

Untersuchungsobjekte für die Aufdeckung bisher unerkannter Zusammenhänge zwischen Struktur und Eigenschaften von Nucleinsäuren eignen.<sup>[5]</sup>

Eingegangen am 5. Oktober 1998 [Z12484]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 680–683

**Stichwörter:** DNA-Strukturen • Duplexstabilität • homo-DNA • Oligonucleotide • Pyranosyl-RNA

- [1] a) S. Pitsch, S. Wendeborn, B. Jaun, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 2161–2183; b) S. Pitsch, R. Krishnamurthy, M. Bolli, S. Wendeborn, A. Holzner, M. Minton, C. Lesueur, I. Schlönvogt, B. Jaun, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1995**, 78, 1621–1635; c) I. Schlönvogt, S. Pitsch, C. Lesueur, A. Eschenmoser, B. Jaun, R. M. Wolf, *Helv. Chim. Acta* **1996**, 79, 2316–2345; d) R. Micura, M. Bolli, N. Windhab, A. Eschenmoser, *Angew. Chem.* **1997**, 109, 899–902; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 870–873; e) M. Bolli, R. Micura, A. Eschenmoser, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 309–320; f) M. Bolli, R. Micura, S. Pitsch, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 1901–1951.
- [2] a) A. Eschenmoser, M. Dobler, *Helv. Chim. Acta* **1992**, 75, 218–259; b) M. Böhringer, H.-J. Roth, J. Hunziker, M. Göbel, R. Krishnan, A. Giger, B. Schweizer, J. Schreiber, C. Leumann, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1992**, 75, 1416–1477; c) J. Hunziker, H.-J. Roth, M. Böhringer, A. Giger, U. Diederichsen, M. Göbel, R. Krishnan, B. Jaun, C. Leumann, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 259–352; d) G. Otting, M. Billeter, K. Wüthrich, H.-J. Roth, C. Leumann, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1993**, 76, 2701–2756; e) K. Groebke, J. Hunziker, W. Fraser, L. Peng, U. Diederichsen, K. Zimmermann, A. Holzner, C. Leumann, A. Eschenmoser, *Helv. Chim. Acta* **1998**, 81, 375–474.
- [3] Die Verschiebung des Paarungsrahmens in (PU-py)<sub>n</sub>-Duplexen würde zur gleichen Zahl an Purin-Purin-Interstrang-Stapelungen führen wie in den entsprechenden (py-PU)<sub>n</sub>-Duplexen. Dies ist vermutlich der Grund für die vernachlässigbar kleine Stabilitätsdifferenz zwischen den Duplexen der Motivpaare Nr. 7 und 8.<sup>[1]</sup> Dafür sprechen die T<sub>m</sub>-Werte der Duplexe Nr. 9 und 10. Da die bei letzteren obligate Verschiebung des Paarungsrahmens strangaufwärts (bei der p-RNA) oder strangabwärts (bei der homo-DNA) erfolgen kann, ist in beiden Serien der Duplex Nr. 9 mit vier statt drei Adenin-Adenin-Stapelungen der stabilere (siehe Abbildung 2).
- [4] Für die Beurteilung der Sequenzabhängigkeit von Duplexen der DNA- und RNA-Serien werden empirische Basenpaar-Nachbarschaftsparameter verwendet, die nicht explizit zwischen Intra- und Interstrang-Basenstapelung differenzieren; siehe: N. Sugimoto, S. Nakano, M. Yoneyama, K. Honda, *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24, 4501–4505; J. SantaLucia, Jr., H. T. Allawi, P. A. Senviratne, *Biochemistry* **1996**, 35, 3555–3562, zit. Lit. Zur Regioselektivität des Einflusses von überhängenden Basen in der DNA- und der RNA-Serie siehe z.B.: N. Sugimoto, R. Kierzek, D. H. Turner, *Biochemistry* **1987**, 26, 4554–4558; M. Senior, R. A. Jones, K. J. Breslauer, *Biochemistry* **1988**, 27, 3879–3885.
- [5] Bei Oligonucleotiden ohne oder mit geringer Rückgratneigung ist die Stapelung der Nucleobasen im wesentlichen reine Intrastrang-Stapelung; dies trifft z.B. für DNA-Duplexe des B-Typs (nicht aber des A-Typs) zu. Die Rückgratneigung einer Duplexstruktur ist bei starker Helicalisierung keineswegs augenfällig. Deshalb ist es verständlich, daß dieser Parameter bisher nicht zu den zur Beschreibung von DNA- und RNA-Strukturen verwendeten Strukturparametern gehört (siehe R. E. Dickerson, *Nucleic Acids Res.* **1989**, 17, 1797–1803). Dennoch dürfte die Rückgratneigung auch bei natürlichen Systemen als Parameter der strukturellen Beschreibung stapelungsabhängiger biologischer Prozesse (Replikation, Transkription, Codon/Anticodon-Erkennung) von Belang sein. Wir glauben dies unter anderem deshalb, weil lokale Änderungen in der Rückgratneigung durch entsprechende lokale Änderungen nucleotidischer Torsionswinkel bewirkt werden können und weil z.B. bei lokalen Strang-Dissoziationsprozessen Intrastrang-, nicht jedoch Interstrang-Basenstapelung

erhalten bleiben kann. Inwieweit ein solcher Unterschied für lokale Fluktuationen der Paarungsstärke innerhalb von Duplexen verantwortlich sein könnte, ist eine interessante Frage im Hinblick auf die erwähnten biologischen Prozesse. Zur Definition der Rückgratneigung helicaler Duplexe und zur Diskussion über die Anwendung dieses Parameters zur Differenzierung von DNA- und RNA-Duplexstrukturen wird gemeinsam mit M. Egli (Northwestern University, Evanston, IL) eine Arbeit veröffentlicht werden.

- [6] Zur CD-Spektroskopie von Oligonucleotiden der natürlichen Serie siehe: W. C. Johnson, Jr. in *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules* (Hrsg.: G. D. Fasman), Plenum Press, New York, **1996**, S. 433–468.
- [7] Siehe z.B.: I. Jodál, A. Kovács, J. Ott, G. Snatzke, *Chem. Ber.* **1989**, 122, 1207–1210.
- [8] NMR-spektroskopisch konnten diese Parameter bei den quasi-linearen Duplexen der p-RNA- und homo-DNA-Serie nicht bestimmt werden, vgl. Lit. [1c, 2d].
- [9] L. Marky, K. J. Breslauer, *Biopolymers* **1987**, 26, 1601–1620.
- [10] Die Daten für die homo-DNA-Duplexe Nr. 7, 9 und 10 sind von S. Guntha (ETH) bestimmt worden.

## „Base Flipping“: UV-Licht-geschädigte DNA-RNA-Duplexe sind schlechte Substrate für photoreaktivierende DNA-Reparaturenzyme\*\*

Jens Butenandt, Lars T. Burgdorf und Thomas Carell\*

*cis-syn*-Cyclobutanpyrimidin-Dimere (Photodimere) sind die dominierenden DNA-Schäden, die bei der Bestrahlung von Zellen mit UV-Licht entstehen.<sup>[1]</sup> Sie bewirken den Zelltod und sind an der Entwicklung verschiedener Hautkrebs-Arten beteiligt. Daher sind sie eine ernste Bedrohung für jeden Organismus, der dem Sonnenlicht ausgesetzt ist.<sup>[2]</sup> Alle Organismen haben DNA-Reparaturmechanismen entwickelt,<sup>[1–3]</sup> um die durch UV-Licht verursachten Veränderungen aus dem Genom zu entfernen und eine Schädigung der DNA zu überwinden. Gewisse Stellen des Genoms werden mit deutlich geringerer Effizienz repariert, was sie zu kritischen Mutationszonen („hot spots“) macht.<sup>[3a, 4]</sup> Dies hat die Untersuchung von Faktoren, die die Effizienz der Schadenserkenkung bestimmen, zu einer der zentralen Fragestellungen in der Erforschung der DNA-Reparatur werden lassen. Nach der derzeitigen Auffassung erkennen schadensspezifische Reparaturenzyme im normalen DNA-Duplex strukturelle Veränderungen, die vermutlich durch geschwächte

[\*] Dr. T. Carell, Dipl.-Chem. J. Butenandt, Dipl.-Chem. L. T. Burgdorf  
Laboratorium für Organische Chemie, ETH-Zentrum  
Universitätsstrasse 16, CH-8092 Zürich (Schweiz)  
Fax: (+41)1-632-1109  
E-mail: tcarell@org.chem.ethz.ch

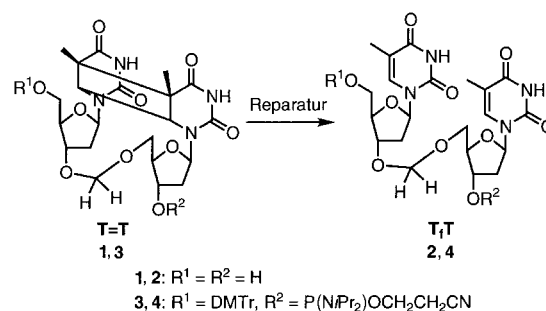
[\*\*] Diese Arbeit wurde vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung und vom Boehringer-Ingelheim-Fonds (Stipendium für J.B.) unterstützt. Wir danken Prof. F. Diederich für seine großzügige Unterstützung, Dr. S. Pitsch für viele hilfreiche Diskussionen, Dr. L. Cox für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts und Dr. A. P. M. Eker für die Bereitstellung von Photolyase aus *A. nidulans*. Die rohen RNA-Stränge wurden freundlicherweise von Xeragon, Zürich, zur Verfügung gestellt.

H-Brücken und geschwächte  $\pi$ -Stapel-Wechselwirkungen in der Umgebung der DNA-Schädigung verursacht worden sind. Kristallographischen Daten zufolge drehen viele Reparaturenzyme die geschädigte Base aus dem DNA-Duplex zur Reparatur heraus.<sup>[5]</sup> Dieser Vorgang könnte durch die DNA-Packung,<sup>[6]</sup> durch die lokale DNA-Sequenz und durch die DNA-Konformation beeinflusst werden.<sup>[7]</sup> Einen ersten Hinweis darauf liefert die Entdeckung, daß dsDNA-spezifische Reparaturenzyme Schädigungen aus DNA-RNA-Hybriden,<sup>[8]</sup> die in der untypischen A-Konformation vorliegen, mit geringerer Effizienz entfernen.<sup>[9]</sup>

Wird also der Reparaturvorgang durch die Duplexkonformation beeinflusst, und wenn ja, in welchem Ausmaß? Um dies zu klären, haben wir sequenzspezifisch Schädigungen in DNA eingebaut und untersucht, wie stark Doppelstränge in A- und B-Konformationen durch die Photoschäden destabilisiert werden.

Die Reparaturreaktion ist in Schema 1 gezeigt und wurde mit einer DNA-Photolyase untersucht. Von diesem Enzym wird angenommen, daß es die *cis-syn*-Photoschäden in einer extrahelicalen, herausgeklappten Konformation erkennt.<sup>[5d]</sup> Gemäß den thermodynamischen Daten destabilisieren Photodimere den B-Duplex signifikant und verringern die Stabilität des A-Duplex nur wenig. Die geringere Destabilisierung korreliert mit einer weniger effizienten Reparatur. Daher könnte die lokale DNA-Konformation das Herausklappen der DNA-Schädigung modulieren.

Alle Studien wurden mit dem kürzlich eingeführten Formacetal-verbrückten *cis-syn*-Photodimer-Analogon **1** (Schema 1) durchgeführt. Es ist leicht in Gramm-Mengen erhältlich,<sup>[11]</sup> so daß Oligonucleotide mit einem sequenzspezifisch eingebauten Photodimer für diese Untersuchung in



Schema 1. Die Ausgangsverbindungen **1** und **2** der Phosphoramidit-Bausteine **3** bzw. **4**, die für die Synthese der Schädigungen enthaltenden DNA-Einzel- sowie DNA-DNA- und DNA-RNA-Doppelstränge verwendet wurden. Die Reparatur unter Spaltung des Cyclobutanrings wird durch Photolyase-DNA-Reparatur-Enzyme katalysiert.

ausreichenden Mengen zugänglich waren. **1** erwies sich als gutes Substrat für DNA-Photolyasen, da diese während der Reparatur den zentralen Phosphordiester innerhalb des Dimers ignorieren.<sup>[12]</sup> **1** und die Referenzverbindung **2** wurden in die Phosphoramidite **3** bzw. **4** überführt und diese nach bekannten Verfahren<sup>[11]</sup> in die GC-reichen 12mer- und AT-reichen 14mer-Oligonucleotide **5–8** (Tabelle 1) eingebaut. Die Oligonucleotide wurden mit 1.0 Äquiv. (1.3 Äquiv. für enzymatische Studien) der komplementären DNA- oder RNA-Stränge zu den DNA-DNA-Duplexen **9–12** (B-Konformation) bzw. den DNA-RNA-Duplexen **13–16** (A-Konformation) anelliert.<sup>[8]</sup> Die Duplexe **9, 11, 13** und **15** wurden zu Vergleichszwecken hergestellt.

Zur Untersuchung der Konformationen in Lösung wurden mit allen Duplexen Circular dichroismus (CD)-Studien durchgeführt.<sup>[13]</sup> Die CD-Spektren wurden bei 25 °C ( $c_{\text{oligo}} = 5 \mu\text{M}$ ) aufgenommen (Abbildung 1; Mittelwert aus fünf unabhängigen

Tabelle 1. Schmelzpunkte  $T_m$  [°C], Gibbs-Enthalpien  $\Delta G_{15^\circ\text{C}}^\circ$ <sup>[18]</sup> Enthalpien  $\Delta H^\circ$  und Entropien  $\Delta S^\circ$  für DNA-DNA- und DNA-RNA-Duplex-Bildung, erhalten aus van't-Hoff-Auftragungen.

	Sequenz	$T_m$ [°C] <sup>[a]</sup>	$\Delta G_{15^\circ\text{C}}^\circ$ [kJ mol <sup>-1</sup> ] <sup>[b]</sup>	$\Delta H^\circ$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta S^\circ$ [kJ K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> ]
<b>5</b>	5'd(CGACGT <sub>T</sub> TGCAGC)3'	–	–	–	–
<b>6</b>	5'd(CGTATT <sub>T</sub> TATTCTGC)3'	–	–	–	–
<b>7</b>	5'd(CGACGT = TGCAGC)3'	–	–	–	–
<b>8</b>	5'd(CGTATT = TATTCTGC)3'	–	–	–	–
DNA-Duplexe vom B-Typ:					
<b>9</b>	5'd(CGACGT <sub>T</sub> TGCAGC)3'	58.2	– 81	– 367	– 0.99
	3'd(GCTGCA ACGTCG)5'				
<b>10</b>	5'd(CGACGT = TGCAGC)3'	51.0	– 69	– 321	– 0.88
	3'd(GCTGCA ACGTCG)5'				
<b>11</b>	5'd(CGTATT <sub>T</sub> TATTCTGC)3'	46.8	– 78	– 458	– 1.32
	3'd(GCATAA ATAAGACG)5'				
<b>12</b>	5'd(CGTATT = TATTCTGC)3'	41.2	– 68	– 417	– 1.21
	3'd(GCATAA ATAAGACG)5'				
DNA-Duplexe vom A-Typ:					
<b>13</b>	5'd(CGACGT <sub>T</sub> TGCAGC)3'	54.9	– 78	– 371	– 1.02
	3'r(GCTGCA ACGTCG)5'				
<b>14</b>	5'd(CGACGT = TGCAGC)3'	51.5	– 72	– 344	– 0.95
	3'r(GCTGCA ACGTCG)5'				
<b>15</b>	5'd(CGTATT <sub>T</sub> TATTCTGC)3'	46.3	– 75	– 427	– 1.22
	3'r(GCATAA ATAAGACG)5'				
<b>16</b>	5'd(CGTATT = TATTCTGC)3'	45.6	– 73	– 412	– 1.18
	3'r(GCATAA ATAAGACG)5'				

[a] Bedingungen: 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl,<sup>[18]</sup> pH 7.4,  $c_{\text{oligo}} = 4.0 \mu\text{M}$ . Fehler in  $T_m$ :  $\pm 0.3^\circ\text{C}$ . [b] Erhalten durch Auftragen von  $1/T_m$  gegen  $\ln c_T$ . Daten von mindestens fünf Konzentrationen und zwei bis drei unabhängigen Messungen wurden verwendet; abgeschätzter Fehler bei  $\pm 5\%$ .

gen Messungen). Die CD-Spektren des Referenz-DNA-DNA-Duplexes **9** und des DNA-DNA-Duplexes **10**, der das Photodimer enthält, sind sehr ähnlich und weisen alle Charakteristika einer Doppelhelix in B-Form auf. Der Einbau

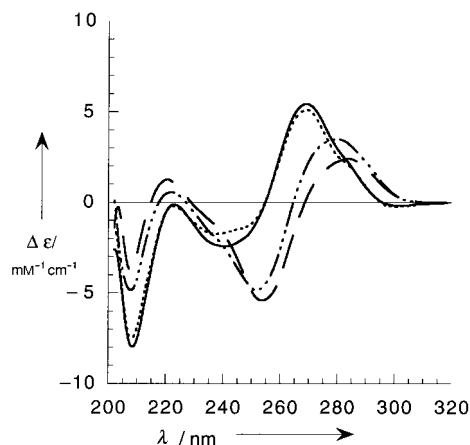


Abbildung 1. CD-Spektren der Oligonucleotide bei 25 °C in 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan),<sup>[18]</sup> pH 7.4,  $c_{\text{oligo}} = 5 \mu\text{M}$ . --- **9**, -...- **10**, .... **13**, — **14**. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Oligomere **11**, **12** und **15**, **16** erhalten.

des Photodimer-Analogons **1** beeinflusst folglich die übergreifende B-Struktur nicht. Die CD-Spektren der DNA-RNA-Duplexe **13** und **14** deuten auf eine A-Form der Duplexstruktur hin.<sup>[8, 13]</sup> Die CD-Spektren von **13** und **14** sind wiederum weitestgehend identisch, was bedeutet, daß die Photoschädigung auch die A-Konformation nicht beeinflusst.

Um den destabilisierenden Effekt des Photodimers in einer A- und B-Duplex-Konformation zu quantifizieren, wurden Schmelzpunktstudien durchgeführt (Tabelle 1). Die thermodynamischen Parameter (15 °C) wurden aus den van't-Hoff-Auftragungen bestimmt. Es sind Mittelwerte aus Messungen bei jeweils fünf verschiedenen Konzentrationen (0.5–8.0  $\mu\text{M}$ ).<sup>[14]</sup> Unter den beschriebenen Bedingungen haben die zwei Referenz-DNA-DNA-Duplexe **9** und **11** einen Schmelzpunkt  $T_m$  (4  $\mu\text{M}$ ) von 58.2 bzw. 46.8 °C (Tabelle 1). Der Einbau des Photodimers bewirkt eine signifikante Destabilisierung der Duplexe **10** und **12**, deren  $T_m$ -Werte (4  $\mu\text{M}$ ) 51.0 bzw. 41.2 °C sind. Eine solche Destabilisierung wurde bereits früher einer lokalen Störung der  $\pi$ -Stapelung- und H-Brücken-Wechselwirkung des Dimers im DNA-Duplex zugeschrieben,<sup>[15]</sup> obwohl NMR-Untersuchungen<sup>[15c, 6]</sup> und Berechnungen<sup>[17]</sup> vermuten lassen, daß der Dimer-Schaden noch innerhalb des Duplex lokalisiert ist.

Die für Referenzzwecke hergestellten DNA-RNA-Heteroduplexe **13** und **15** schmelzen bei  $T_m = 54.9$  bzw. 46.3 °C (4  $\mu\text{M}$ ). Der Einbau des Photodimers in diesen A-artigen Duplex bewirkt eine signifikant geringere Destabilisierung des Duplexes: Die Schmelzpunkte nehmen um ein sehr viel kleineres Ausmaß ab und ergeben einen  $T_m$ -Wert (4  $\mu\text{M}$ ) von 51.5 °C für **14** und von 45.6 °C für **16**. Diese Werte sind nur um 3.4 °C bzw. 0.7 °C niedriger als die der Referenzverbindungen **13** und **15**. Für die geringere Destabilisierung des geschädigten DNA-RNA-Hybrids sprechen auch die thermodynamischen Daten

(Tabelle 1). Der Einbau der Dimereinheit in die DNA-DNA-Duplexe **10** und **12** verringert deren Stabilität um +12 bzw. +10 kJ mol<sup>-1</sup> im Vergleich zu der von **9** bzw. **11**. Innerhalb der DNA-RNA-Serie vom A-Typ ist die Abnahme der Stabilität jedoch zwei- bis viermal kleiner. Der Unterschied  $\Delta(\Delta G)$  beträgt +6 kJ mol<sup>-1</sup> zwischen **13** und **14** und nur +2 kJ mol<sup>-1</sup> zwischen **15** und **16**.

Sollte die Erkennung von DNA-Schädigungen durch die Duplex-Konformation und durch den Betrag der Destabilisierung des Duplexes beeinflusst werden, dann wäre eine erhöhte Reparaturrate für **1** im stark destabilisierten B-Duplex zu erwarten. Um diese Hypothese zu testen, haben wir die Reparatureffizienz von **1** enthaltenden DNA-DNA- und DNA-RNA-Duplexen durch eine DNA-Photolyase (*A. nidulans*) verglichen.<sup>[19]</sup> Ersten Experimenten zufolge erkennen diese Enzyme nur einige wenige Phosphodiester-Gruppen, die sich direkt neben der Dimereinheit und fast ausschließlich in dem Strang befinden, der die Schädigung enthält.<sup>[12]</sup> Um diese Ergebnisse zu bestätigen, untersuchten wir zuerst die Reparatur der DNA-Einzelstränge **7** und **8** und der DNA-DNA-Doppelstränge **10** und **12**. Wir stellten jedoch identische Reparaturraten fest (Abbildung 2), was unterstreicht, daß Photolyasen die *cis-syn*-Photoschäden bei den

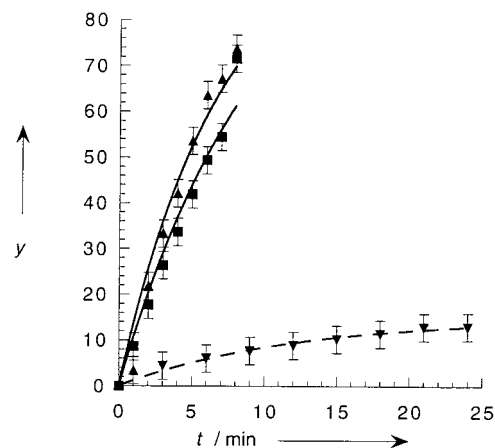


Abbildung 2. Kinetische Messungen der Reparatur der Schädigung **1** im Einzelstrang (**7**, ■), im DNA-DNA-Duplex (**10**, ▲) und im DNA-RNA-Duplex (**14**, ▼). Ähnliche Ergebnisse wurden für die Oligomere **8**, **12** und **16** erhalten. Alle Messungen der Photolyaseaktivität wurden mindestens zweimal und bei zwei verschiedenen Oligonucleotidkonzentrationen durchgeführt ( $c_{\text{oligo}} = 10^{-6}$  M und  $10^{-7}$  M,  $c_{\text{enzym}} = 5 \times 10^{-8}$  M). y: Anteil an repariertem Oligonucleotid in %.

verwendeten Konzentrationen weitgehend unabhängig vom Gegenstrang reparieren.<sup>[3d]</sup> Die abschließenden Reparaturdaten für die DNA-DNA- und DNA-RNA-Duplexe sind in Abbildung 2 für die Oligonucleotid-Serie **7**, **10** und **14** dargestellt. Die Messung der Dimerreparatur in der A-artigen DNA-RNA-Umgebung (**14** und **16**) ergab in Übereinstimmung mit der Hypothese drastisch verringerte Reparatureffizienzen (Abbildung 2). Unter allen Bedingungen stellten wir eine annähernd 10fach (!) geringere Reparaturrate fest. Die Zugabe von nichtkomplementärer RNA während eines solchen Experiments beeinflusste die Reparatureffizienz nicht. Damit scheidet die Möglichkeit aus, daß die Photolyase

durch RNA inhibiert wird. Auch wenn wir nicht völlig ausschließen können, daß die 2'-OH-Gruppe der RNA in den DNA-RNA-Duplexen die Schadenserkenkung beeinflußt, hat den RNA-Kontrollexperimenten und Ergebnissen mit den Einzelsträngen zufolge die 2'-OH-Gruppe einen nur begrenzten Einfluß.

Die thermodynamischen Daten verdeutlichen, daß einer der wichtigsten durch Umwelteinflüsse induzierten DNA-Photoschäden einen Duplex in einer A-Konformation weniger destabilisiert als in der üblichen B-Konformation. Die durch DNA-Photolyase katalysierte Reparatur eines 1 enthaltenden DNA-Stranges ist gegenüber der eines entsprechenden DNA-DNA-Duplex stark verringert, falls der Einzelstrang mit einem RNA-Gegenstrang (DNA-RNA-Hybrid) gepaart wird. Bisher ist weder das angenommene, von der Photolyase induzierte Herausklappen der Schädigung aus der Helix („Flipping“) noch der Einfluß der 2'-OH-Gruppen des RNA-Gegenstranges auf die Bindung der Photolyase vollständig verstanden. Dennoch geben unsere Daten einen klaren Hinweis darauf, daß konformative Faktoren den Destabilisierungseffekt von DNA-Schädigungen modulieren und die DNA-Reparatureffizienz beeinflussen. Wir schließen ausgehend von unseren Daten und dem Wissen, daß Photolyasen sich dem DNA-Duplex über die große Furche annähern: Die spezielle A-Konformation mit ihrer engen und tiefen großen Furche behindert das „Flipping“ der Schädigung aus dem Duplex.

Eingegangen am 2. Oktober 1998 [Z12482]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 708–711

**Stichwörter:** DNA-Reparatur • DNA-RNA-Hybride • DNA-Strukturen • Photolyasen • UV-Photoschäden

- [1] a) T. Lindahl, *Nature* **1993**, 362, 709–715; b) P. F. Heelis, R. F. Hartman, S. D. Rose, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 289–297; c) T. P. Begley, *Acc. Chem. Res.* **1994**, 27, 394–401; d) T. Carell, *Chimia* **1995**, 49, 365–373; e) T. Carell, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 2697–2700; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 2491–2494.
- [2] a) H. W. Thielmann, *Recent Results in Cancer Research: Skin Carcinogenesis in Man and in Experimental Models*, Vol. 128, Springer, Heidelberg, **1993**; b) J.-S. Taylor, *J. Chem. Educ.* **1990**, 67, 835–841; c) J.-S. Taylor, *Acc. Chem. Res.* **1994**, 27, 76–82.
- [3] a) E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede, *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press, Washington, DC, **1995**; b) A. Sancar, *Science* **1994**, 266, 1954–1956; c) A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 15915–15918; d) A. Sancar, *Biochemistry* **1994**, 33, 2–9.
- [4] a) L. Daya-Grosjean, N. Dumaz, A. Sarasin, *J. Photochem. Photobiol. B* **1995**, 28, 115–124; b) A. J. Nataraj, J. C. Trent II, H. N. Ananthaswamy, *Photochem. Photobiol.* **1995**, 62, 218–230; c) S. Tornaletti, G. P. Pfeifer, *Science* **1994**, 263, 1436–1438.
- [5] a) R. S. Lloyd, X. Cheng, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 4, 139–151; b) R. J. Roberts, *Cell* **1995**, 82, 9–12; c) G. L. Verdine, S. D. Bruner, *Chem. Biol.* **1997**, 4, 329–334; d) deutliche Hinweise auf das Herausklappen von Basen durch Photolyasen siehe in Lit. [19] und: B. J. van de Berg, G. B. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 20276–20284; D. Ramaiah, Y. Kan, T. Koch, H. Ørum, G. B. Schuster, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 12902–12905.
- [6] a) B. Suter, M. Livingstone-Zatchej, F. Thoma, *EMBO J.* **1997**, 16, 2150–2160; b) R. E. Wellinger, F. Thoma, *EMBO J.* **1997**, 16, 5056–5056.
- [7] Z. Livneh, O. Cohen-Fix, R. Skaliter, T. Elizur, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1993**, 28, 465–513.
- [8] Solche Hybrid-Duplexe sind während der DNA-Transkription, der DNA-Replikation und der reversen Transkription von RNA biologisch relevant. Für eine detaillierte Untersuchung ihrer Konformation siehe z. B.: a) M. Egli, N. Usman, A. Rich, *Biochemistry* **1993**, 32, 3221–3237; b) M. Egli, N. Usman, S. Zhang, A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 534–538. In Lösung bilden DNA-RNA-Hybride einen insgesamt eher A-artigen Duplex, in dem die meisten der Desoxyribosen eine *C<sub>2'</sub>'-endo*- und der Ribosen eine *C<sub>3'</sub>'-endo*-Konformation annehmen. Siehe z. B.: a) L. Ratmeyer, R. Vinayak, Y. Y. Zhong, G. Zon, W. D. Wilson, *Biochemistry* **1994**, 33, 5298–5304; b) J. I. Gyi, G. L. Conn, A. N. Lane, T. Brown, *Biochemistry* **1996**, 36, 12538–12548.
- [9] A. S. Kamath-Loeb, A. Hizi, J. Tabone, M. S. Solomon, L. A. Loeb, *Eur. J. Biochem.* **1997**, 250, 492–501. Andere Reparatursysteme weisen eine erhöhte Aktivität mit steigender Duplexinstabilität auf. Siehe z. B.: a) C. P. Selby, A. Sancar, *Science* **1993**, 260, 53–58; b) X. Zhao, J. Liu, D. S. Hsu, S. Zhao, J.-S. Taylor, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 32580–32590; c) D. Mu, M. Tursun, D. R. Duckett, J. T. Drummond, P. Modrich, A. Sancar, *Mol. Cell. Biol.* **1997**, 17, 760–789; d) M. T. Hess, U. Schwitter, M. Petretta, B. Giese, H.-P. Nägeli, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 6663–6669; e) D. L. Svoboda, C. A. Smith, J.-S. A. Taylor, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 10694–10700.
- [10] a) J. M. Veal, X. Gao, F. K. Brown, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 7139–7145; b) X. Gao, F. K. Brown, P. Jeffs, N. Bischofberger, K. Y. Lin, A. Pipe, S. A. Noble, *Biochemistry* **1992**, 31, 6228–6236.
- [11] J. Butenandt, A. P. M. Eker, T. Carell, *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 642–653.
- [12] a) I. Husain, G. B. Sancar, S. R. Holbrook, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 13188–13197; b) S.-T. Kim, A. Sancar, *Biochemistry* **1991**, 30, 8623–8630; c) eine kleine Auswirkung des Gegenstranges auf die Bindung der Photolyasen wurde beschrieben in: A. Kiener, I. Husain, A. Sancar, C. Walsh, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 13880–13887; d) Die DNA-Sequenz beeinflusst die Bindung (*K<sub>d</sub>*) von Photolyasen an DNA-DNA-Doppelstränge geringfügig: D. L. Svoboda, C. A. Smith, J.-S. Taylor, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1993**, 258, 10694–10700.
- [13] a) K. B. Hall, L. W. McLaughlin, *Biochemistry* **1991**, 30, 10606–10613; b) L. Ratmeyer, R. Vinayak, Y. Y. Zhong, G. Zon, W. D. Wilson, *Biochemistry* **1994**, 33, 5298–5304; c) J. I. Gyi, G. L. Conn, A. N. Lane, T. Brown, *Biochemistry* **1996**, 35, 12538–12548.
- [14] L. A. Marky, K. J. Breslauer, *Biopolymers* **1987**, 26, 1601–1620.
- [15] a) F. N. Hayes, D. L. Williams, R. L. Ratliff, A. J. Varghese, C. S. Rupert, *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, 93, 4940–4942; b) F. Barone, A. Bonincontro, F. Mazzei, A. Minoprio, F. Pedone, *Photochem. Photobiol.* **1995**, 61, 61–67; c) J.-S. Taylor, D. S. Garrett, I. R. Brockie, D. L. Svoboda, J. Telser, *Biochemistry* **1990**, 29, 8858–8866.
- [16] a) J. Kemmink, R. Boelens, T. Koning, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, R. Kaptein, *Nucleic Acids Res.* **1987**, 15, 4645–4653; b) J. Kemmink, R. Boelens, T. M. G. Koning, R. Kaptein, G. A. van der Marel, J. H. van Boom, *Eur. J. Biochemistry* **1987**, 162, 37–43; c) J.-K. Kim, D. Patel, B.-S. Choi, *Photochem. Photobiol.* **1995**, 62, 44–50.
- [17] a) T. I. Spector, T. E. Cheatham III, P. A. Kollman, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 7095–7104; b) M. G. Cooney, J. H. Miller, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 1432–1436; c) H. Yamaguchi, D. M. F. van Aalten, M. Pinak, A. Furukawa, R. Osman, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 1939–1946; d) K. Miaskiewicz, J. Miller, M. Cooney, R. Osman, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 9156–9163.
- [18] Alle thermodynamischen Experimente wurden in einem Tris/HCl-Puffer durchgeführt;  $\Delta G$  wird für 15°C angegeben. Dies ermöglicht es, die thermodynamischen Daten direkter mit denen der enzymkinetischen Messungen zu vergleichen, die in einem Phosphatpuffer (pH 7.0) bei 15°C durchgeführt wurden.
- [19] Kristallstrukturen: a) H.-W. Park, S.-T. Kim, A. Sancar, J. Deisenhofer, *Science* **1995**, 268, 1866–1872; b) T. Tamada, K. Kitadokoro, Y. Higuchi, K. Inaka, A. Yasui, P. E. de Ruiter, A. P. M. Eker, K. Miki, *Nature Struct. Biol.* **1997**, 11, 887–891.