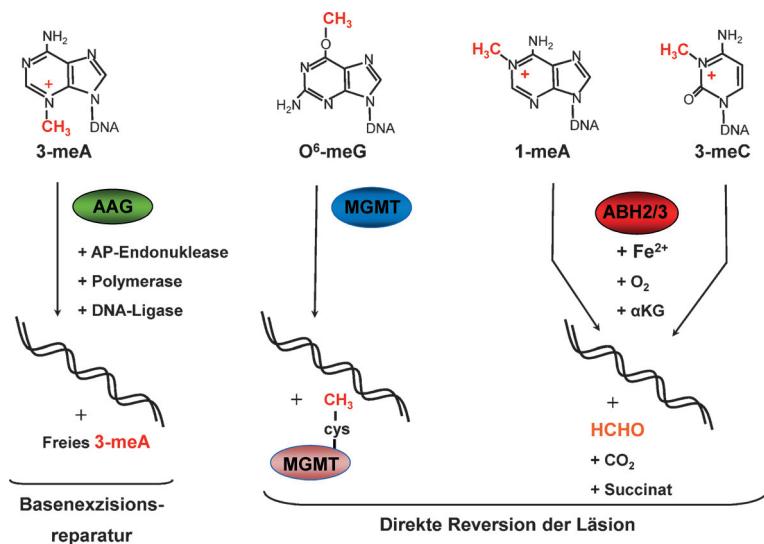


Abbildung 9. Drei Mechanismen für die Reparatur von methylierten DNA-Basen.

hervorgerufen wird, ist die Oxidation von Guaninresten zu 8-Hydroxyguanin, bei der es sich um eine fehlkodierende Base handelt (Abbildung 7). Diese Läsion wird durch eine spezifische DNA-Glykosylase ausgeschnitten, die sich deutlich von der Uracil-Glykosylase unterscheidet.^[15]

Außer Wasser und Sauerstoff kommen auch noch andere endogene Substanzen in Zellen vor, die DNA-Schäden verursachen können. Ein wichtiges Beispiel ist das reaktive Koenzym S-Adenosylmethionin (SAM), das eine alkylierende Substanz ist und Methylierungsschäden in der DNA verursacht.^[16] Es gibt mehrere hierfür anfällige Stellen in der DNA, die sich von den Angriffstellen für Wasser oder Sauerstoff unterscheiden (Abbildung 8). Es existieren drei unterschiedliche Mechanismen für die Reparatur von Methylierungsschäden (Abbildung 9).^[15]

Eine methyierte Base kann die Replikation der DNA verhindern – dies kann eine letale Mutation sein. Ein spezielles Reparaturenzym schneidet methyierte Basen aus, um eine Basenexzisionsreparatur auszulösen.^[17,18] Der Vorgang ist analog zur Entfernung von Uracil aus der DNA. In einem anderen Beispiel wird die hoch mutagene Base O⁶-Methylguanin durch eine Methyltransferase direkt demethyliert. Der Methylrest wird dabei direkt auf die Methyltransferase übertragen und erzeugt dort einen methylierten Cysteinrest.^[19] Der Vorgang wird als suizidale Inaktivierung bezeichnet, da das gesamte Reparaturprotein durch die Methylierung zerstört wird. Methylcystein ist eine chemisch sehr stabile Einheit, die nicht einfach gespalten werden kann, um ein unmethyliertes Reparaturprotein zu produzieren. Es handelt sich also um eine energetisch kostspielige, aber effektive Form der DNA-Reparatur.

In jüngerer Zeit haben wir eine andere Art von DNA-Reparaturenzym gefunden, das Methylgruppen aus den toxischen Resten 1-Methyladenin und 3-Methylcytosin in der DNA entfernt.^[20,21] Wir brauchten viele Jahre, um dieses Enzym zu finden, weil es sehr ungewöhnliche Kofaktoren hat, nämlich Eisen und das kleine Stoffwechselprodukt α -Ketoglutarat (Abbildung 9). Es stellte sich heraus, dass diese unerwartete Demethylierungsreaktion mit der DNA unter Beteiligung dieser Kofaktoren auch für die Demethylierung von Histonen eingesetzt wird, was wichtig ist für die Regulation des Zellwachstums.^[20]

Wasser (55 M in Zellen!)

Reaktiver Sauerstoff

S-Adenosylmethionin (SAM)

Kleine reaktive Moleküle, z.B. Formaldehyd

- **Die Vielfalt von Läsionen erfordert eine Vielfalt von Reparaturenzymen**
- **Wahrscheinlich sind viele DNA-Läsionen und die zugehörigen Reparaturenzyme noch nicht entdeckt worden**

Abbildung 10. Die intrinsische Fragilität der DNA: Reagenzien, die spezifische DNA-Schäden in Zellen verursachen.

Zusammenfassend existieren einige ganz gewöhnliche Moleküle in Zellen, welche die DNA schädigen können und sich unmöglich vermeiden lassen (Abbildung 10).

Wasser ist ein schwacher Wirkstoff, kommt in Zellen aber in hohen Konzentrationen vor. Einige andere häufig vorkommende Moleküle können ebenfalls die DNA schädigen. Man kann sicher davon ausgehen, dass längst noch nicht alle DNA-schädigenden Substanzen identifiziert worden sind, was vermuten lässt, dass es noch mehr unentdeckte DNA-Reparaturenzyme gibt. Die Tatsache allerdings, dass Wasser eine schädliche Substanz für unser Gewebe ist, ist seit über 400 Jahren bekannt, denn schon William Shakespeare verwies darauf in der Kirchhofszenen in Hamlet (Abbildung 11). An

HAMLET: Wie lange liegt wohl einer in der Erde, eh er verfault?

**TOTENGRÄBER: Mein Treu ... so dauert er
Euch ein acht bis neun Jahr aus; ein
Lohgerber neun Jahre.**

HAMLET: Warum der länger als ein ander?

**TOTENGRÄBER: Ei, Herr, sein Gewerbe gerbt
ihm das Fell so, daß es eine lange Zeit das
Wasser abhält, und das Wasser richtet so
'ne Blitzleiche verteufelt zugrunde.**

Abbildung 11. Hamlet. 5. Akt, 1. Szene.

diese Szene schließt sich der berühmte Monolog über Leben und Tod an. Hamlet erweist sich als exzenter Wissenschaftler, indem er eine Abfolge logischer und tiefründiger Fragen stellt. Man beachte, dass Shakespeare die schädliche Wirkung von Wasser auf die weichen Bestandteile des menschlichen Körpers, einschließlich der DNA, ganz präzise herausarbeitet.^[22]

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, **55**, 8528–8534
Angew. Chem. **2016**, **128**, 8671–8677

- [1] „Instability and decay of the primary structure of DNA“: T. Lindahl, *Nature* **1993**, *362*, 709–715.
- [2] „The Croonian Lecture: Endogenous damage to DNA“: T. Lindahl, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B* **1996**, *351*, 1529–1538.
- [3] „Conformational differences between the biologically active and inactive forms of a transfer ribonucleic acid“: A. Adams, T. Lindahl, J. R. Fresco, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, *57*, 1684–1691.
- [4] „Irreversible heat inactivation of transfer ribonucleic acids“: T. Lindahl, *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 1970–1973.
- [5] „Two DNA ligase activities from calf thymus“: S. Söderhäll, T. Lindahl, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1973**, *53*, 910–916.
- [6] „Biochemical properties of mammalian TREX1 and its association with DNA replication and inherited inflammatory disease“: T. Lindahl, D. E. Barnes, Y. G. Yang, P. Robins, *Biochem. Soc. Trans.* **2009**, *37*, 535–538.

- [7] „Rate of depurination of native DNA“: T. Lindahl, B. Nyberg, *Biochemistry* **1972**, *11*, 3610–3618.
- [8] „Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid“: T. Lindahl, B. Nyberg, *Biochemistry* **1974**, *13*, 3405–3410.
- [9] „DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidinic sites, and base excision repair“: T. Lindahl, *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, Vol. 22 (Hrsg.: W. E. Cohn), Academic Press, New York, **1979**, S. 135–192.
- [10] „New class of enzymes acting on damaged DNA“: T. Lindahl, *Nature* **1976**, *259*, 64–66.
- [11] „Generation of single nucleotide repair patches following excision of uracil residues from DNA“: G. Dianov, A. Price, T. Lindahl, *Mol. Cell. Biol.* **1992**, *12*, 1605–1612.
- [12] „Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase β and the XRCC1 protein“: Y. Kubota, R. A. Nash, A. Klungland, P. Schär, D. E. Barnes, T. Lindahl, *EMBO J.* **1996**, *15*, 6662–6670.
- [13] „A nucleotide-flipping mechanism from the structure of human uracil-DNA glycosylase bound to DNA“: G. Slupphaug, C. D. Mol, B. Kavli, A. S. Arval, H. E. Krokan, J. A. Tainer, *Nature* **1996**, *384*, 87–92.
- [14] „Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice“: C. Rada, G. T. Williams, H. Nilsen, D. E. Barnes, T. Lindahl, M. S. Neuberger, *Curr. Biol.* **2002**, *12*, 1748–1755.
- [15] „Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase“: T. Roldan-Arjona, Y.-F. Wei, K. C. Carter, A. Klungland, C. Anselmino, R.-P. Wang, M. Augustus, T. Lindahl, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 8016–8020.
- [16] „Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine is a potentially mutagenic reaction“: B. Rydberg, T. Lindahl, *EMBO J.* **1982**, *1*, 211–216.
- [17] „Keynote: Past, present and future aspects of base excision repair“: T. Lindahl, *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **2001**, *68*, xvii–xxx.
- [18] „Properties of 3-methyladenine-DNA glycosylase from *E. coli*“: S. Riazuddin, T. Lindahl, *Biochemistry* **1978**, *17*, 2110–2118.
- [19] „Repair of alkylated DNA in *E. coli*: Methyl group transfer from 06-methylguanine to a protein cysteine residue“: M. Olsson, T. Lindahl, *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 10569–10571.
- [20] „Oxidative demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage“: S. C. Trewick, T. F. Henshaw, R. P. Hausinger, T. Lindahl, B. Sedgwick, *Nature* **2002**, *419*, 174–178.
- [21] „AlkB-mediated oxidative demethylation reverses DNA damage in *Escherichia coli*“: P. O. Falnes, R. F. Johansen, E. Seeberg, *Nature* **2002**, *419*, 178–182.
- [22] W. Shakespeare, *Hamlet*, **1601**.

Eingegangen am 2. März 2016

Online veröffentlicht am 24. Mai 2016

Übersetzt von Dr. Frank Maaß, Weinheim