

- [12] P. K. Hurlbut, J. J. Rack, S. F. Dec, O. P. Anderson, S. W. Strauss, *Inorg. Chem.* **1993**, 32, 373–374.
- [13] R. K. Sheline, J. L. Slater, *Angew. Chem.* **1975**, 87, 332–337; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, 14, 309.
- [14] O. Ayed, A. Loutellien, L. Manceron, J. P. Perchard, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 8138.
- [15] L. Andrews, T. J. Tague, Jr., G. P. Kushto, R. D. Davy, *Inorg. Chem.* **1995**, 34, 2952–2961.
- [16] J. H. B. Chenier, C. A. Hampson, J. A. Howard, B. Mile, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 730–732.
- [17] a) C. A. Arrington, J. T. Petty, S. E. Payne, W. C. K. Haskins, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6240–6241; b) M. A. Pearsall, R. West, *ibid.* **1988**, 110, 7228–7229.
- [18] M. Tacke, C. Klein, D. J. Stufkens, A. Oskam, P. Jutzi, E. A. Bonte, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1993**, 619, 865.
- [19] P. Selg, H. H. Brintzinger, R. A. Andersen, I. T. Horvath, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 877–879; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 791–793.
- [20] a) R. H. Hauge, S. E. Gransden, J. L. Margrave, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1979**, 745–748; b) I. R. Beattie, P. J. Jones, N. A. Young, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 6146–6152.
- [21] R. B. King, M. B. Bisnette, *J. Organomet. Chem.* **1967**, 8, 287–297; J. E. Bercaw, H. H. Brintzinger, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 2045–2046.
- [22] J. G. Brennan, R. A. Andersen, J. L. Robbins, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, 108, 335–336.
- [23] J. Parry, E. Carmona, S. Coles, M. Hursthouse, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 2649–2650.
- [24] J. G. Brennan, S. P. Stults, R. A. Andersen, *Organometallics* **1988**, 7, 1329–1334.
- [25] C. S. Nash, B. E. Bursten, *New J. Chem.* **1995**, 19, 669–675.

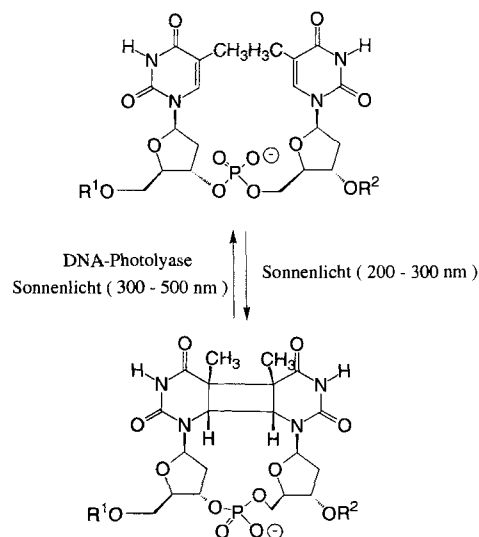
Reparatur von sonnenlichtgeschädigter DNA mit Sonnenlicht

Thomas Carell*

a Die DNA, der Träger der genetischen Information, wird ständig durch Umwelteinflüsse geschädigt, wodurch genetische Information verloren geht und ein normales, auf die Zellumgebung abgestimmtes Verhalten der Zelle bedroht wird^[1]. Zur Abwendung dieser Bedrohung haben Organismen komplizierte DNA-Reparaturmechanismen entwickelt^[2]. Seitdem man weiß, daß gerade Fehler in Reparaturprozessen an der Entstehung von Krebs direkt beteiligt sind, ist die Erforschung der molekularen Grundlagen der Reparaturprozesse von sehr großem Interesse^[3]. Momentan gehört das Thema DNA-Reparatur daher wohl zu den aktuellsten Gebieten der biochemischen und genetischen Forschung.

Kürzlich wurde von H.-W. Park, S.-T. Kim, A. Sancar und J. Deisenhofer die Kristallstrukturanalyse eines der wohl kuriosesten DNA-Reparaturenzyme, der DNA-Photolyase aus *Escherichia coli*, vorgestellt^[4]. Dies war ein lange erwarteter, wichtiger Schritt auf dem Weg zu einem besseren Verständnis eines bedeutenden Genom-Reparaturprozesses in der Natur. Photolyasen sind Enzyme, die häufige, durch Sonnenlicht (UV-Strahlung der Wellenlängen 200–300 nm) induzierte DNA-Schäden beseitigen können. Der Prozeß ist deshalb so ungewöhnlich, weil auch für die Reparatur Sonnenlicht – allerdings der Wellenlängen 300–500 nm – benötigt wird. Damit ähnelt diese Reparaturreaktion der Photosynthese, wo ebenfalls ein Prozeß durch Sonnenlicht angetrieben wird^[6]. Photolyasen wurden in unterschiedlichen Organismen, wie Archaeobakterien, Amphibien, Goldfischen, Klapperschlangen und Beuteltieren, nachgewiesen. In anderen Spezies, z. B. im Mensch^[7], fehlen sie vermutlich vollständig. In vielen Organismen ist die Photolyase-Reparaturreaktion (Photoreaktivierung) der einzige Prozeß, durch den sonnenlichtinduzierte Defekte repariert werden können.

DNA-Veränderungen, die durch UV-Bestrahlung von Zellen hervorgerufen werden, sind intensiv untersucht worden und heute gut verstanden^[5]. Durch die Bestrahlung von doppelsträngiger DNA mit UV-Licht wird in zwei übereinander angeordneten Pyrimidinbasen eine photochemisch erlaubte $[2\pi_s + 2\pi_s]$ -Cycloaddition der C5-C6-Doppelbindungen ausgelöst und es entstehen *cis-syn*-Cyclobutan-Pyrimidindimere (Schema 1). Das Hauptphotoprodukt ist das *cis-syn*-Thymin-Photodimer. Alle Photoprodukte führen zu einer Verzerrung der normalen B-DNA-Struktur^[8]. Sie verhindern darüber hinaus die Replikation sowie die Transkription und verursachen so den Zelltod. Daß die Photoprodukte auch direkt an der Krebsentstehung beteiligt sind, zeigt die große Häufigkeit von Hautkrebs bei Patienten, die an *Xeroderma pigmentosum* erkrankt sind^[9] – einer Krankheit, die die Fähigkeit des Organismus, UV-Strahlenschäden beheben zu können, herabsetzt.

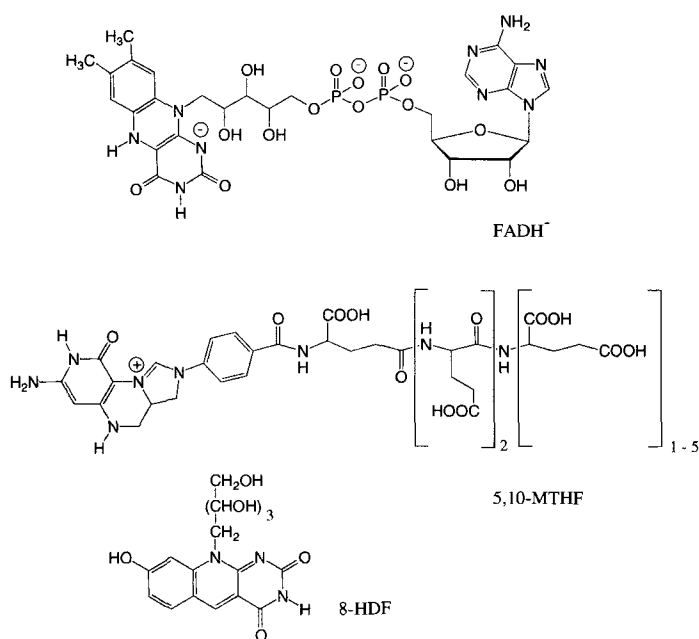


Schema 1. Bildung der *cis-syn*-Cyclobutan-Thymindimere durch UV-Bestrahlung (200–300 nm) eines TpT-DNA-Segmentes. R¹ = 5'-Terminus, R² = 3'-Terminus.

[*] Dr. T. Carell
Laboratorium für Organische Chemie
Eidgenössische Technische Hochschule Zürich
Universitätsstrasse 16, CH-8057 (Schweiz)
Telefax: Int. +1/632-1109

Gesunde Zellen haben ausgeklügelte Mechanismen zur Reparatur der durch Bildung der Pyrimidindimere geschädigten DNA entwickelt. Hierzu gehört die komplizierte Nucleotid-Exzisionsreparatur, bei der die geschädigten Basen durch viele Enzyme und Faktoren aus der DNA herausgeschnitten und durch neue ersetzt werden, sowie die Photoreaktivierung, bei der nur ein Enzym, die DNA-Photolyase, aktiv ist^[3, 10, 11]. Die Untersuchung der Photolyase-Reaktion beinhaltet bis heute das intensive Studium der Enzyme, der Cofaktoren und einiger weniger synthetisierter Modellverbindungen, mit denen Teilschritte der Reparaturreaktion nachgestellt werden konnten. Dazu wurden unterschiedliche Methoden verwendet, vor allem die zeit-aufgelöste Absorptions- und Fluoreszenzspektroskopie^[12, 13]. Wichtige Meilensteine auf dem Weg zum Verständnis der Reparaturreaktion waren die Sequenzanalysen von einigen Photolyasen und die Überexpression sowie Mutationsstudien^[5].

Nach den Ergebnissen dieser Untersuchungen sind Photolyasen monomere Enzyme mit einem Molekulargewicht von 55 000–60 000 Da. Sie enthalten zwei nicht kovalent gebundene Chromophore als Cofaktoren (Schema 2). Ein Flavin-Adenin-Dinucleotid ist in der ungewöhnlichen Form FADH^- sehr fest



Schema 2. Strukturen der Cofaktoren in Photolyasen. Enzyme vom Folat-Typ enthalten ein FADH^- - und ein 5,10-MTHF-Molekül, solche vom Desazaflavin-Typ ein FADH^- - und ein 8-HDF-Molekül.

im aktiven Protein komplexiert ($K_d < 10^{-11} \text{ M}$)^[5]. Als zweiten Chromophor enthalten Photolyasen entweder ein 8-Hydroxy-5-desazaflavin (8-HDF) oder ein 5,10-Methenyltetrahydrofolylpolyglutamat (5,10-MTHF). Dementsprechend werden die Photolyasen in zwei Klassen unterteilt, in die Desazaflavine, zu der das Enzym aus dem *Methanobacterium thermoautotrophicum* gehört, und in die Folate, zu der die Photolyase aus *Escherichia coli* zählt.

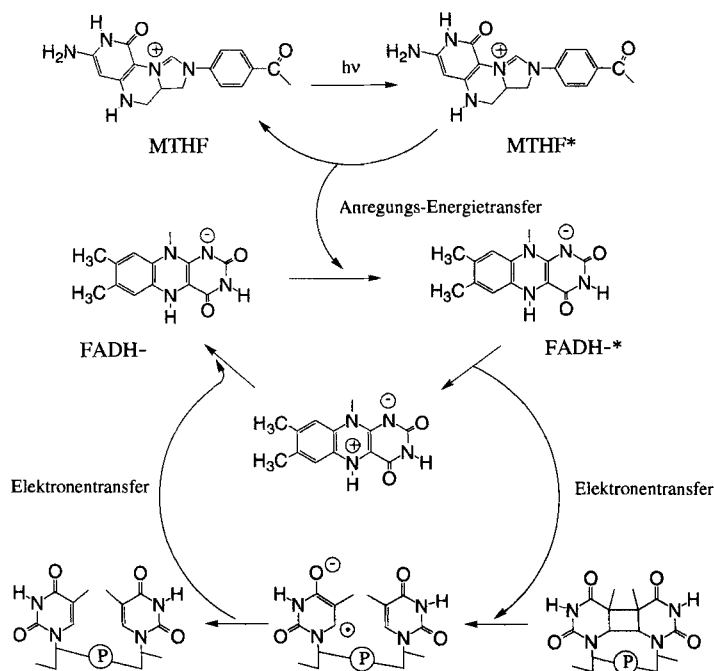
Die vor kurzem beschriebene, erste Kristallstrukturanalyse einer DNA-Photolyase enthüllt einige sehr interessante Merkmale dieses Enzyms^[4]. So ist das FADH^- -Molekül in einer sehr

unüblichen, U-förmigen Konformation im Enzym gebunden. Dabei kommen sich der Flavin- und der Adeninrest in einer Tasche des Proteins sehr nahe. Beide Ringsysteme sind teilweise dabei für das Lösungsmittel zugänglich. Die sehr feste Bindung des FADH^- -Moleküls resultiert aus einem Netz aus Wasserstoffbrückenbindungen und acht ionischen Wechselwirkungen mit den Phosphatresten. Die Tatsache, daß die Aminosäuren, die an der Bindung des FADH^- -Moleküls beteiligt sind, in acht der zehn bekannten Photolyasen konserviert sind, unterstreicht die Bedeutung der FADH^- -Bindungssituation für die Funktion der Photolyase. Der zweite Chromophor wird vom Enzym in einer flachen Tasche an der Peripherie des Proteins sehr viel schwächer gebunden. Ein großer Teil dieses zweiten Cofaktors geht daher während der Reinigung der Photolyase verloren. In *Escherichia coli* ist das 5,10-MTHF-Molekül ca. 16,8 Å vom Flavin-Molekül entfernt.

Die Peptidkette der *Escherichia coli*-Photolyase ist zu 5 β -Faltblättern, 20 α -Helices, 5 3_{10} -Helices und verbindenden Segmenten gefaltet^[4]. Durch Sequenzvergleich wurde lediglich eine Homologie zu einem blauen Photorezeptorprotein festgestellt, das zu einer Klasse von Rezeptoren gehört, die erst seit kurzem intensiv untersucht wird^[14]. Weitere Sequenzhomologien wurden nicht festgestellt. Ein Charakteristikum aller Photolyasen ist deren *nichtsequenzspezifische* Wechselwirkung mit DNA. Im Unterschied zu den Proteinen, die an der Genregulation beteiligt sind und die eine ausgeprägte Sequenzspezifität aufweisen, bindet die Photolyase die DNA *strukturspezifisch*: Sie erkennt Defektstellen. Erstaunlich ist hierbei, daß Photolyasen zu diesen Defekten sowohl in Einzelstrang-DNA als auch in Doppelstrang-DNA ähnlich hohe Affinitäten aufweisen ($K_d = 10^{-8}$ bzw. 10^{-9} M)^[5]. Basierend auf der nun vorliegenden Kristallstrukturanalyse einer DNA-Photolyase kann für diese Besonderheit nun eine plausible Erklärung postuliert werden. Durch die Faltung der Peptidkette entsteht eine Cavität, die wegen ihrer Größe, Struktur und Ladungsverteilung geeignet ist, ein Thymin-Photodimer aufzunehmen. Es wird deshalb vermutet, daß nach der Bindung der Photolyase an den geschädigten DNA-Strang das Thymin-dimer aus der Doppelhelix herausgedreht wird und dadurch in der Cavität der Photolyase zu liegen kommt, so daß sich das Dimer im van-der-Waals-Abstand zum Flavin befindet. Dieser „Flipping-out“-Mechanismus wird durch die Beobachtung gestützt, daß die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Photodimeren und den gegenüberliegenden Adeninresten im Vergleich zu denen in nicht-geschädigter DNA schwächer sind. Dies erleichtert vermutlich den Flipping-out-Prozeß. Daß ein solcher Prozeß tatsächlich zur Erkennung von Defektstellen in der Doppelhelix dienen könnte, wird durch Kristallstrukturanalysen von vier weiteren Proteinen erhärtet. Die ebenfalls an der DNA-Reparatur beteiligten Proteine Exonuclease III^[15] und zwei Uracil-DNA-Glycosylasen^[16, 17] weisen Cavitäten auf, in denen die schadhaften DNA-Stellen in der Flipped-out-Konformation Platz finden könnten. Im Fall der Uracil-DNA-Glycosylase des *Herpes-simplex*-Virus wird der Flipping-out-Mechanismus durch eine Co-kristallstrukturanalyse mit Uracil bestätigt, wonach das Uracil in der Cavität gebunden vorliegt^[16]. Kürzlich wurde auch die Kristallstrukturanalyse der HhaI-Methyltransferase, eines nicht an der DNA-Reparatur beteiligten Enzyms, vorgestellt. Hierbei wurde ein modifiziertes Substrat verwendet, um ein Reaktions-

zwischenprodukt abzufangen, das kovalent an das Enzym gebunden ist. Überraschenderweise wurde das Substrat aus der DNA-Doppelhelix heraus- und in Richtung des aktiven Zentrums des Enzyms gedreht^[18]. Diese Befunde deuten darauf hin, daß geschädigte Stellen in einem DNA-Doppelstrang von unterschiedlichen Reparaturenzymen und -faktoren in einer Flipped-out-Konformation erkannt werden könnten.

In Schema 3 ist der zur Reparatur von Pyrimidindimeren vorgeschlagene DNA-Photolyase-Reparaturmechanismus schematisch dargestellt. Während der Bestrahlung des Photolyase-DNA-Komplexes mit Tageslicht wird ein Lichtquant entweder



Schema 3. Schematische Darstellung des vorgeschlagenen DNA-Reparatur-Mechanismus für die *Escherichia-coli*-Photolyase^[5,12].

direkt vom Flavin oder vom zweiten Chromophor – was wegen der höheren molaren Extinktionen der Chromophore vom Folat- oder Desazaflavin-Typ wahrscheinlicher ist – absorbiert. Die Anregungsenergie wird dann auf das Flavin übertragen, das im angeregten Zustand ein Elektron auf das Thymindimer überträgt. Hückel-Molekülorbital-Rechnungen haben ergeben, daß die Aktivierungsbarriere für den thermischen, konzertierten Zerfall der Cyclobutansubstruktur als Radikalanion stark herabgesetzt ist. So führt die Elektronenübertragung zur Spaltung der C5-C5'- und C6-C6'- σ -Bindungen des Dimers und zur Rückbildung der beiden Thyminreste^[19]. Tatsächlich ergaben neuere Untersuchungen, daß das Dimer konzertiert zerfällt^[20]. Das Elektron wird nach der Spaltung der C-C-Bindungen zurück auf das Flavin übertragen, und der DNA-Enzym-Komplex dissoziiert, vermutlich wegen des höheren Raumbedarfs der zwei Thyminreste im aktiven Zentrum.

Zeitaufgelöste spektroskopische Messungen mit der *Escherichia-coli*-Photolyase ergaben Geschwindigkeitskonstanten für den Energietransfer vom 5,10-MTHF zum Flavin von $k = 4.6 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ und eine Übertragungseffizienz von 62%^[5,13]. Der Energietransfer findet nach einem strahlungslosen Mechanismus statt, der durch die Förster-Theorie beschrieben werden kann^[21]. In den Desazaflavin-enthaltenden Photolyasen ist der

Energietransfer wesentlich schneller ($k = 1.9 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}$) und auch effizienter (100%). Für den Elektronentransfer betragen die Geschwindigkeitskonstanten $k = 5.5 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$, und die Effizienz des Elektronentransfers ist für die Enzyme beider Klassen ähnlich groß (90%).

Zwei weitere Reste der Photolyase sind direkt am Reparaturprozeß beteiligt: Trp 277 ist ein wesentlicher Rest, um die Reparaturaktivität einer artifiziell modifizierten Photolyase mit inaktivem Flavinrest bei 280 nm zu gewährleisten^[22]. Modellstudien ergaben, daß Indole bei dieser Wellenlänge tatsächlich Pyrimidindimere sowohl in Lösung als auch kovalent an das Pyrimidindimer gebunden spalten können^[23]. Die Kristallstrukturanalyse bietet auch für diesen Befund eine Erklärung: Trp 277 ist in der Bindungsstelle für das Thymindimer lokalisiert und befindet sich im van-der-Waals-Abstand zum Thymindimer, wenn dieses in der Flipped-out-Konformation in der Cavität gebunden wird. Die Funktion von Trp 306, das für die Photoreduktion von FADH essentiell ist (ein Prozeß, durch den das Flavin in das aktive, reduzierte FADH⁻ überführt wird), ist allerdings noch nicht geklärt. Es wird angenommen, daß der Reduktion des Flavins ein Elektronentransfer vom Trp 306 zum angeregten Flavin zugrundeliegt. Eine solche Elektronenübertragung zwischen den Chromophoren ist jedoch unwahrscheinlich, da sich der Trp-306-Rest an der Proteinoberfläche in einer Entfernung von ca. 13 Å vom Flavin befindet. Weitere Studien sind notwendig, um die Rolle des Trp-306-Restes während der Reparaturreaktion zu beleuchten.

Auf der Grundlage der Kristallstruktur der *Escherichia-coli*-Photolyase können wir heute den sehr ungewöhnlichen natürlichen Prozeß, bei dem Sonnenlicht für eine effiziente DNA-Reparatur genutzt wird, sehr viel besser verstehen^[4]. Die Einzelschritte der Reparatur sind die spezifische Erkennung von DNA-Defektstellen – möglicherweise durch ein Herausdrehen der geschädigten Basen – und die nachfolgende Spaltung des Cyclobutanringes des Photodimers durch Energie- und Elektronentransferschritte. Die Reparaturreaktion weist demnach nur zur Photosynthese Ähnlichkeiten auf, wo lichtabsorbierende Chromophore in der Nähe eines aktiven Zentrums die Anregungsenergie auf ein Paar von Chromophoren, das „Spezielle Paar“, übertragen. Dieses überträgt dann als ersten Schritt in einer Elektronentransferkaskade ein Elektron auf einen Akzeptor^[6]. Es ist sehr erstaunlich, daß eine ganz ähnliche Reaktionssequenz in der Photoreaktivierung zur Reparatur des Genoms verwendet wird ein Problem, das vermutlich so alt wie das Leben ist. Das überraschende Ergebnis, daß die Peptidsequenzen von bakteriellen Photolyasen und blauen Photorezeptoren, die für die frühe Entwicklung von Pflanzen wesentlich sind, eine hohe Sequenzhomologie aufweisen, löste weitreichende Spekulationen aus. Möglicherweise sind Energie- und Elektronentransferschritte nicht nur an der Umwandlung von Sonnenlicht in chemische Energie (Photosynthese) und an dem Schutz vor dem zerstörerischen Einfluß von energiereicher UV-Strahlung auf DNA (Photoreaktivierung), sondern auch an der Induktion eines frühen Entwicklungssignals in grünen Pflanzen (Photorezeptoren) durch einen bislang unbekannten Mechanismus beteiligt^[4,14].

Stichworte: DNA-Reparatur · Elektronentransfer · Energietransfer · Photolyasen

- [1] T. Lindahl, *Nature* **1993**, 362, 709–715.
- [2] E. C. Friedman, G. C. Walker, W. Siede in *DNA-Repair and Mutagenesis*, ASM Press, Washington, DC, **1995**.
- [3] P. Modrich, *Science* **1994**, 266, 1959–1960; A. Sancar, *ibid.* **1994**, 266, 1954–1956; *J. Biol. Chem.* **1995**, 27, 15915–15918.
- [4] H. W. Park, S.-T. Kim, A. Sancar, J. Deisenhofer, *Science* **1995**, 268, 1866–1872.
- [5] Übersichtsartikel: S.-T. Kim, A. Sancar, *Photochem. Photobiol.* **1993**, 57, 895–904.
- [6] Übersichtsartikel: H. Kurreck, M. Huber, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 929–947; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 849–866.
- [7] T. Kato, Jr., T. Todo, H. Ayaki, K. Ishizaki, T. Morita, S. Mitra, M. Ikenaga, *Nucleic Acids Res.* **1994**, 22, 4119–4124.
- [8] F. N. Hayes, D. L. Williams, R. L. Ratliff, A. J. Varghese, C. S. Rupert, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 4940–4942; J. Kemmink, R. Boelens, T. Koning, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, R. Kaptein, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 4645–4653; J.-S. Taylor, D. S. Garrett, I. R. Brockie, D. L. Svoboda, J. Telser, *Biochemistry* **1990**, 29, 8858–8866.
- [9] L. Daya-Grosjean, N. Dumaz, A. Sarasin, *J. Photochem. Photobiol. B.* **1995**, 28, 115–124.
- [10] A. Sancar, *Biochemistry* **1994**, 33, 2–9.
- [11] C. S. Rupert, S. H. Goodgal, R. M. Herriott, *J. Gen. Physiol.* **1958**, 41, 451.
- [12] Übersichtsartikel: P. F. Heelis, S.-T. Kim, T. Okamura, A. Sancar, *J. Photochem. Photobiol. B.* **1993**, 17, 219–228.
- [13] S. T. Kim, P. F. Heelis, T. Okamura, Y. Hirata, N. Mataga, A. Sancar, *Biochemistry* **1991**, 30, 11262–11270; S.-T. Kim, P. F. Heelis, A. Sancar, *ibid.* **1992**, 31, 11244–11248.
- [14] M. Ahmad, A. R. Cashmore, *Nature* **1993**, 366, 162–166; K. Malhotra, S.-T. Kim, A. Batschauer, L. Dawut, A. Sancar, *Biochemistry* **1995**, 34, 6892–6899.
- [15] C. D. Mol, C.-F. Kuo, M. M. Thayer, R. P. Cunningham, F. A. Tainer, *Nature* **1995**, 374, 381–386.
- [16] R. Savva, K. McAuley-Hecht, T. Brown, L. Pearl, *Nature* **1995**, 373, 487–493.
- [17] C. D. Mol, A. S. Arvai, G. Slupphaug, B. Kavli, I. Alseth, H. E. Krokan, J. A. Tainer, *Cell*, **1995**, 80, 869–878.
- [18] S. Klimasauskas, S. Kumar, R. J. Roberts, X. Cheng, *Cell* **1994**, 76, 357–369; R. J. Roberts, *Angew. Chem.* **1994**, 106, 1285–1292; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 1222–1228.
- [19] R. F. Hartman, J. R. VanCamp, S. D. Rose, *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 2684–2689.
- [20] R. Austin, S. McMorgie, T. P. Begley, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1886–1887; J. R. Jacobsen, A. G. Cochran, J. C. Stephans, D. S. King, P. G. Schultz, *ibid.* **1995**, 117, 5453–5461.
- [21] T. Förster, *Discuss. Faraday Soc.* **1959**, 27, 7–17.
- [22] D. A. Pearlman, S. R. Holbrook, D. H. Pirkle, S.-H. Kim, *Science* **1985**, 227, 1304–1308.
- [23] S. T. Kim, R. F. Hartman, S. D. Rose, *Photochem. Photobiol.* **1990**, 52, 789–794; M. S. Goodman, S. D. Rose, *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 3268–3270.