

*Orlando D. Schärer\**

DNA-Reparatur · DNA-Schäden ·  
Enzymkatalyse · Krebs · Moleku-  
lare Erkennung



**Z**ahlreiche Agentien endogenen und exogenen Ursprungs schädigen die DNA in unserem Genom. Es existieren unterschiedliche Reparatursysteme, die Schäden in der DNA erkennen und durch eine Vielzahl von Reaktionssequenzen beheben können. Defekte DNA-Reparaturproteine hängen mit einigen erblich bedingten Syndromen zusammen, die eine Prädisposition für Krebs aufweisen. Während die DNA-Reparatur einerseits essenziell für eine gesunde Zelle ist, beeinträchtigen DNA-Reparaturenzyme andererseits die Effizienz vieler Antitumorstoffe, deren Wirkung auf der Schädigung von DNA beruht, sodass DNA-Reparaturenzyme auch hinsichtlich des Wirkstoff-Designs von großer Bedeutung sind. DNA-Reparaturprozesse variieren stark in ihrer Art und Komplexität. Während in einem Fall nur ein einziges Enzym benötigt wird, ist an anderen Pfaden ein koordiniertes Zusammenspiel von dreißig oder mehr Proteinen beteiligt. Unser Kenntnisstand der genetischen, biochemischen und strukturellen Grundlagen der DNA-Reparatur und damit verwandter Prozesse hat sich in den letzten Jahren stark verbessert. Dieser Aufsatz fasst die jüngsten Forschungsergebnisse auf diesem Gebiet zusammen.

## Aus dem Inhalt

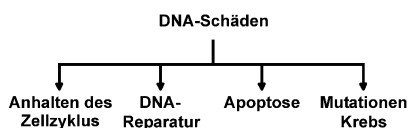
1. Einleitung	3053
2. DNA-Schädigung und Reaktionen in menschlichen Zellen	3054
3. Reparatur durch Schadensumkehrung	3056
4. Basenexzisionsreparatur	3057
5. Nucleotidexzisionsreparatur	3063
6. Fehlpaarungsreparatur	3066
7. Reparatur von Doppelstrangbrüchen	3069
8. Zusammenfassung und Ausblick	3074
9. Glossar	3074

## 1. Einleitung

Die Erhaltung der genomischen Integrität ist für alle Organismen von außerordentlicher Bedeutung. Schäden in unserer genomischen DNA sind das Resultat einer dauernden Einwirkung zahlreicher Substanzen mit potenziell schwerwiegenden Folgen. Modifikationen in der DNA können zu Mutationen führen, die die Codierungssequenz der DNA verändern und in Säugern Krebs auslösen können. Andere DNA-Läsionen interferieren mit normalen zellulären Transaktionen wie der DNA-Replikation oder -Transkription und sind toxisch für die Zelle. Zellen haben Wege entwickelt, um diesen negativen Folgen einer beschädigten DNA entgegenzuwirken. Es existieren zahlreiche Reparaturpfade, die Läsionen in der DNA beheben können. Die essenzielle Funktion der DNA-Reparatur wird anhand etlicher humaner Syndrome deutlich, die auf beschädigte DNA-Reparaturgene zurückgehen. Ein typisches Kennzeichen dieser Krankheiten ist die drastisch erhöhte Prädisposition für Krebs. Schäden in der DNA führen zu einer Reihe von Antworten in der Zelle, die eng mit der DNA-Reparatur verknüpft sind (Schema 1). So wird der Zellzyklus angehalten, damit die Zelle vor der Replikation und der Zellteilung genügend Zeit zur Reparatur hat.<sup>[1,2]</sup> Ist der zugefügte Schaden einer Zelle zu groß, so hat die Zelle die Möglichkeit den programmierten Zelltod einzuleiten, um die Vermehrung stark geschädigter Zellen zu verhindern.<sup>[3]</sup> Des Weiteren existieren auch spezielle DNA-

Polymerasen, die Schäden während der DNA-Replikation tolerieren und eine Läsion entweder unter Bildung eines exakten Replikationsprodukts oder einer Mutation umgehen. Die genaue biologische Funktion dieser DNA-Polymerasen ist bislang nicht geklärt.<sup>[4,5]</sup>

Ziel dieses Aufsatzes ist es, einen umfassenden Überblick über Mechanismen der DNA-Reparatur in Säugerzellen mit einem besonderen Fokus auf chemisch relevanten Prozessen zu geben. Jährlich erscheinen mehr als hundert Übersichten zu den unterschiedlichsten Aspekten der DNA-Reparatur (siehe z. B. Lit. [6–8] für neuere wichtige Publikationen), doch ist das Thema noch nie mit ausgesprochen chemischem Schwerpunkt umfassend behandelt worden (siehe Lit. [9–13] für chemisch orientierte Publikationen, in denen einzelne Reparaturpfade besprochen werden). Über die offensichtliche Bedeutung in der Biologie und Medizin hinaus existieren auch aus Sicht der Chemie zahlreiche Gründe für ein Interesse an DNA-Reparaturprozessen: 1) Die intrinsische Reaktivität der zahlreichen funktionellen Gruppen in der DNA ist für die Entstehung von Schäden verantwortlich. Es ist daher wichtig, die chemischen Prozesse bei der Entstehung von Schäden in der DNA zu kennen. 2) Der komplexe Vorgang der molekularen Erkennung durch DNA-Reparaturenzyme, die spezifisch kleine Strukturänderungen in der DNA in rund 3 Milliarden Basenpaaren des menschlichen Genoms erkennen müssen, könnte auf der Grundlage che-



**Schema 1.** Reaktionen auf DNA-Schäden und deren Folgen.

[\*] Dr. O. D. Schärer  
Institut für Molekulare Krebsforschung  
Universität Zürich  
August-Forel-Strasse 7, 8008 Zürich (Schweiz)  
Fax: (+41) 1-634-8904  
E-mail: scharer@imr.unizh.ch

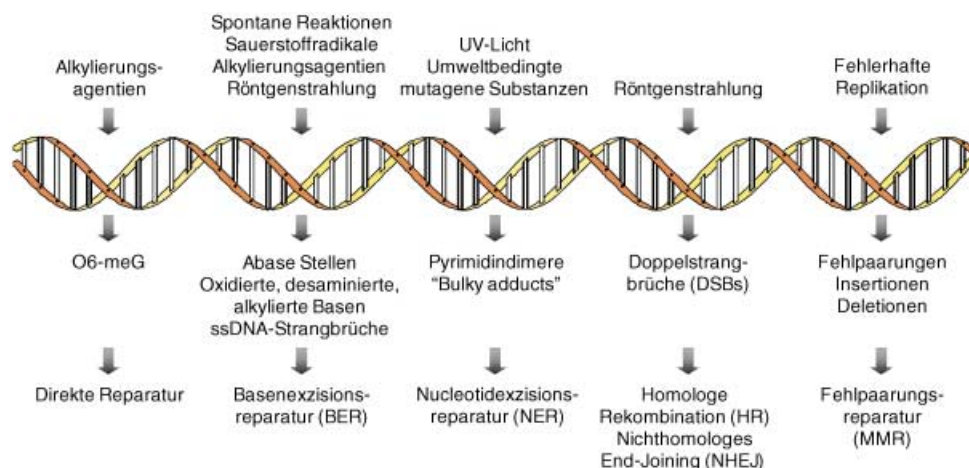


Abbildung 1. Häufigste DNA-schädigende Agentien, Läsionen und Reparaturpfade.

mischer Prinzipien verstanden werden. 3) Eines der zentralen Ziele der molekularen und chemischen Biologie ist es, die molekularen Grundlagen von Multiproteinsystemen zu verstehen („Big Protein Machines“), die Reaktionen katalysieren und komplexe Transformationen ausführen.<sup>[14]</sup> DNA-Reparaturpfade schließen solche Systeme ein und sind darüber hinaus experimentell zugänglich. 4) Die Wirkung der meisten Antitumorwirkstoffe, z. B. von Cisplatin, Alkylierungsmitteln oder Mitomycin C, beruht auf der cytotoxischen Schädigung der DNA und wird durch DNA-Reparaturenzyme gedämpft. Ist auf der einen Seite eine intakte DNA-Reparatur essenziell für einen gesunden Organismus, so könnte andererseits eine selektive Inhibierung der Reparatur zu einer verbesserten Antitumortherapie bei Krebszellen führen. DNA-Reparaturenzyme spielen somit auch beim Wirkstoff-Design eine Rolle.

In den folgenden Abschnitten werden die unterschiedlichen Arten von bekannten Schäden in der DNA behandelt und die biochemischen und strukturellen Grundlagen sowie die biologische und medizinische Relevanz der entsprechenden Reparaturpfade für Säuger-DNA erläutert. Ziel ist es, einen allgemeinen Überblick über die bekannten DNA-Reparaturpfade in Säugern zu geben, wobei zwei Aspekte herausgehoben werden: 1) Die spezifische Erkennung von beschädigten Stellen in der DNA durch DNA-Reparatur-

enzyme. 2) Chemische Ansätze, die zur Untersuchung von DNA-Reparaturmechanismen herangezogen werden.

## 2. DNA-Schädigung und Reaktionen in menschlichen Zellen

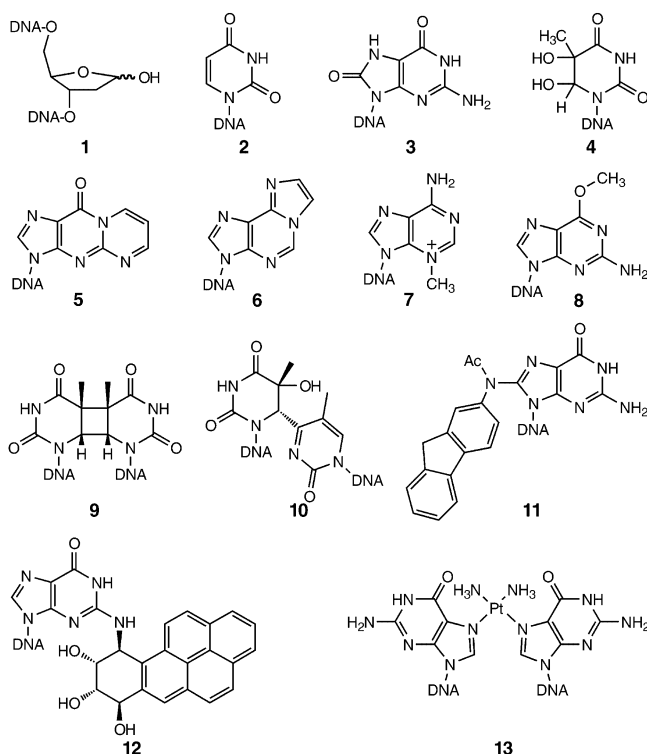
Die DNA ist in wässriger Lösung nicht unendlich stabil, und zahlreiche schädigende Substanzen endogenen und exogenen Ursprungs tragen zum Verfall oder zur Destabilisierung der DNA bei.<sup>[15]</sup> Schätzungen haben ergeben, dass in einer einzelnen menschlichen Zelle etwa  $10^4$ – $10^6$  DNA-Schädigungsereignisse pro Tag stattfinden, was demnach in einem erwachsenen Menschen ( $10^{12}$  Zellen) etwa  $10^{16}$ – $10^{18}$  Reparaturereignisse nach sich ziehen muss.<sup>[6]</sup> Da bereits Änderungen weniger Basenpaare im Genom theoretisch zu Krebs führen können, müssen DNA-Reparatursysteme dieser Gefahr effizient entgegenwirken. Abbildung 1 gibt einen Überblick über die wichtigsten Prozesse und Substanzen, die Schädigungen an der DNA bewirken, sowie über die dabei erzeugten Läsionen und die entsprechenden Reparaturpfade.

### 2.1. Schäden an den Nucleobasen von DNA

Die einfachste Reaktion, die die DNA gefährdet, ist die Hydrolyse.<sup>[15]</sup> Die glycosidische Bindung von Purinnucleotiden kann unter sauren Bedingungen leicht hydrolysiert werden. Abasische Stellen (**1**, Schema 2), die Produkte der Depurinierung, haben die genetische Information verloren und können demzufolge während der Replikation zu Mutationen führen.<sup>[16]</sup> Anhand neuerer Studien, in denen ein hochempfindlicher Sensor für die Reaktivität der Aldehydgruppe abasischer Stellen eingesetzt wurde, konnte die Häufigkeit spontan generierter abasischer Stellen in einer menschlichen Zelle zu ungefähr 10000 pro Tag geschätzt werden.<sup>[17]</sup> Abasische Stellen sind basenlabil und können durch weitere spontane Fragmentierung zu cytotoxischen Einzelstrangbrüchen führen. Eine weitere Hydrolyse an den



Orlando Schärer ist in Zürich geboren und studierte Chemie an der dortigen Eidgenössischen Technischen Hochschule. Er promovierte 1996 bei Greg Verdine an der Harvard University und schloss sich danach als Postdoc der Arbeitsgruppe von Roland Kanaar und Jan Hoeijmakers an der Erasmus-Universität Rotterdam an. Seit 1999 ist er START Fellow des Schweizerischen Nationalfonds und EMBO Young Investigator an der Universität Zürich. Seine derzeitigen Forschungsschwerpunkte umfassen die DNA-Reparatur in Säugern und die daran anknüpfende Entwicklung von Ansätzen zur Antitumor- und Gentherapie.



**Schema 2.** Beispiele häufiger Läsionen in DNA: Abasische Stellen (1) und Uracil (2) entstehen durch Hydrolysen; oxidative Schäden führen zur direkten Bildung von 8-Oxoguanin (3), Thyminglycol (4) und indirekt zu M<sub>1</sub>G (5) und 1,N<sup>6</sup>-Ethenoadenin (6); endogene und exogene Methylierungsmittel bilden unter anderem 3-Methyladenin (7) und O<sup>6</sup>-Methylguanin (8). UV-Strahlung induziert die Entstehung von Photoaddukten von Pyrimidinen, z. B. Cyclobutandimeren (CPD, 9) und (6-4)-Photoaddukten (10). Aromatische Amine oder Nitroverbindungen und aromatische Kohlenwasserstoffe werden in den Zellen zu reaktiven Zwischenprodukten metabolisiert, die mit DNA Addukte des Typs 11 oder 12 bilden. Viele Antitumorwirkstoffe bilden DNA-Addukte; ein Beispiel ist Cisplatin, das zwei Guaninbasen durch Intra- und Interstrang-DNA-Crosslinks verknüpfen kann (13).

exocyclischen Aminogruppen von C, 5-MeC, A und G ergibt die Basen Uracil, Thymin, Hypoxanthin und Xanthin.<sup>[15]</sup> Diese Desaminierungen führen zu Änderungen in der Codierungssequenz. Hierbei ist die Bildung von Uracil aus Cytidin die wichtigste Läsion, und ihr Auftreten in einer menschlichen Zelle wird auf 100–500 Ereignisse pro Tag geschätzt.<sup>[18]</sup>

Neben Wasser werden als Folge des normalen Zellmetabolismus viele reaktive Spezies erzeugt. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxid-Radikalanionen, Wasserstoffperoxid oder Hydroxylradikale entstehen als Nebenprodukte des oxidativen Metabolismus und können mit DNA zu mehr als 100 heute bekannten Oxidationsprodukten reagieren.<sup>[19,20]</sup> Die wichtigsten Vertreter davon sind 8-Oxoguanin (3), das mutagen wirkt und die Transkription blockieren kann, und Thyminglycol (4), das nur schwach mutagen ist, aber als starker Blocker der DNA-Replikation und -Transkription wirkt.<sup>[21,22]</sup> Reaktive Sauerstoffspezies können DNA-Basen auch auf eine indirekte Weise modifizieren. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren etwa werden durch ROS leicht zu difunktionalen Elektrophilen wie Malondialdehyd oxidiert, aus

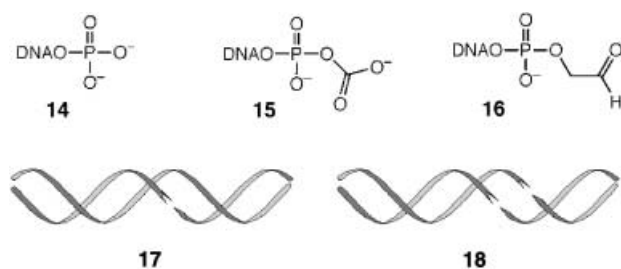
denen Pyrimidinopurinone M<sub>1</sub>G (5) oder Epoxidierungsprodukte von Acrolein hervorgehen, die ihrerseits Ethenomodifikationen von A (6), C und G bilden können.<sup>[23]</sup>

Cofaktoren enzymatischer Reaktionen wie S-Adenosylmethionin (SAM), ein Methylgruppendonator, können versehentlich DNA methylieren, was entweder zur Bildung der relativ harmlosen Läsion 7-Methylguanin führt oder aber zu 3-Methyladenin (7), das wegen seiner Fähigkeit zur Blockierung der DNA-Replikation stark cytotoxisch ist.<sup>[24]</sup> Dass relativ seltene Läsionen physiologisch sehr wichtig sein können, wird anhand verschiedener Methyladdukte in der DNA deutlich. Anders als das relativ harmlose 7-Methylguanin ist O<sup>6</sup>-Methylguanin (8) ein weniger häufiges Methylierungsprodukt, dessen cytotoxische und mutagene Wirkung aber offenbar so wichtig ist, dass sich ein spezifischer Reparaturpfad zur Behebung dieser Läsion entwickelt hat.<sup>[25]</sup> Basenexzisionsreparatur (BER, „Base-Excision Repair“) und, im Falle von O<sup>6</sup>-Methylguanin, direkte Reparatur sind die wichtigsten Reaktionswege für die Behebung spontaner und durch den normalen zellulären Metabolismus an DNA verursachter Läsionen.<sup>[7,15,26]</sup>

Zusätzlich zur DNA-Schädigung durch den normalen zellulären Metabolismus existieren zahlreiche exogene Ursachen. Einige davon, z. B. die UV-Strahlung des Sonnenlichts, sind natürlichen Ursprungs und können nicht abgewendet werden, wohingegen die Exposition gegen eine Vielzahl von genotoxischen Substanzen, etwa solche im Tabakrauch, letztlich von den individuellen Umgebungsbedingungen abhängt. UV-Strahlung führt zur Bildung von Pyrimidin-Photoaddukten, vor allem Cyclobutandimeren (9) und (6-4)-Photoaddukten (10), in der DNA.<sup>[27]</sup> Es existieren zahlreiche Beispiele von Addukten, die durch Einwirkung von mutagenen Substanzen aus der Umwelt wie aromatischen Aminen (11) und aromatischen Kohlenwasserstoffen (12) sowie von Antitumorwirkstoffen wie Cisplatin (13) gebildet werden („Bulky Adducts“).<sup>[28]</sup> Bulky Adducts verzerren die DNA-Doppelhelix lokal sehr stark und blockieren sowohl die Transkription wie auch die DNA-Replikation. Sie werden in Säugern durch Nucleotidexzisionsreparatur entfernt (NER, „Nucleotide-Excision Repair“).<sup>[7,29]</sup> Die Fähigkeit von NER, eine große Zahl strukturell unterschiedlicher Läsionen in der DNA zu entfernen, könnte auf einen eigens entwickelten Prozess zur Reparatur sporadischer Läsionen durch mutagene Substanzen in der Umwelt zurückgehen. Während in Säugern Pyrimidindimere ausschließlich durch NER repariert werden, greifen niedere Eukaryoten, Pflanzen und Bakterien auch auf BER und Photolyasen zurück, um die Dimere wieder zu Monopyrimidinen umzusetzen.

## 2.2. Schädigung des DNA-Rückgrats und Doppelstrangbrüche

Schäden am Rückgrat der DNA entstehen vorwiegend durch Oxidation der Desoxyribose, die mehrere Stellen mit einer hohen Reaktivität gegen Sauerstoffradikale enthält.<sup>[20,30,31]</sup> Der oxidative Abbau des Zuckerbausteins führt zu einer Reihe von Addukten, z. B. Oligonucleotiden mit einer 3'-Phosphatgruppe (14; Schema 3), einem 3'-Phosphoglycolat (15) oder einem 3'-Phosphoglycaldehyd (16), neben



**Schema 3.** Sauerstoffradikale, ionisierende Strahlung und radiomimetische Wirkstoffe wie Bleomycin können unter Bildung von Phosphat- (14), 3-Phosphoglycolat- (15) und 3-Phosphoglycaldehyd-Endgruppen (16) den Desoxyriboseteil in DNA fragmentieren. Diese Schädigung des Zuckerrests führt zur Bildung von DNA-Einzel- (17) oder Doppelstrangbrüchen (18).

den komplementären Zuckerteilstrukturen (siehe Lit. [31] für eine vollständige Abhandlung der Zuckerfragmentierungsmechanismen). Der Typus der gebildeten Addukte hängt von der Position des abstrahierten Wasserstoffatoms im Zucker ab. All diese oxidativen Reaktionen führen zu DNA-Strangbrüchen. Neben reaktiven Sauerstoffspezies können ionisierende Strahlung, radiomimetische Arzneimittel wie Bleomycin oder Neocarzinostatin Strangbrüche auslösen. Die primären Produkte sind Einzelstrangbrüche (17; Schema 3), die durch eine Variante der BER repariert werden. Anders als die bislang diskutierten DNA-schädigenden Substanzen haben ionisierende Strahlung und radiomimetische Therapeutika die Eigenschaft, multiple Schäden in DNA in einem räumlich engen Bereich zu induzieren und auf diese Weise Doppelstrangbrüche (DSBs) zu erzeugen (18).<sup>[32]</sup> DSBs werden auch bei der Replikation erzeugt, entweder durch Replikation eines einzelnen Strangbruchs oder den Kollaps einer Replikationsgabel.<sup>[33]</sup> In anderen zellulären Prozessen wie Meiose oder V(D)J-Rekombination, die zur Diversifizierung des Genoms bei der Reproduktion bzw. bei der Reifung des Immunsystems beitragen, sind DSBs obligate Zwischenprodukte.<sup>[34]</sup> DSBs sind besonders schwerwiegende Läsionen, da sie zu massiven chromosomalen Aberrationen führen können. Es ist gezeigt worden, dass ein einziger nichtreparierter Doppelstrangbruch in Hefezellen den Zelltod bedeuten kann.<sup>[35]</sup> DSBs sind eine spezielle Herausforderung für die Reparaturmaschinerie, weil im Unterschied zu den vorstehend beschriebenen Läsionen beide DNA-Stränge beschädigt sind und somit kein Partnerstrang als Templat für die Reparatur zur Verfügung steht. Eukaryoten setzen bei der Behebung von DSBs grundsätzlich zwei Reparaturpfade ein: die homologe Rekombination (HR) und nichthomologes „End-Joining“ (NHEJ). Beide Pfade spielen in der Reparatur von DSBs eine Rolle und schließen darüber hinaus spezialisierte Reparaturfunktionen ein.<sup>[34,36]</sup>

### 2.3. DNA-Interstrang-Crosslinks

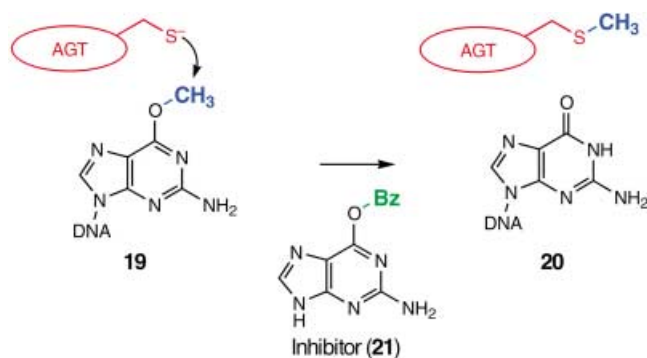
Ein weiterer Läsionstyp, der beide DNA-Stränge betrifft, ist der Interstrang-Crosslink (ICL), der sich durch eine kovalente Bindung zwischen den beiden Strängen an zwei

gegenüberliegenden DNA-Basen auszeichnet. ICLs sind hoch cytotoxisch, weil sie Transaktionen wie DNA-Replikation und -Transkription, bei denen die Separierung der beiden DNA-Stränge erforderlich ist, verhindern. Es ist bekannt, dass die Bildung von ICLs ein natürlicher Prozess ist (z. B. durch Reaktion von DNA mit difunktionellen elektrophilen Produkten aus oxidierten Lipiden), jedoch wird ihr Auftreten als eher selten eingestuft.<sup>[37]</sup> Psoralen, ein difunktionelles photoaktives aromatisches Molekül, das in der Photochemotherapie angewendet wird, ist häufig zur Untersuchung der biologischen Wirkung von ICLs herangezogen worden.<sup>[38]</sup> Interessanterweise bildet eine große Zahl von klinisch angewendeten Antitumorwirkstoffen, darunter Chlorethylnitrososoharnstoffe, Bis(chlorethyl)stickstoff-Verbindungen, Mitomycine und Cisplatin, ICLs als klinisch äußerst relevante, wenn auch nicht häufigste Addukte.<sup>[39]</sup> Hinweise sprechen dafür, dass die Reparatur von ICLs über die Bildung von DSBs verläuft, die ihrerseits anschließend durch homologe Rekombination behoben werden.<sup>[40]</sup>

### 3. Reparatur durch Schadensumkehrung

In Bakterien und niederen Eukaryoten werden UV-induzierte Pyrimidindimere und *O*<sup>6</sup>-Alkylguaninaddukte durch direkte Schadensumkehrung mithilfe von Photolyasen<sup>[13,41]</sup> und Alkylguanintransferasen repariert. In Säugern sind es ausschließlich die *O*<sup>6</sup>-Alkylguaninaddukte, die auf diese Weise repariert werden.<sup>[213]</sup>

*O*<sup>6</sup>-Alkylguanintransferase (AGT)-Aktivität zur Abwendung des mutagenen Effekts von *O*<sup>6</sup>-Methylguanin tritt in den meisten Organismen auf.<sup>[42]</sup> Die Reparatur von *O*<sup>6</sup>-Alkylguanin zu Guanin erfolgt durch den irreversiblen Transfer der Alkylgruppe von DNA zu einem reaktiven Cysteinrest des AGT-Proteins (Schema 4). Die kovalente Verknüpfung der Alkylgruppe mit dem Cysteinrest inaktiviert das Enzym. AGT ist somit ein Suizidenzym, das nach einem einzigen Umsatz dem proteolytischen Abbau zugeführt wird. Strukturstudien zufolge befindet sich die aktive Region der AGT im



**Schema 4.** Reparaturmechanismus der *O*<sup>6</sup>-Alkylguanintransferase AGT: AGT repariert Guaninreste der DNA, wobei die Methylgruppe von *O*<sup>6</sup>-Methylguanin (19) in einer irreversiblen Reaktion auf einen reaktiven Cysteinrest des Proteins übertragen wird. *O*<sup>6</sup>-Benzylguanin (21) ist ein potenter Inhibitor von AGT und wird als Antitumorwirkstoff in klinischen Studien verwendet.

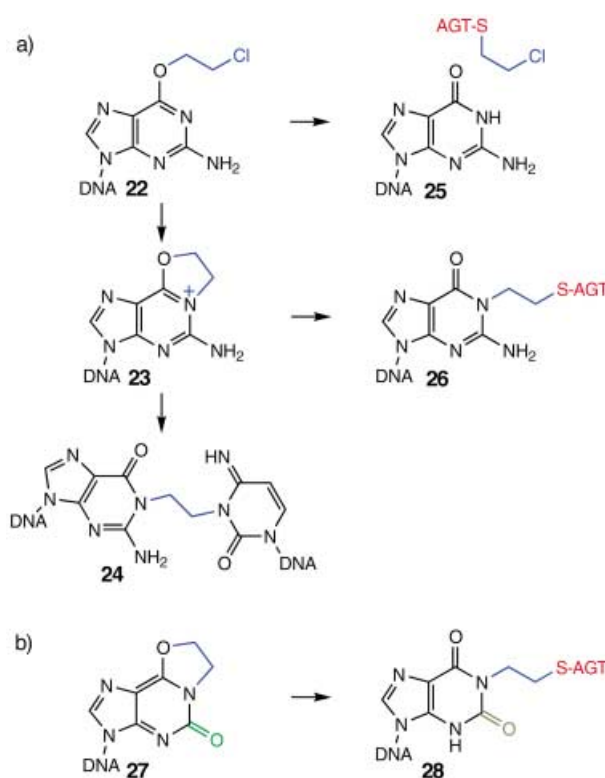


Innern des Proteins und demnach in einem gewissen Abstand zur DNA-Bindungsfläche.<sup>[43]</sup> Es wird angenommen, dass das Protein durch „Nucleotid-Flipping“ (auch Basen-Flipping genannt) die entsprechende Base und das Nucleophil im aktiven Zentrum der AGT zusammenbringt (siehe Abschnitt 4.2.2 für eine detailliertere Diskussion des Basen-Flipping).

Die Schutzfunktion der AGT hinsichtlich toxischer und mutagener Effekte durch Alkylierungsmittel wurde im Mausmodell demonstriert. Transgene Mäuse, die AGT überexprimieren, entwickeln bei Einwirkung des Alkylierungsmittels *N*-Methyl-*N*-nitrososoharnstoff signifikant weniger Tumore. Demgegenüber sind Mäuse, denen AGT fehlt, weitaus anfälliger für die tumorinduzierende und toxische Wirkung dieser Substanz als der Wildtyp.<sup>[44]</sup>

AGT ist ein wichtiges Enzym in der Antitumorthherapie, da es den cytotoxischen Effekt von Antitumorstoffen der Klasse der Chlorethylnitrososoharnstoffe (CENUs), z.B. BCNU oder Temozolomid, drosselt. Es ist gezeigt worden, dass bei Antitumorthapien mit CENUs die in Tumoren vorhandene Menge an AGT für den Erfolg der Therapie eine entscheidende Größe ist.<sup>[42]</sup> CENU reagiert in einem ersten Schritt mit der *O*<sup>6</sup>-Carbonylgruppe von Guanin zum Addukt **22** (Schema 5), das anschließend zum 1,*O*<sup>6</sup>-Ethanoguaninaddukt **23** reagiert. Dieses lagert sich schließlich innerhalb einiger Stunden zum physiologisch aktiven Interstrang-Crosslink **24** um.<sup>[45]</sup> AGT bekämpft die Bildung des ICL **24**, indem es mit **22** oder **23** reagiert und die Guanin-Base wiederherstellt oder ein DNA-Protein-Addukt **26** bildet. Hinweise für die Bildung von Addukt **26** wurden bereits gefunden, aber da es nur in kleinen Mengen isoliert werden konnte, war eine detaillierte Charakterisierung nicht möglich.<sup>[46a]</sup> Noll und Clarke verwendeten einen chemisch-biologischen Ansatz zur Lösung des Problems durch Einbau von 1,*O*<sup>6</sup>-Ethanoxanthin (**27**), einem stabilen Analogon von **23**, in DNA (Schema 5).<sup>[46b]</sup> **27** reagiert mit AGT unter Bildung des stabilen Protein-DNA-Addukts **28**. Mit diesem Ansatz gelang die Herstellung großer Mengen des kovalenten AGT-DNA-Addukts **28**, das zur ersten Strukturaufklärung eines an DNA gebundenen AGT-Proteins herangezogen werden konnte.

Die Beeinflussung der Alkylierungstherapie durch AGT hat zu einer Suche nach Inhibitoren für AGT geführt, die zusammen mit Alkylierungsmitteln in der Krebstherapie eingesetzt werden könnten. Die heute eingesetzten Inhibitoren sind hauptsächlich Guaninderivate, die an der *O*<sup>6</sup>-Position substituiert sind. *O*<sup>6</sup>-Benzylguanin (**19**, Schema 4) hat sich zum Goldstandard für AGT-Inhibitoren durchgesetzt, mit dem neu entwickelte Moleküle verglichen werden.<sup>[47]</sup> Die Effizienz von *O*<sup>6</sup>-BzG zur Potenzierung der Cytotoxizität von CENUs ist im Tiermodell bestätigt worden, und klinische Studien mit dieser Kombinationstherapie sind derzeit am Laufen.<sup>[48]</sup> Ein limitierender Faktor dieses therapeutischen Ansatzes ist die Toxizität in gesunden Organen, speziell im Rückenmark. Verschiedene Arbeitsgruppen versuchen dieses Problem zu umgehen, indem sie AGT-Varianten herstellen, die resistent gegen die inhibierende Wirkung von *O*<sup>6</sup>-BzG sind und durch Gentransfer das Knochenmark schützen könnten.<sup>[49]</sup>



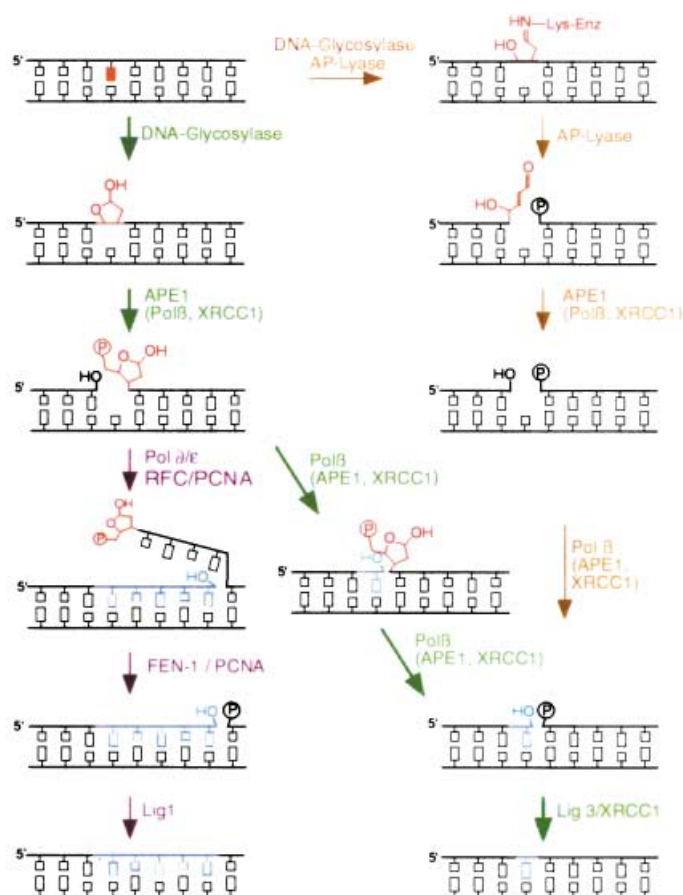
**Schema 5.** AGT hemmt die Wirkung von Antitumorstoffen:

a) Chlorethylnitrososoharnstoffe reagieren mit Guaninresten der DNA zum Addukt **22**. Dieses lagert sich zu *N*<sup>1</sup>,*O*<sup>6</sup>-Ethanoguanin (**23**) um, das seinerseits mit einem gegenüberliegenden Cytidinrest unter Bildung eines DNA-Crosslinks (**24**) reagieren kann. AGT kann mit **22** und **23** reagieren und die Bildung des Crosslinks verhindern. b) *N*<sup>1</sup>,*O*<sup>6</sup>-Ethanoxanthin (**27**) ist ein stabiles Analogon von **23**, das synthetisch in DNA inkorporiert worden ist und mit AGT unter Bildung des Protein-DNA-Crosslinks (**28**) reagieren kann.

## 4. Basenexzisionsreparatur

### 4.1. Überblick

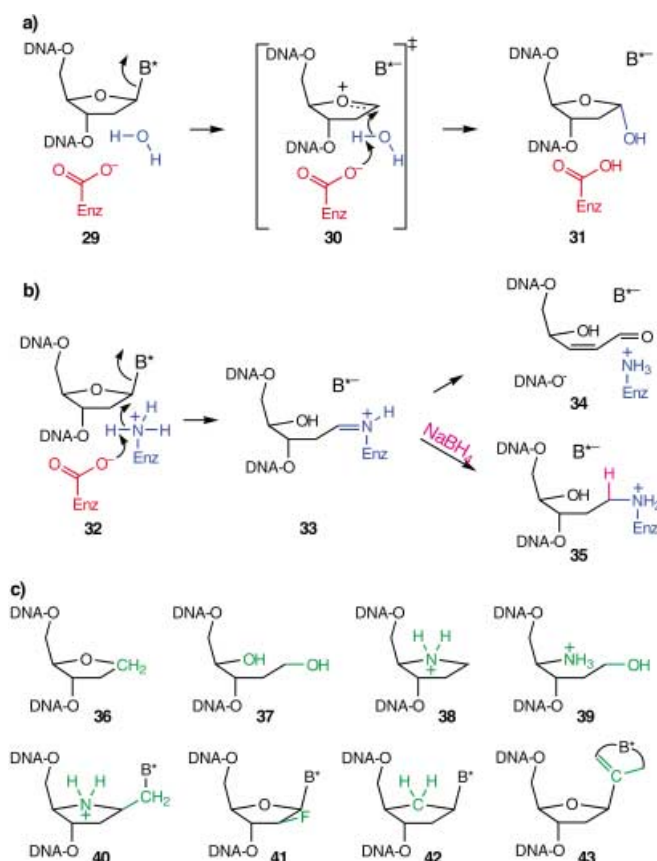
Schäden an DNA-Basen als Folge von Desaminierung, Oxidation und Alkylierung werden hauptsächlich durch Basenexzisionsreparatur entfernt.<sup>[7,10,15,26,50]</sup> BER wird durch DNA-Glycosylasen initiiert, die beschädigte Basen erkennen und durch Hydrolyse der *N*-glycosidischen Bindung zwischen der Base und dem Zucker-Phosphat-Rückgrat aus der DNA ausschneiden und so eine abasische Stelle als Produkt hinterlassen (Schema 6). Neun humane DNA-Glycosylasen sind geklont und charakterisiert worden, von denen jede eine einzigartige Substratspezifität aufweist (Tabelle 1). Drei Glycosylasen haben zusätzlich eine AP-Lyaseaktivität, weshalb sie die Bindung zwischen Zucker und Phosphat an der 3'-Position zur beschädigten Stelle spalten können (Schema 6, 7). Die AP-Endonuclease APE1 (auch als HAP-1 oder Ref-1 bezeichnet) ist das zweite Enzym im Pfad. APE1 hydrolysiert die Phosphodiesterbindung unter Bildung eines Nicks an der 5'-Position zur abasischen Stelle. Im wichtigsten BER-Pfad, dem „Short-Patch“-Reparaturpfad (in Schema 6 durch grüne Pfeile dargestellt) inkorporiert Polymerase  $\beta$  (Pol $\beta$ ) ein ein-



**Schema 6.** Basenexzisionsreparatur: Der prädominante „Short-Patch“-Pfad von BER ist mit grünen Pfeilen markiert. Die Enzyme, die die einzelnen Schritte katalysieren, sind dargestellt und ihre Wechselwirkungspartner in Klammern angegeben. DNA-Glycosylasen initiieren BER durch das Ausschneiden beschädigter Basen aus DNA unter Bildung abasischer Stellen. APE1 hydrolysiert die Phosphatbindung an der 5'-Seite der abasischen Stellen. Polymerase  $\beta$  (Pol $\beta$ ) fügt ein Nucleotid abfolgend zur abasischen Stelle ein und entfernt danach die abasische Stelle aufgrund seiner AP-Lyase-Aktivität. DNA-Ligase III schließt den Nick und stellt so die ursprüngliche DNA-Sequenz wieder her. Falls BER durch difunktionale DNA-Glycosylasen/AP-Lyasen initiiert wird, kann der Prozess auch auf dem mit braunen Pfeilen markierten Pfad verlaufen. Nach der Entfernung der Base hydrolysiert die AP-Lyase die 3'-Bindung zur abasischen Stelle. APE1, Polymerase  $\beta$  und DNA-Ligase III schließen danach die Reparatur ab, wobei die AP-Lyaseaktivität von Polymerase  $\beta$  nicht benötigt wird. Im „Long-Patch“-Pfad (violett) fügen Pol $\delta/\epsilon$  und assoziierte Faktoren zwei bis sechs Nucleotide abfolgend zur abasischen Stelle ein. Der resultierende Überhang wird durch die Fen-1-Endonuclease abgeschnitten und der Nick durch DNA-Ligase I geschlossen.

**Tabelle 1:** Menschliche DNA-Glycosylasen.

Enzym	wichtigste Substrate	AP-Lyase
UNG	U, 5ohU in ss/dsDNA	nein
SMUG1	U, 5ohU in ss/dsDNA	nein
TDG	U:G, T:G, $\epsilon$ C	nein
MBD4	U:G, T:G	nein
OGG1	8-OxoG:C, fapy	ja
MYH	A:8-OxoG	nein
NTH1	ox. Pyrimidine, fapy	ja
NEI1	ox. Pyrimidine, fapy	ja
AAG (MPG)	3-MeA, 7-MeG, $\epsilon$ A, Hx	nein



**Schema 7.** Reaktionsmechanismus und Inhibitoren von DNA-Glycosylasen: a) Durch eine monofunktionale DNA-Glycosylase katalysierte Reaktion: Ein Wassermolekül in der aktiven Stelle wird durch eine konservierte Carboxylseitenkette des Enzyms deprotoniert und so positioniert, dass es die beschädigte Base am anomeren Zentrum ersetzen kann. Bei UDG konnte anhand eines kinetischen Isotopeneffekts gezeigt werden, dass der Übergangszustand dissoziativen Charakter hat. Im Falle der anderen DNA-Glycosylasen ist bislang nicht klar, ob die Reaktion über einen dissoziativen oder assoziativen Mechanismus verläuft. Es ist wahrscheinlich, dass sich bei beiden Mechanismen im Übergangszustand eine substantielle positive Ladung aufbaut. b) Reaktionsmechanismus difunktionaler DNA-Glycosylasen/AP-Lyasen: Abgesehen davon, dass ein Lysinrest des Enzyms als Nucleophil wirkt, ist der erste Schritt der Reaktion identisch mit dem durch monofunktionale DNA-Glycosylasen katalysierten Reaktionsschritt. Es entsteht ein Schiff-Base-Addukt, **33**, das in einer basenkatalysierten  $\beta$ -Eliminierung reagiert, bei der die C3'-O-Bindung unter Stranginzision gespalten wird. **33** kann mit Natriumborhydrid unter irreversibler Bildung des Protein-DNA-Addukts **35** abgefangen werden. c) Synthetische Inhibitoren von DNA-Glycosylasen: Analoga von abasischen Stellen (**36**, **37**) inhibieren DNA-Glycosylasen, weil die meisten dieser Enzyme der Endproduktinhibition unterliegen. In den Inhibitoren **38–40** ist der Sauerstoff des Riboserings durch ein Stickstoffatom ersetzt worden, was zu einem positiv geladenen Zuckerrest führt, der den Übergangszustand nachahmen soll. Die Inhibitoren **41–43** enthalten eine stabilisierte glycosidische Bindung; sie werden von DNA-Glycosylasen zwar gebunden, aber nicht umgesetzt.

ziges Nucleotid und entfernt die abasische Stelle aufgrund ihrer AP-Lyaseaktivität. Für den Fall der BER-Initiation durch eine difunktionale DNA-Glycosylase/AP-Lyase, wird die AP-Lyaseaktivität von Polymerase  $\beta$  nicht benötigt (braune Pfeile in Schema 6). Die biologische Bedeutung der

AP-Lyaseaktivität der DNA-Glycosylasen ist bislang umstritten, und einige Studien kommen zu dem Schluss, dass die AP-Lyaseaktivität bei der BER überhaupt keine Rolle spielt.<sup>[51,52]</sup> Der Nick in der DNA wird durch DNA-Ligase III geschlossen, die mit Pol $\beta$  über XRCC1 („X-ray Repair Cross Complementing Group 1“) wechselwirkt.

Auch wenn die einzelnen Schritte der BER durch individuelle Enzyme ausgeführt werden, so verläuft der Prozess insgesamt hoch koordiniert, um eine reibungslose Reparatur der intermediären abasischen Stellen und Strangbrüche, die ihrerseits hochtoxische Läsionen sind, zu gewährleisten. DNA-Glycosylasen haben eine hohe Affinität zu ihren Produkten, d.h. den abasischen Stellen, und bleiben höchstwahrscheinlich solange daran gebunden, bis sie durch APE-1 umgesetzt werden. Bislang wurde keine direkte Wechselwirkung zwischen DNA-Glycosylasen und APE-1 nachgewiesen, aber es konnte gezeigt werden, dass APE-1 die durch unterschiedliche DNA-Glycosylasen katalysierten Reaktionen unterstützt. Vorschlägen zufolge handelt es sich in erster Linie um einen passiven Prozess, bei dem APE-1 schnell die von den DNA-Glycosylasen freigegebenen abasischen Stellen umsetzt.<sup>[51,53]</sup> Nach einer jüngsten Studie erhöht Sumoylierung (eine Ubiquitin-ähnliche posttranslatorische Modifikation) der DNA-Glycosylase TDG deren Turnover, was auf einen möglichen Mechanismus zur Regulierung der Bindungsaktivität zu abasischen Stellen hinweist.<sup>[54]</sup> Ob andere DNA-Glycosylasen ebenfalls in dieser Form reguliert werden, bleibt noch zu untersuchen. Die nachfolgende Verarbeitung abasischer Stellen wird durch spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen koordiniert. APE-1 wechselwirkt direkt mit Pol $\beta$  und XRCC1, und Pol $\beta$  seinerseits wechselwirkt mit Ligase III über XRCC1.<sup>[55]</sup> Während der Komplex zwischen XRCC1 und Ligase III konstitutiv ist, so scheint die Wechselwirkung zwischen den anderen Proteinen nur temporär zu sein.

Ein zweiter Pfad für die Reparatur von abasischen Stellen durch BER, der „Long-Patch“-Pfad, wurde beschrieben (violett in Schema 6). Long-Patch-BER verläuft unter Beteiligung von Polymerase  $\delta/\epsilon$  und assoziierten Replikationsfaktoren, die zwei bis sechs Nucleotide nachfolgend zur abasischen Stelle einfügen, der Flap-Endonuclease FEN-1, die das kurze überhängende Oligonucleotid abtrennt, sowie abschließend der DNA-Ligase I, die den Nick schließt.<sup>[56]</sup>

## 4.2. DNA-Glycosylasen

### 4.2.1. Substratspezifität von DNA-Glycosylasen

Vier der bekannten humanen Glycosylasen, UDG, SMUG1, TDG und MBD4, zeigen Aktivität gegen die durch Desaminierung von C entstandenen Basen (Uracil); TDG und MBD4 sind zusätzlich gegen desaminierte 5-MeC-Reste (Thymin) aktiv (Tabelle 1). UDG ist als die effizienteste DNA-Glycosylase an der Beseitigung der meisten Uracil-Basen aus DNA maßgeblich beteiligt. UDG wechselwirkt mit Komponenten der Replikationsmaschinerie und scheint das Genom unmittelbar nach der Replikation von Uracilresten zu befreien.<sup>[57]</sup> SMUG1 andererseits scheint während des gesamten Zellzyklus zu wirken und kommt

somit als konstitutives Reservesystem für UDG infrage.<sup>[58]</sup> UDG und SMUG1 sind die einzigen DNA-Glycosylasen, die sowohl an Einzelstrang- (ssDNA) wie auch an Doppelstrang-DNA (dsDNA) wirken können, während alle übrigen Enzyme ausschließlich mit dsDNA aktiv sind. TDG und MBD4 haben eine hohe Affinität für Guanin-fehlgepaartes Thymin und Uracil und könnten damit eine spezifische Funktion bei der Erhaltung der genomischen Stabilität bezüglich methylierter CpG-Sequenzen haben.<sup>[59]</sup> Die Methylierung von Cytosinresten tritt ausschließlich in CpG-Sequenzen des Säuger-genoms auf und ist für das Gen-Silencing und die Regulation der Transkription von großer Bedeutung. Einige Studien deuten darauf hin, dass TDG neben seiner Funktion bei der DNA-Reparatur auch einen Einfluss auf die Transkriptionsregulation und auf die aktive Demethylierung hat.<sup>[60]</sup> Ob TDG und MBD4 in erster Linie als DNA-Reparaturenzyme wirken oder eine andere Hauptfunktion haben, ist derzeit noch offen.

Zwei Enzyme wirken dem mutagenen Effekt von 8-Oxoguanin, einer der häufigsten Läsionen in DNA, entgegen: OGG1, das C-gepaartes 8-OxoG spezifisch entfernt und dadurch eine Fehlpaarung mit A in nachfolgenden Replikationszyklen verhindert (8-OxoG-Reste entstehen durch Oxidation von G in dsDNA)<sup>[61]</sup> sowie MYH-Glycosylase, die fehleringebaute, mit 8-OxoG-gepaarte Adenin-Basen entfernt (solche A-8OxoG-Paare entstehen während der Replikation).<sup>[62]</sup> Zusammen mit der 8-OxodGTP-Phosphatase MTH, die 8-OxodGTP hydrolysiert und so aus dem Nucleotidpool entfernt, bilden OGG1 und MYH-Glycosylase ein hochkoordiniertes Dreistufensystem, das die gesundheitsschädigende Wirkung von 8-OxoG in DNA und im Nucleotidpool hemmt.<sup>[63]</sup>

Oxidierte Pyrimidine wie Thyminglycole werden durch die NTH1- und NEI1-Glycosylasen entfernt. Beide Enzyme haben eine relativ breite Substratspezifität und können eine Vielzahl von oxidierten Pyrimidinen sowie bestimmte oxidierte Purine aus der DNA entfernen. Eine ungewöhnliche Eigenschaft des NTH1-Enzyms ist seine Stimulierbarkeit durch das XPG-Protein, das vorwiegend bei der NER eine Rolle spielt (siehe Abschnitt 5.3).<sup>[64]</sup> NEI1-Glycosylase, die am kürzlichsten entdeckte humane DNA-Glycosylase, wurde durch Datenbanksuchen im Zuge des Humangenomprojektes identifiziert.<sup>[65]</sup> Interessanterweise existieren im menschlichen Genom zwei weitere Homologe von NEI1, die bislang allerdings nicht charakterisiert sind.

Die Hauptfunktion von AAG (auch als MPG oder ANPG bezeichnet) ist zwar höchstwahrscheinlich die Reparatur alkylierter Purinreste in DNA, aber das Enzym hat eine bemerkenswert breite Substratspezifität und ist unter anderem aktiv gegen 3-Methyladenin, 7-Methylguanin, 1,*N*<sup>6</sup>-Ethenoadenin und Hypoxanthin.<sup>[66]</sup> Interessanterweise wurde belegt, dass AAG eine schwache Aktivität gegen unmodifizierte Nucleobasen hat.<sup>[67]</sup> Im Einklang damit ist die Beobachtung, dass eine Überexprimierung der Hefe-3-Methyladenin-DNA-Glycosylase Mag (die ähnliche Eigenschaften wie AAG hat) zu einem starken Mutator-Phänotyp führt, was bedeutet, dass eine genaue Regulation der BER zur Verhinderung mutagener Effekte durch abasische Stellen wichtig ist.<sup>[68]</sup>



Auch wenn zurzeit unklar ist, ob noch weitere DNA-Glycosylasen im menschlichen Genom existieren, so kann anhand der etwas überraschenden Entdeckungen von SMUG1 und NEI1-3 auf eine solche Möglichkeit geschlossen werden.<sup>[65,69]</sup> Es ist wichtig zu erwähnen, dass SMUG1 mithilfe eines chemisch-biologischen Ansatzes isoliert worden ist, nämlich unter Verwendung eines Expressions-Klonierungs-Screens zur Identifizierung von Enzymen, die an generische synthetisch hergestellte DNA-Glycosylase-Inhibitoren binden.<sup>[69]</sup> Wegen der Redundanz von U-ausschneidenden Enzymen wäre die Entdeckung von SMUG1 durch traditionelle biochemische und genetische Ansätze wohl schwierig gewesen. Es ist gut vorstellbar, dass chemisch-biologische Ansätze wie der hier beschriebene zur Entdeckung weiterer DNA-Glycosylasen führen.

#### 4.2.2. Mechanismus und Inhibitoren von DNA-Glycosylasen

Es existieren zwei Arten von Mechanismen bei DNA-Glycosylasen.<sup>[70]</sup> Monofunktionale DNA-Glycosylasen einerseits benötigen ein Wassermolekül als Nucleophil, um die *N*-glycosidische Bindung zu spalten und eine abasische Stelle zu bilden (Schema 7a). Difunktionale Glycosylasen/AP-Lyasen andererseits nutzen eine Aminogruppe des Enzyms als Nucleophil zur intermediären Erzeugung einer Schiff-Base, die in einer basenkatalysierten  $\beta$ -Eliminierung unter Spaltung der C3-O-Bindung zwischen der abasischen Stelle und dem Zuckerphosphat reagiert (Schema 7b). OGG1, NTH1 und NEI1 sind die einzigen Glycosylasen von Säugern mit AP-Lyaseaktivität. Diese AP-Lyaseaktivität war für die Isolierung und Charakterisierung von OGG1 und NTH1 von großer Bedeutung. Das Schiff-Base-Intermediat **33** der Reaktion kann unter Bildung eines stabilen kovalenten Protein-DNA-Komplexes, **35**, zum Amin reduziert werden (Schema 7b). Die Komplexbildung ist hoch spezifisch und verläuft problemlos mit dem entsprechenden Substratoligonucleotid und einer DNA-Glycosylase in rohem Zellextrakt.<sup>[71,72]</sup>

Die durch DNA-Glycosylasen katalysierte Reaktion ist formal mit der Katalyse durch Glycosidasen oder Nucleosidhydrolasen verwandt,<sup>[73]</sup> und erste mechanistische Modelle stützten sich auf diese Analogie. Es wurde angenommen, dass die durch DNA-Glycosylasen katalysierte Reaktion über einen kombinierten  $S_N1/S_N2$ -Mechanismus verläuft und zur Anhäufung von positiver Ladung in der Ribose führt, die hauptsächlich an C1' und O1' lokalisiert ist. Ob der Übergangszustand der DNA-Glycosylase-katalysierten Reaktion eher einen dissoziativen oder assoziativen Charakter hat, wurde bislang nur für UDG näher untersucht (siehe unten).<sup>[74]</sup> Mit diesem Enzym scheint ein dissoziativer Mechanismus vorzuliegen. Auch ohne detaillierte Informationen über den Mechanismus sind Inhibitoren für DNA-Glycosylasen entwickelt worden. Als Ansatzpunkte dienten dabei die positive Ladung im Übergangszustand sowie der Befund, dass die meisten DNA-Glycosylasen durch ihre Produkte – die abasischen Stellen – inhibiert werden (Schema 7c).<sup>[9,10]</sup>

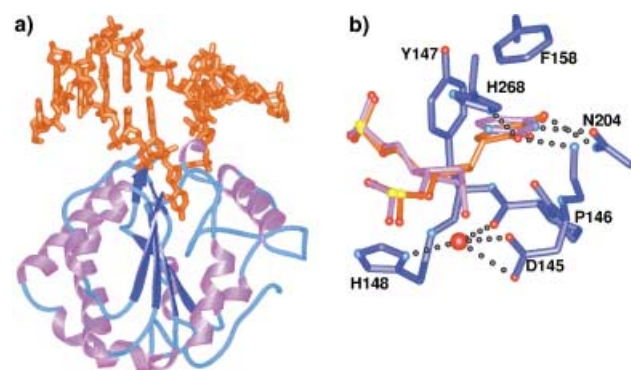
Die einfachsten DNA-Glycosylase-Inhibitoren sind stabile Derivate abasischer Stellen, z.B. **36** und **37**.<sup>[71,75,76]</sup> Ein zweiter Typ von Inhibitoren (z.B. **38–40**) wurde als Mimikry der positiven Ladung im Übergangszustand entwickelt.<sup>[69,76,77]</sup>

Zu diesem Zweck wurde der Sauerstoff im Ribosering mit einer positiv geladenen Ammoniumgruppe ersetzt. Ein dritter Typ von Inhibitoren (**41–43**) enthält stabilisierte glycosidische Bindungen, die durch Modifikation des Riboseringes oder der Base zugänglich sind und den Inhibitor resistent gegen DNA-Glycosylasen machen.<sup>[78]</sup> Diese Inhibitoren sind bei Strukturstudien an DNA-gebundenen DNA-Glycosylasen und der Isolierung neuer DNA-Glycosylasen außerordentlich nützlich gewesen.

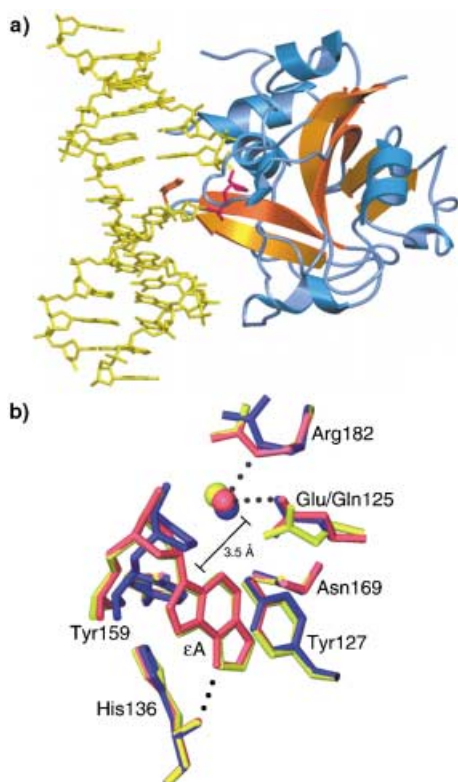
#### 4.2.3. Struktur- und Mechanismusstudien zu DNA-Glycosylasen

In den letzten Jahren konnte eine Vielzahl von hochauflösenden Kristallstrukturen von DNA-Glycosylasen im Komplex mit Substraten, Substratanaloga oder Produkten gelöst werden. Hinsichtlich der Erkennung von Schäden und katalytischen Prozessen sind die DNA-Glycosylasen die am besten untersuchten DNA-Reparaturenzyme. Eine Reihe aktueller Übersichten befasst sich mit dem Thema,<sup>[10,79]</sup> sodass sich die Diskussion struktureller und biochemischer Studien an dieser Stelle auf die drei Enzyme UDG, OGG1 und AAG beschränken soll. Die Untersuchung dieser drei Enzyme war besonders aufschlussreich bezüglich der mechanistischen Grundlagen dieses Enzymtyps.

DNA-Glycosylasen haben viele gemeinsame Merkmale: Alle Enzyme greifen auf einen Nucleotid-Flipping-Mechanismus zurück, durch den das Ziehnucleotid aus der DNA-Doppelhelix in die aktive Stelle des Enzyms, an der die Katalyse stattfindet, herausgeschwungen wird (Abbildung 2a, Abbildung 3a). Enzyme, die eine Reaktion an DNA katalysieren, erhalten durch Nucleotid-Flipping Zugang zu Bindungen, die in der großen und kleinen Furche der DNA verborgen sind und für enzymatische Katalysen unerreichbare Reaktionstrajektorien aufweisen.



**Abbildung 2.** Cokristallstruktur von UDG im Komplex mit einem nicht-hydrolysierbaren Substratanalogen: a) Gesamtstruktur von UDG im Komplex mit einem Desoxypseudouridin-haltigen Oligonucleotid. Das Ziehnucleotid ist aus der DNA-Doppelhelix in die aktive Stelle des Enzyms geschwungen (DNA orange, UDG blau ( $\beta$ -Faltblätter) und violett ( $\alpha$ -Helices)). b) Aktive Stelle von UDG mit der Uracil-Bindungstasche; die Strukturen des ungespaltenen Substrats (orange) und Produktkomplexes (violett) stammen aus zwei überlagerten Strukturen. Dargestellt sind die für die Katalyse wichtigen Aminosäuren (D145, H148, H268) und die Aminosäuren, die die Uracil-Bindungstasche aufbauen (Y147, F158, N204). Wiedergabe mit Genehmigung der National Academy of Sciences 2000.<sup>[86]</sup>



**Abbildung 3.** Strukturen von AAG im Komplex mit DNA: a) Übersicht über die Kristallstruktur von AAG im Komplex mit Pyrrolidin-inhibitorhaltiger DNA. AAG bindet in die kleine Furche von DNA und schiebt den Pyrrolidinrest (pink) ins aktive Zentrum des Enzyms. Tyr162 (orange) intercaliert in die Stelle, die durch das Herausbiegen des Nucleotids frei wird. (DNA gelb, Protein blau ( $\alpha$ -Helices und -Schleifen) und orange ( $\beta$ -Faltblätter)). Wiedergabe mit Genehmigung von Elsevier Science 2000.<sup>[91]</sup> b) Struktur der aktiven Stelle von AAG. Die Superposition der aktiven Stelle von Wildtyp-Pyrrolidin-DNA (blau), E125Q- $\epsilon$ A-DNA (gelb) und Wildtyp- $\epsilon$ A-DNA-Komplex (rot) verdeutlicht, dass die unterschiedlichen DNA-Substrate in ähnlichen Orientierungen gebunden werden. Das Wassermolekül zwischen Glu/Gln125 und dem anomenen Zentrum ist in allen drei Strukturen konserviert und dient in der Reaktion höchstwahrscheinlich als Nucleophil. Die Basenbindungstasche ist von aromatischen Resten (Tyr127, His136) umgeben. Das Amid im Rückgrat von His136 bildet eine Wasserstoffbrücke mit  $\epsilon$ A an N6 und ermöglicht so die Spezifität für A. Wiedergabe mit Genehmigung der National Academy of Sciences 2000.<sup>[92]</sup>

Das Prinzip des Nucleotid-Flipping ist zum ersten Mal beim Enzym DNA-Methyltransferase entdeckt worden;<sup>[80]</sup> in der Folge wurde herausgefunden, dass es von allen DNA-Glycosylasen angewendet wird. Das Heraus-schwingen des Zielnucleotids wird durch eine Rotation der angrenzenden Phosphodiesterbindungen ermöglicht und führt zu einer lokalen Verzerrung der DNA-Doppelhelix. Ein hydrophober oder aromatischer Rest wird üblicherweise in die DNA-Helix eingeführt und nimmt die Position der ausgelenkten Base ein.

Für UDG wird ein „Pinch-push-pull“-Mechanismus vorgeschlagen. Der erste Schritt ist dabei ein schnelles unspezifisches Abtasten des DNA-Rückgrates durch Komprimierung zweier benachbarter Phosphodiesterbindungen („Pinching“). Darauf folgt das Knicken des Rückgrates und Einführen einer Schleife mit dem hydrophoben Rest in die durch

Herausbeugen des Nucleotids in die große Furche entstandene Lücke („Pushing“). Abschließend wird die Uracil-Base in eine spezifische Bindungstasche eingeführt („Pulling“).<sup>[81]</sup> An der Bindung der beschädigten Basen in die aktive Stelle des Enzyms sind  $\pi$ -Stacking, hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken beteiligt. Interessanterweise haben einige DNA-Glycosylasen (z.B. UDG) eine hochspezifische Bindungstasche, andere wiederum weisen eine ausgesprochen breite Substratspezifität auf.<sup>[10]</sup> Die Reaktionsgeschwindigkeit mit bestimmten Glycosylasen wie OGG1 hängt darüber hinaus stark von der Base ab, die der Läsion gegenüberliegt.

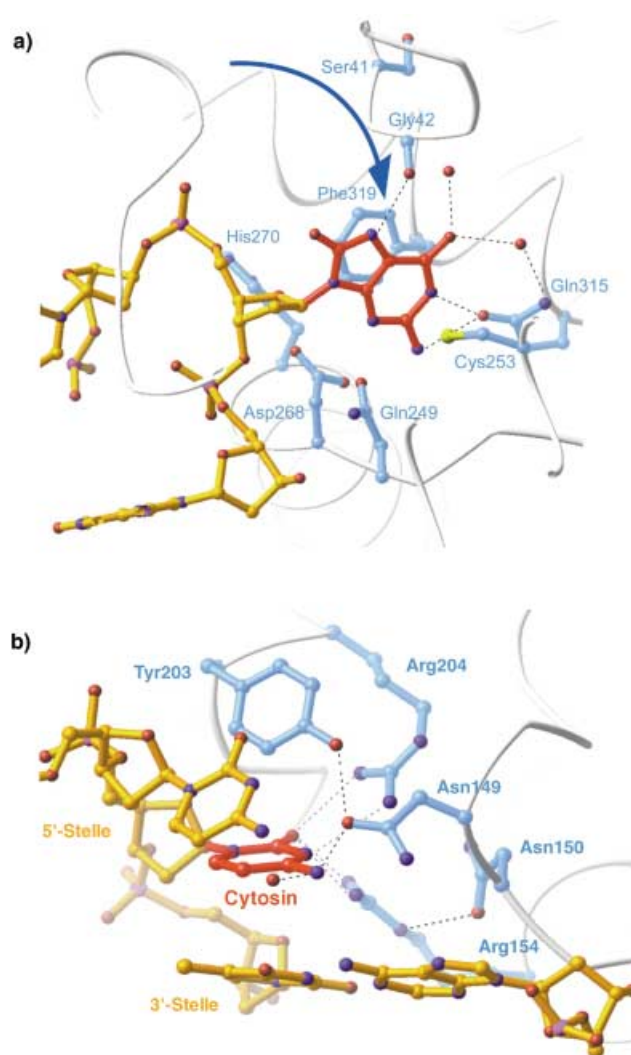
UDG ist nicht nur die spezifischste, sondern auch die effizienteste aller bekannten DNA-Glycosylasen. Sie beschleunigt die Umsetzung um einen Faktor von etwa  $10^{12}$  und ist somit um fünf Zehnerpotenzen effizienter als andere DNA-Glycosylasen.<sup>[12]</sup> Strukturelle und biochemische Studien mit UDG aus unterschiedlichen Organismen (Mensch, *E. coli*, Herpes-simplex-Virus) sind beschrieben, die hier in Bezug auf das menschliche Enzym diskutiert werden sollen. Nach frühen strukturellen Studien mit UDG im Komplex mit ihrem Produkt, der Base U, existiert eine enge Bindungstasche, die die Spezifität für U gegenüber den übrigen Basen gewährleistet.<sup>[82]</sup> Die Spezifität wird durch eine gegabelte Wasserstoffbrücke von Asn204 zu O4 und HN3 von U sichergestellt. Dieses strukturelle Spezifikum schließt die Bindung von Cytosin und Purinbasen aus, und die enge Packung der aromatischen Gruppe von Tyr147 und C5 lässt keinen Platz für die Methylgruppe von T (Abbildung 2b). In Übereinstimmung mit Strukturdaten kann der Tyr-147-Ala-Mutant von UDG T ausschneiden, und dazu analog kann der Asn-204-Asp-Mutant C entfernen.<sup>[83]</sup> Cokristallstrukturen von UDG-Mutanten, die an Produktkomplexe gebunden sind, und von Wildtyp-UDG, das an ein stabiles C-Nucleosidanalogon von U gebunden ist, bestätigen diese Befunde und belegten, dass Leu272 am Ersatz des beschädigten Nucleosids in der Doppelhelix maßgeblich beteiligt ist.<sup>[84–86]</sup> Mit dem Leu-272-Ala-Mutanten resultiert eine deutlich reduzierte Katalysegeschwindigkeit, die jedoch wieder auf das Niveau des Wildtyps angehoben werden kann, wenn eine sterisch anspruchsvolle Pyrenbase gegenüber von U positioniert wird, was zu einer extrahelicalen Präorganisation der Zielbase führt.<sup>[87]</sup> Die Cokristallstrukturen belegen sowohl eine Katalyse durch Asp145 (durch Aktivierung eines Wassermoleküls als Nucleophil zur Substitution der Base, Abbildung 2b) als auch eine Wechselwirkung zwischen His268 und O2 von U, die zur Aktivierung von U als Abgangsgruppe führt.<sup>[84,86]</sup>

UDG aus *E. coli* ist die einzige Glycosylase, die hinsichtlich mechanistischer Enzymologie eingehend untersucht worden ist. Kinetische Isotopeneffekte deuten bei UDG auf einen Übergangszustand mit dissoziativem Charakter hin, was auf ein Oxocarbeniumion als Zwischenprodukt schließen lässt.<sup>[74]</sup> Es wird interessant sein zu sehen, ob andere DNA-Glycosylasen ebenfalls einen Übergangszustand mit dissoziativem Charakter einnehmen. NMR- und Raman-Daten zufolge hat N1 von U im aktiven Zentrum von UDG einen stark herabgesetzten  $pK_s$ -Wert und kann somit in anionischer Form gut mit dem Carbeniumion im Übergangszustand wechselwirken.<sup>[88]</sup> Eine neutrale kurze Wasserstoffbrücke

zwischen His187 (His268 im menschlichen Enzym, Abbildung 2b) und O2 von U scheint entscheidend für die Bildung dieses Anions zu sein.<sup>[89]</sup> Der dissoziative Charakter des Übergangszustandes ist kürzlich durch Ab-initio-Rechnungen untermauert worden.<sup>[90]</sup> Diese Studien haben außerdem gezeigt, dass ein großer Teil der Stabilisierungsenergie des Übergangszustandes nicht vom Enzym zur Verfügung gestellt wird, sondern von einer Substratautokatalyse stammt, die auf der Wechselwirkung der negativ geladenen Phosphatgruppe mit dem Carbeniumion beruht. Die umfangreichen strukturellen, spektroskopischen und kinetischen Studien zu UDG haben zusammen mit der Synthese von Substratanaloga tiefgehende Einblicke in den Wirkungsmechanismus dieses effizienten Enzyms ermöglicht.

Eine auffallende Eigenschaft der AAG-DNA-Glycosylase ist ihre breite Spezifität, die Substrate wie 3-Methyladenin, 7-Methylguanin, Hypoxanthin und 1,*N*<sup>6</sup>-Etheno-adenin einschließt.<sup>[66]</sup> Es ist erstaunlich, dass so viele unterschiedliche Läsionen ohne augenscheinlich gemeinsames Strukturmotiv durch AAG spezifisch erkannt werden. Strukturen von AAG im Komplex mit DNA illustrieren, wie das Nucleotid-Flipping durch Einführung eines Tyrosinrests in die Position der ausgelenkten Base in der kleinen Furche erreicht wird (Abbildung 3a).<sup>[91,92]</sup> Die Struktur einer Mutante von AAG, die mit einem  $\epsilon$ A-Rest verknüpft ist, verdeutlicht, wie die beschädigte Base durch Basenstapelung mit aromatischen Resten im Protein bindet und wie eine spezifische Wasserstoffbrücke zwischen dem Amid der Hauptkette von His136 und der N6-Position die Bindung eines unmodifizierten A-Rests diskriminiert (Abbildung 3b).<sup>[92]</sup> Die Erkennung von Hypoxanthin und 3-Methyladenin kann anhand dieser Struktur erklärt werden, nicht aber die Spezifität für 7-Methylguanin. Daraus wird deutlich, dass die vollständige Aufklärung der Erkennung defekter Basen Strukturanalysen von DNA-Glycosylasen an unterschiedlichen Substraten sowie Analysen mit Mutanten erfordert. Einblicke in den Reaktionsmechanismus der katalytischen Hydrolyse der glycosidischen Bindung wurden anhand der Struktur eines „Active-Site“-Mutanten erhalten, der an das  $\epsilon$ A-Substrat bindet, sowie eines Wildtyp-AAG, das an einen Pyrrolidin-Inhibitor bindet (**35** in Schema 7).<sup>[91,92]</sup> In beiden Strukturen befindet sich ein Wassermolekül zwischen dem anomeren Kohlenstoffatom und dem für die Katalyse essenziellen Glu-125-Rest. Dieses Wassermolekül ist ideal positioniert, um die zu substituierende beschädigte Base durch einen Inline-Mechanismus zu ersetzen. Ob der Übergangszustand dieser Reaktion assoziativen oder dissoziativen Charakter hat, ist zurzeit noch offen.

Strukturen der DNA-gebundenen 8-Oxoguanin-DNA-Glycosylase OGG1 lieferten einen ersten Einblick in die Funktion einer difunktionalen Säuger-DNA-Glycosylase/AP-Lyase. Die Analyse zeigt, wie das Enzym die gegenüberliegende Base von 8-OxoG spezifisch erkennt. OGG1 fügt eine Schleife ein, die einen Asparaginrest zum Herausdrücken der Substratbase aus der DNA-Helix in die Bindungstasche des aktiven Zentrums trägt.<sup>[93]</sup> Die bevorzugte Bindung von 8-OxoG gegenüber G wird durch eine spezifische Wasserstoffbrücke zu NH7 sowie durch die Geometrie der Bindungstasche erreicht (Abbildung 4a). Die 8-OxoG gegen-



**Abbildung 4.** Erkennung von 8OxoG und damit gepaartem C durch OGG1 (hellblau: Proteinreste, rot: 8OxoG und C, gelb: übrige DNA): a) Kugel-Stab-Darstellung der aktiven Stelle des Enzyms; Cys253, Gln315 und Phe319 umgeben die Bindungstasche, und eine Wasserstoffbrücke von der Amidcarbonylgruppe von Gly42 zu H-N7 ist essenziell für die spezifische Erkennung von 8OxoG vor G. b) Die Erkennungstasche von abstrahiertem C: Die Watson-Crick-Seite von C wechselwirkt über spezifische Wasserstoffbrücken mit Arg154, Asn149 und Arg204, wodurch die Präferenz für C gegenüber anderen Basen entsteht. Wiedergabe mit Genehmigung von Cold Spring Laboratory Press 2000.<sup>[95]</sup>

überliegende Cytosinbase wird durch Wasserstoffbrücken von Asn149, Arg154 und Arg204 gebunden (Abbildung 4b). Diese Wechselwirkungen sind physiologisch relevant, weil das Herausschneiden einer anderen Base als C mutagen sein könnte (siehe Abschnitt 2.2.1). Interessanterweise wurde bei einer Krebszelllinie eine Mutation in OGG1 gefunden, die anstelle von Arg154 ein His trägt. Das daraus resultierende Enzym hat eine weitaus breitere Substratspezifität bezüglich der 8-OxoG gegenüberliegenden Base und könnte daher eher zur Mutagenese als zur Reparatur beitragen.

Die Beispiele von UDG, AAG und OGG1 illustrieren, wie weit fortgeschritten das Verständnis der molekularen Erkennung beschädigter Basen durch DNA-Glycosylasen ist.



Zahlreiche Punkte und Details bleiben jedoch noch offen. Beispielsweise ist nicht verstanden, wie die beschädigten Basen noch vor dem Herausbiegen aus der DNA in die aktive Bindungstasche spezifisch erkannt werden. Wird jede Base einzeln aus der DNA-Helix in einem fortlaufenden Prozess herausgebogen oder werden spezifische Merkmale von beschädigten Basenpaaren in dsDNA erkannt?<sup>[94,95]</sup> Fortschritte diesbezüglich erbrachten Studien zur Bindung von beschädigten (8-OxoG) und unbeschädigten Stellen in DNA mit OGG1 durch kraftmikroskopische Einzelmolekül-Abbildung.<sup>[96]</sup> Diesen Untersuchungen zufolge biegt OGG1 die DNA an der beschädigten Stelle, was im Einklang mit der Röntgenkristallstruktur von DNA-gebundenem OGG1 ist. An unbeschädigten Stellen bindet OGG1 entweder ohne Biegung oder mit einem Neigungswinkel, wie sie bei der Bindung von OGG1 an beschädigten Stellen festgestellt wurden. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass OGG1 in einem zweistufigen Prozess nach Schäden sucht. Demgemäß wechselwirken die DNA-Glycosylasen zunächst schwach mit DNA; in einem zweiten Schritt werden unbeschädigte Stellen durch einen strukturellen Übergang in die aktive Bindungstasche gebracht, wo sie auf ihre strukturelle Integrität abgetastet und nur dann ausgeschnitten werden, wenn sie als Substrat erkennbar sind. Dieser Zweiphasenmodus der Schadenssuche ist in Einklang mit kinetischen Messungen des Nucleotid-Flipping von UDG.<sup>[97]</sup> Mit zukünftigen Entwicklungen bei der Kraftmikroskopie in Lösung oder der Einzelmolekülfluoreszenzmessung könnten sich neue Möglichkeiten für die Untersuchung dieses faszinierenden Mechanismus ergeben.

#### 4.3. Biologische Bedeutung von BER-Defekten

Im Gegensatz zu NER- und MMR-Defekten konnten mangelhafte BER-Enzyme beim Menschen bislang nicht beobachtet werden.<sup>[214]</sup> Daraus kann gefolgert werden, dass BER-Defekte entweder letal sind oder aber keinerlei schwerwiegende Konsequenzen haben, sodass ein Defekt in einem entsprechenden Gen unbemerkt bleiben würde. Da BER gegen DNA-Läsionen wirksam ist, die aus dem normalen zellulären Metabolismus stammen, kann davon ausgegangen werden, dass BER ein essenzieller Prozess ist. Das erste Knock-out-Mausmodell mit defekten BER-Proteinen enthielt Enzyme, die stromabwärts zu den DNA-Glycosylasen angesiedelt sind (APE-1, Pol $\beta$  und XRCC1). Alle Mäuse, denen diese Gene fehlen, sterben bereits im embryonalen Stadium, was auf ihre essenzielle Funktion für Säuger hindeutet.<sup>[98]</sup> Hingegen wurde überraschenderweise erkannt, dass Mäuse mit Defekten in den DNA-Glycosylasen AAG, OGG1, UDG, NTH1 und MYH keine phänotypischen Abnormalitäten und keine signifikant erhöhte spontane Carcinogeneserate aufweisen.<sup>[99–101]</sup> Dieser Befund kann auf dreierlei Weise interpretiert werden: 1) Ein Defekt in einer einzelnen DNA-Glycosylase muss nicht zwangsläufig massive Auswirkungen auf den Organismus haben, währenddessen die Anhäufung von abasischen Stellen aus den acht bekannten DNA-Glycosylasen schwerwiegende Konsequenzen mit sich bringt. 2) Als kritische Läsionen, die bei Mäusen mit

defizienten Enzymen stromabwärts zu den DNA-Glycosylasen auftreten, wirken möglicherweise nicht die beschädigten Basen, sondern die abasischen Stellen, die spontan durch Depurinierung entstehen. 3) Vermutlich existieren Reserve-Reparaturpfade für Läsionen, die im Normalfall durch DNA-Glycosylasen repariert werden. Solche Reservefunktionen könnten von anderen DNA-Glycosylasen, analog zu den vier auf Uracil einwirkenden DNA-Glycosylasen, übernommen werden. Eine alternative Möglichkeit wäre die Reparatur des Schadens durch einen anderen Pfad (z.B. Reparatur oxidativer Schäden durch NER, siehe Abschnitt 5). An dieser Stelle soll erwähnt werden, dass UNG(–/–)-Mäuse einen höheren Anteil an U in ihrem Genom aufweisen als der Wildtyp, ohne dass dies augenscheinliche Folgen hätte.<sup>[100]</sup> Mausmodelle mit Defekten in mehreren DNA-Glycosylasen oder DNA-Reparaturpfaden könnten zur Aufklärung dieser Fragen hilfreich sein.

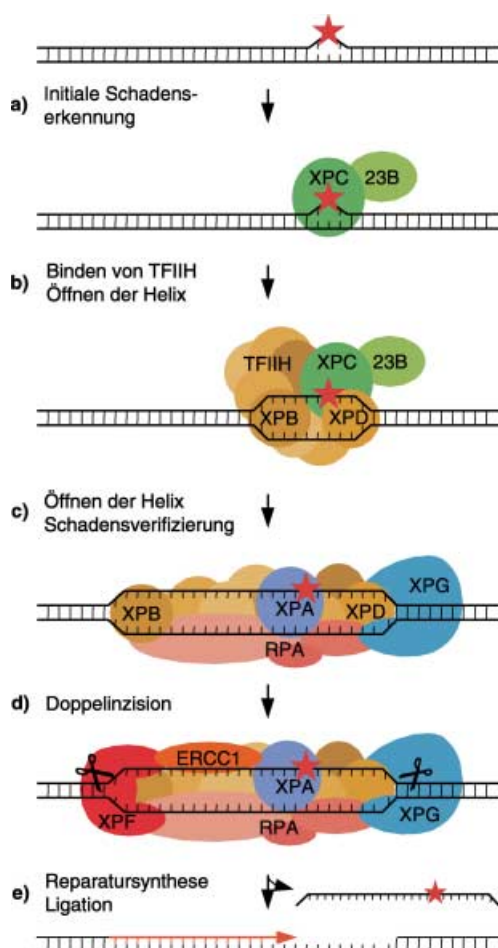
## 5. Nucleotidexzisionsreparatur

### 5.1. Überblick

Durch Nucleotidexzisionsreparatur werden sterisch anspruchsvolle Basenaddukte, die durch UV-Licht, Umweltmutagene und Chemotherapeutika verursacht werden, aus der DNA entfernt.<sup>[29]</sup> Obwohl die hauptsächliche Funktion von NER in der Reparatur UV-geschädigter DNA besteht, zeichnet sich der Prozess durch eine bemerkenswert breite Substratspezifität aus. NER wird demzufolge vom Organismus genutzt, um sich vor den Folgen von Agentien mit unerwarteten DNA-schädigenden Wirkungen zu schützen. Die Effizienz, mit der ein Schaden repariert wird, kann über mehrere Größenordnungen variieren, und es scheint, dass eine Korrelation zwischen der Reparatureffizienz und dem Ausmaß der helicalen Störung durch eine Läsion besteht.<sup>[102]</sup> Einfache Fehlpaarungen oder Blasen sind keine Substrate für NER, was zeigt, dass eine Deformation des DNA-Rückgrates alleine nicht ausreicht, um als Substrat für NER infrage zu kommen. Daher wurde ein zweistufiges Modell der Substraterkennung vorgeschlagen, das die anfängliche Erkennung einer helicalen Verzerrung und die darauf folgende Lokalisierung und Verifizierung der chemisch modifizierten Base einschließt. Der Gesamtprozess führt zur Entfernung des geschädigten Oligonucleotids.<sup>[103]</sup> Die Kernreaktion bei NER wurde mit gereinigten Proteinen rekonstituiert, was beachtenswerte Fortschritte im Verständnis der biochemischen Basis dieses Reparaturpfades gebracht hat.<sup>[104]</sup> NER umfasst die Erkennung des beschädigten Rests, die Bildung einer Blase, Doppelinzision des beschädigten DNA-Stranges in 5'- und 3'-Position zur Läsion, das Ausschneiden eines Oligonucleotids aus 24 bis 32 Nucleotiden sowie die Reparatursynthese und Ligation der resultierenden Lücke (Schema 8).

Etwa 30 Proteine sind an der NER beteiligt: XPC-hHR23B, die neun Untereinheiten von TFIIH, XPA, das einzelstrangbindende trimere Protein RPA und XPG (die alle bei der Schadenserkenkung und Blasenbildung eine Rolle spielen), die beiden Endonucleasen XPG und ERCC1-XPB (die in 3'- bzw. 5'-Position zur Läsion inzidieren), die Poly-





**Schema 8.** Nucleotidexzisionsreparatur: a) Eine DNA-Läsion, die eine helicale Verzerrung (roter Stern) verursacht, wird zunächst von XPC/hHR23B erkannt. b) XPC/hHR23B rekrutiert TFIIH zur Läsion, dessen Helicaseuntereinheiten, XPB und XPD, maßgeblich an der partiellen Öffnung der DNA an der Läsion beteiligt sind. c) TFIIH rekrutiert XPG und XPA/RPA zur Läsion, die die weitere Öffnung der DNA bis zu einer Blase von ca. 25 Basenpaaren bewirken. XPC ist zu diesem Zeitpunkt wahrscheinlich nicht mehr Teil des Komplexes. d) XPA und RPA überprüfen den Schaden und gewährleisten die richtige Positionierung der beiden Endonucleasen XPG und ERCC1/XPF. XPG schneidet in 3'- und ERCC1/XPF in 5'-Position zum Schaden, und ein Oligonucleotid aus 25 bis 32 Nucleotiden wird freigegeben. e) Die Replikationsmaschinerie füllt die Lücke, und die DNA-Ligase I verschließt den Nick.

merasen Pol $\delta$  und Pol $\epsilon$ , die gleitende Klammer PCNA, der pentamere Klammerlader RFC und die DNA-Ligase I, die in der Reparatursynthese und im Ligationsschritt eingreifen. Es wurde nachgewiesen, dass noch weitere Faktoren beitragen, die jedoch für die Kernreaktion *in vitro* nicht erforderlich sind. Der im vorigen Absatz beschriebene Reparaturpfad bezieht sich auf die Reparatur von nichttranskribierter DNA, die den Großteil der genomischen DNA ausmacht. Dieser Pfad wird auch als globale Genomreparatur (GGR) bezeichnet. Bei aktiv transkribierten Genen werden Schäden im transkribierten Strang durch einen speziellen NER-Pfad effizienter repariert (bezeichnet als transkriptionsgekoppelte Reparatur (TCR)).<sup>[105]</sup> Die TCR wurde anhand der Beobachtung identifiziert, dass Läsionen, die RNA-Polymerasen blockieren können, in aktiv transkribierten Regionen des

Genoms schneller repariert werden.<sup>[106]</sup> TCR ist ein wichtiger Mechanismus, der die effiziente Reparatur von Läsionen in aktiven Regionen des Genoms gewährleistet. Mit Ausnahme von XPC-hHR23B werden alle Gene, die an der NER beteiligt sind, auch für die TCR benötigt. Darüber hinaus greift die TCR auf zusätzliche Gene zurück, z. B. auf CSA und CSB, die in der globalen Genreparatur nicht erforderlich sind. Während die Doppelinzisions- und Reparaturschritte der TCR vermutlich denen der GGR gleichen, erfolgt die initiale Schadenserkennung bei TCR durch eine blockierte RNA-Polymerase. Die genauen biochemischen Vorgänge bei der Schadenserkennung sind jedoch noch nicht bekannt.

## 5.2. Mechanismus der Schadenserkennung und Inzision bei Nucleotidexzisionsreparatur

Der Mechanismus der Schadenserkennung durch GGR wurde in den letzten zehn Jahren oft kontrovers diskutiert.<sup>[107]</sup> Der Grund war, dass keiner der NER-Faktoren eine überzeugend hohe Spezifität für beschädigte DNA aufweist, um eine Läsion eindeutig erkennen zu können. XPA, XPC, TFIIH und RPA haben nur eine mäßige Spezifität für beschädigte DNA gegenüber unbeschädigter DNA, die auf den ersten Blick als unzureichend erscheint, um beschädigte Reste in dem immensen Hintergrund unmodifizierter DNA zu lokalisieren. Hochauflösende Strukturaufklärung von XPA und RPA sowie Strukturdaten niedriger Auflösung von TFIIH haben bislang keine konkreten Informationen darüber geliefert, wie diese Proteine eine Selektivität gegen beschädigte DNA ausdrücken können.<sup>[108]</sup> Konkurrenzexperimente zur Bestimmung der Reihenfolge, in der NER-Proteine mit beschädigter DNA wechselwirken, und andere Experimente, mit denen die Voraussetzungen für das Öffnen der DNA-Helix durch NER untersucht wurden, deuten an, dass XPC-hHR23B das erste Protein ist, das den Schaden erkennt.<sup>[109,110]</sup> Andere Studien stellen diese Hypothese infrage und sprechen vielmehr dafür, dass XPA, zusammen mit RPA, als initialer Erkennungsfaktor wirkt.<sup>[111,112]</sup> Kürzlich ausgeführte Experimente zur Bestimmung der Reihenfolge der Gruppierung von NER-Proteinen in lebenden Zellen haben jedoch die Hypothese von XPC als initialem Erkennungsfaktor bekräftigt. In einer solchen Studie wurden in einer Zelle durch räumlich begrenzte UV-Bestrahlung lokale Schäden an der DNA erzeugt.<sup>[113]</sup> Nach UV-Bestrahlung und Fixierung der Zellen ergaben Untersuchungen mithilfe monoklonaler Antikörper gegen UV-beschädigte DNA und NER-Proteine, dass diese in den bestrahlten Kompartimenten der Zellen akkumuliert waren. Bei einem analogen Experiment mit Zellen, die die verschiedenen NER-Faktoren nicht exprimieren können, wurde festgestellt, dass die Gegenwart von XPC für die Akkumulierung aller anderen Proteine notwendig ist und die Gegenwart von XPB (einer Untereinheit von TFIIH) für die Akkumulierung aller Proteine außer XPC. Die Lokalisierung von XPF-ERCC1 erfordert zusätzlich die Gegenwart von XPA, während XPG die Gegenwart von TFIIH, nicht aber von XPA verlangt. Diese *In-vivo*-Studie ist in Übereinstimmung mit dem in Schema 8 dargestellten NER-Modell und wird durch Ergebnisse biochemischer Untersuchungen unter-

mauert. XPC-hHR23B bindet die beschädigte DNA und rekrutiert TFIIF zur beschädigten Stelle.<sup>[109,110,114]</sup> Die Helicase-Untereinheiten von TFIIF, XPB und XPD vermitteln eine partielle Entwindung der DNA in der Umgebung des Schadens; weitere Entwindung sowie die Rekrutierung von XPA, RPA und XPG ergeben eine vollständig geöffnete Struktur.<sup>[110]</sup> Es wurde nachgewiesen, dass TFIIF mit XPG und XPA wechselwirkt und demnach mit großer Wahrscheinlichkeit für die Rekrutierung der beiden Proteine zum Ort der Läsion maßgeblich ist.<sup>[115]</sup> Interessanterweise scheint XPC-hHR23B nicht mehr Bestandteil des NER-Präinizationskomplexes zu sein, sobald XPG gebunden ist; es ist anzunehmen, dass in dieser Phase XPA an die Läsion gebunden wird.<sup>[111,116]</sup> XPA seinerseits wechselwirkt mit RPA und ERCC1-XPF und vervollständigt dadurch den NER-Komplex.<sup>[117]</sup> XPA und RPA scheinen eine besondere Rolle in der Schadensverifizierung und in der korrekten Positionierung der beiden Endonucleasen XPG und XPF-ERCC1 vor der Inzision zu spielen.<sup>[116,118]</sup> Die Inzision auf der 3'-Seite der Läsion wird anschließend durch XPG sichergestellt. Die Inzision auf der 5'-Seite durch XPF-ERCC1 benötigt die strukturelle Präsenz, nicht aber die katalytische Aktivität von XPG.<sup>[119–121]</sup> XPG ist Mitglied der FEN-1-Familie von strukturspezifischen Nucleasen und weist Nucleaseaktivität gegen Substrate mit ss/dsDNA-Übergängen mit einem 5'-ssDNA-Überhang auf.<sup>[120,122]</sup> XPF-ERCC1 hat eine gegenüber XPG inverse Polarität und schneidet 3'-ssDNA-Überhänge an ss/ds-Übergängen.<sup>[119,123]</sup> Die XPF-Untereinheit des Heterodimers enthält ein konserviertes Nucleasemotiv, das für die Katalyse der Inzision ausschlaggebend ist.<sup>[124]</sup> Ob ERCC1 eine Funktion hat, die über die Stabilisierung von XPF und die Gewährleistung einer Verbindung zur NER-Maschinerie durch Wechselwirkung mit XPA hinausgeht, ist zurzeit unbekannt.

Einige weitere Faktoren wurden mit NER in Verbindung gebracht, die allerdings nicht für die Kernreaktion *in vitro* erforderlich sind. Der prominenteste ist DDB („Damaged-DNA-binding Protein“), ein Heterodimer aus den Proteinen p125 (DDB1) und p48 (DDB2; fehlt in XPE-Zellen). Die Rolle von DDB war lange Zeit unklar, neuere Daten stützen jedoch die Theorie, dass es für die Reparatur bestimmter Läsionen erforderlich ist. Es wurde gezeigt, dass XPE in lebenden Zellen mit UV-geschädigten Stellen colokalisiert und spezifisch die Entfernung von Cyclobutandimeren, nicht aber von (6-4)-Photoprodukten stimulieren kann.<sup>[125]</sup> Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Reparatur bestimmter Läsionen über die Kernfaktoren von NER hinaus zusätzliche Proteine erfordert. Daneben wurde dargelegt, dass stark helixverformende Läsionen auch in Abwesenheit von XPC repariert werden können.<sup>[126]</sup>

Neueste Forschungen im Bereich von NER widmen sich der Entwicklung von Ansätzen zur Beobachtung von NER-Reaktionen in lebenden Zellen. Hierbei werden NER-Proteine mit einem kovalent gebundenen grün fluoreszierenden Protein (GFP) in Zellen exprimiert, die das entsprechende Wildtyp-NER-Protein nicht exprimieren können. Überraschenderweise beeinträchtigt das gebundene 30 kDa große GFP die Wirkung des nativen Proteins zumeist nur unmerklich. Die Mobilität des NER-GFP-gekoppelten Proteins kann in Echtzeit *in vivo* durch hochentwickelte fluoreszenzmikro-

skopische Techniken wie FRAP („Fluorescence Redistribution After Photobleaching“) beobachtet werden. Die Studien haben gezeigt, dass NER-Proteine zunächst ungehindert durch den Zellkern diffundieren, durch UV-Bestrahlung jedoch vorübergehend immobilisiert und nach Reparatur des Schadens wieder freigegeben werden.<sup>[127]</sup> Es ist davon auszugehen, dass weitergehende Entwicklungen solcher Ansätze, die die detaillierte Beobachtung von NER-Reaktionen *in vivo* ermöglichen, zu einer verbesserten Validierung biochemischer *In-vitro*-Experimente führen.

### 5.3. Biologische Bedeutung der NER

Drei seltene autosomal rezessive Krankheiten hängen unmittelbar mit jeweils einem NER-Defekt zusammen: Xeroderma Pigmentosum (XP), das Cockayne-Syndrom (CS) und die Trichothiodystrophie (TTD).<sup>[128–130]</sup> Die drei Krankheiten weisen pleiotrope Phänotypen auf und manifestieren sich in einer extremen Sensitivität gegen Sonnenlicht. XP-Patienten haben einen partiellen oder totalen Defekt in der GGR und, mit der Ausnahme von XPC- und XPE-Patienten, auch in TCR, während CS- und TTD-Patienten nur in der transkriptionsgekoppelten Reparatur (TCR) defizient sind. XP-Patienten zeigen Symptome wie eine mehr als tausendfach erhöhte Prädisposition für Hautkrebs und eine fortlaufende degenerative Veränderung von Haut und Augen, die mit einem Defekt im Reparaturpfad für UV-induzierte DNA-Läsionen korreliert werden können. Diese Symptome, die auf die Sensitivität gegen UV-Licht zurückgeführt werden können, sind in einigen Fällen von neurologischen Abnormalitäten begleitet, die allerdings nur bei Patienten mit schwerwiegenden NER-Defekten auftreten und einer Anhäufung einer speziellen Form oxidativer Schäden in Neuronen zugeschrieben werden.

CS-Patienten hingegen zeigen neben der außerordentlichen Lichtsensitivität keine Symptome, die auf den ersten Blick von einem Defekt in einem DNA-Reparaturpfad stammen könnten. Beispielsweise haben CSB-Patienten keine eindeutige Prädisposition für Krebs, was bedeutet, dass sie nicht im gleichen Umfang Schäden akkumulieren, die zu Mutationen führen können, wie dies bei XP-Patienten der Fall ist. Viele andere Symptome von CS-Patienten lassen sich schwerlich durch einen TCR-Defekt allein erklären, zumal GGR- und TCR-defiziente XP-Patienten solche Symptome nicht aufweisen. Die Symptome umfassen schwerwiegende neurologische Abnormalitäten, Kleinwüchsigkeit, Schnabelnase, Zahnverfall und Katarakte. Die durchschnittliche Lebenserwartung von CS-Patienten liegt bei 12,5 Jahren. Es wurde vorgeschlagen, dass CSA und CSB eine allgemeine Rolle bei der Transkription spielen und einige der Merkmale von CS durch einen partiellen Defekt in der Transkription hervorgerufen werden.<sup>[131]</sup> Zudem sind CSB-Zellen defizient in der kürzlich entdeckten transkriptionsgekoppelten Basenexzisionsreparatur (TC-BER) oxidativer Schäden. Der Prozess ist noch nicht vollständig verstanden, aber in Analogie zur transkriptionsgekoppelten NER dürfte die BER-Maschinerie in erster Linie an der Entfernung von oxidativen Läsionen in transkribierten Genen beteiligt sein. Wie BER-

Enzyme in transkribierten Genen an den Ort des Schadens geführt werden, ist nicht bekannt; beteiligt an dem Prozess sind CSB, TFIID und XPG, andere NER-Faktoren dagegen nicht.<sup>[22,132]</sup> Es ist außerdem unklar, in welchem Ausmaß TC-BER zu den Symptomen von CS beiträgt.

TTD-Patienten weisen viele der Symptome von CS-Patienten auf, zeigen aber zusätzlich Merkmale wie Schwefeldefizientes, brüchiges Haar und Abschuppen der Haut. Die Symptome von TTD wurden herabgesetzten TFIID-Konzentrationen zugeschrieben. NER (sowohl GGR als auch TCR) scheint höhere Konzentrationen an TFIID zu benötigen als die Transkription, was gegen einen starken Einfluss eines Transkriptionsdefektes bei TTD-Patienten spricht. Niedrige Konzentrationen an TFIID könnten hingegen ein geschwindigkeitsbestimmender Faktor bei der Transkription einiger Gene sein und so die eigentümlichen Symptome von TTD-Patienten erklären.<sup>[130,133]</sup> Ein ungewöhnliches Symptom wurde jüngst bei einer Teilgruppe von TTD-Patienten beobachtet: Während Fieberschüben verloren diese Patienten ihre Haare und ihre Gesamtverfassung verschlechterte sich zusehends, nach Abklingen des Fiebers jedoch erholten sie sich vollständig. Einer Untersuchung zufolge enthielten die Zellen eine XPD-Mutation, die den TFIID temperatursensitiv macht.<sup>[134]</sup> Dies ist ein seltenes Beispiel eines Allels, das beim Menschen in einem temperatursensitiven Phänotyp resultiert; solche Allele werden ansonsten häufig in niederen Organismen gefunden (oder absichtlich erzeugt).

Die Bedeutung von XP, CS und TTD (zusammen mit UVsensitiven Hamsterzellen mit NER-Defekten) bei der Aufklärung der NER kann nicht genügend betont werden. Zellen mit Mutationen nahezu aller NER-Gene, die Kenntnis der damit verbundenen Phänotypen und die Erstellung von Komplementationsgruppen und Assays, um das Funktionieren von NER in lebenden Zellen zu testen, bilden die Grundlage leistungsfähiger Methoden zum Studium von NER und TCR.<sup>[128]</sup> Im Gegenzug ist es bemerkenswert, dass die komplexen Phänotypen von XP, CS und TTD jeweils einem spezifischen Ereignis in einem biochemischen Pfad oder spezifischen Mutationen in einem Gen zugeordnet werden können.

Mausmodelle mit defekten NER-Genen wurden entwickelt, die in den meisten Fällen den entsprechenden Phänotyp der menschlichen Patienten widerspiegeln.<sup>[101,129]</sup> In einigen Fällen konnten damit sogar zusätzliche Informationen über die physiologische Funktion der NER erhalten werden. Zum Beispiel wurde ein Defekt in ERCC1 bislang beim Menschen nicht gefunden, und Patienten mit Mutationen in XPF weisen meist einen sehr milden Phänotyp auf. Bei ERCC1-Mäusen zeigte sich ein deutlich stärker ausgeprägter Phänotyp als bei Mäusen mit einem klassischen XP-Phänotyp;<sup>[135]</sup> sie starben je nach genetischem Hintergrund im Uterus oder einige Monate nach der Geburt. ERCC1(–/–)-Mäuse sind kleiner als ihre Wildtyp-Geschwister, leiden an Leber- und Nierenabnormalitäten und zeigen zelluläre Seneszenz, die zu vorzeitiger Alterung führt.

Gemäß vorheriger Studien in Hefe- und Hamsterzellen sind ERCC1 und XPF an der homologen Rekombination und der Reparatur von Interstrang-Crosslinks beteiligt. Defekte in diesen zusätzlichen Funktionen von ERCC1 abseits von

NER tragen somit zu den oben beschriebenen Phänotypen bei. Der milde Phänotyp von menschlichen XPF-Patienten ist möglicherweise einer Restaktivität von spezifischen XPF-Mutationen zuzuschreiben.

## 6. Fehlpaarungsreparatur

### 6.1. Überblick

Die DNA-Replikation ist ein hochkomplexer und präziser Prozess mit einer Gesamtfehlerrate von nur 1 zu  $10^{10}$ .<sup>[136]</sup> Replikative Polymerasen fügen ungefähr 1 fehlerhaftes Nucleotid pro  $10^5$  Nucleotide ein, und die mit der Polymerase assoziierte 3'→5'-Proofreading-Aktivität reduziert diese Fehlerrate weiter um den Faktor 100, indem fehlgepaarte Nucleotide entfernt werden, bevor der DNA-Strang durch die Polymerase verlängert wird. Der verbleibende Faktor von  $10^3$  wird durch Fehlpaarungsreparatur (MMR; „Mismatch Repair“) bekämpft, die Basen-Basen-Fehlpaarungen und von Polymerasen eingefügte Nucleotid-Deletionen und -Insertionen eliminiert. Im Wesentlichen ist das MMR-System von Bakterien bis hin zum Menschen konserviert, auch wenn es wichtige Unterschiede zwischen den Organismen gibt. MMR ist einzigartig unter den DNA-Reparaturpfaden, denn MMR-Enzyme müssen eine der zwei chemisch unveränderten, aber fehlgepaarten Basen als Urheber der entstandenen Fehlpaarung erkennen. Die unterschiedliche Art der Strangdiskriminierung ist einer der zentralen Unterschiede der MMR-Systeme in Prokaryoten und Eukaryoten. In *E. coli* z. B. beruht die Diskriminierung auf der Methylierung von spezifischen Sequenzen in der genomischen DNA.<sup>[137,138]</sup> Unmittelbar nach der Replikation sind nur die Elternstränge, nicht aber die Tochterstränge methyliert, und der MMR-Prozess läuft vor der Methylierung der Tochterstränge unter Beteiligung von Methyltransferaseenzymen ab. Die MMR-Maschinerie nutzt den halbmethylierten Status der DNA zur Diskriminierung zwischen dem ursprünglichen Templatstrang und dem neu synthetisierten Strang. In dieser Situation ist der nichtmethylierte Strang definitionsgemäß derjenige, der die fehlerhafte Information trägt; die Exzision findet immer in diesem Strang statt. Bei Eukaryoten kann der Diskriminierungsmechanismus nicht über Methylierung erfolgen, sodass die Ursache der Strangunterscheidung durch das MMR-System bislang nicht bekannt ist. Gängigen Modellen zufolge ist die MMR-Maschinerie eng mit dem Replikationsapparat gekoppelt, was vermutlich zur Identifizierung des neu synthetisierten Stranges mithilfe eines Replikationsgedächtnisses genutzt wird.<sup>[139]</sup>

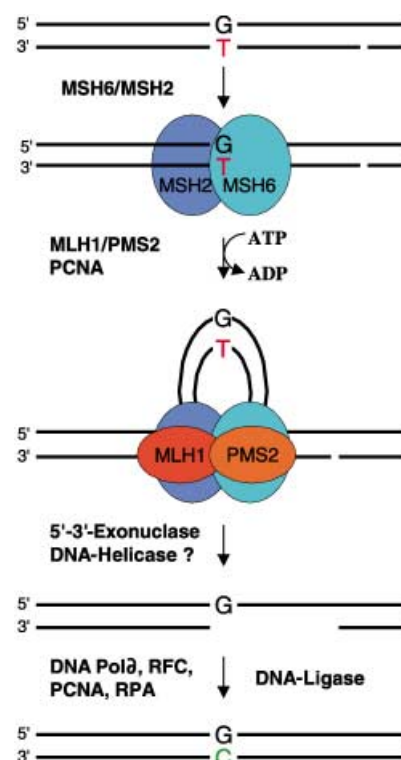
Ein Großteil unserer Informationen zum MMR-System wurde erstmalig durch Studien an Bakterien erhalten, und Ähnlichkeiten oder Unterschiede zu höheren Systemen wurden nachfolgend aufgeklärt. Die grundlegenden Merkmale von MMR wurden in vitro mit gereinigten Proteinen aus *E. coli* untermauert.<sup>[137,138,140]</sup> Der Initiator im MMR-System ist das MutS-Homodimer, das an Fehlpaarungen sowie Insertions-Deletions-Blasen bindet. Die Affinität von MutS für eine bestimmte Fehlpaarung oder Blase ist ungefähr proportional zur Gesamtreparaturrate.<sup>[141]</sup> Nach der Bindung löst

MutS die ATP-abhängige Gruppierung des „Repairosons“ aus. Während der Gruppierung wird es von der Fehlpaarungsstelle entfernt, und das MutL-Homodimer wird rekrutiert. Es wird angenommen, dass MutL als Bindeglied zwischen MutL und MutH dient und beim Auffinden einer halb methylierten GATC-Stelle den neu synthetisierten Strang auf der 5'-Seite der nicht methylierten GATC-Sequenz einschneidet. Dieser Schnitt dient als Eingangspunkt für die Helicase II (UvrD) und eine der Endonucleasen (Exo VII, RecJ oder Exo I), die den eingeschnittenen Strang über die Fehlpaarungsstelle hinaus abbaut.<sup>[142]</sup> Die so entstandene ssDNA wird vom einzelstrangbindenden Protein (SSB) geschützt. Die Lücke wird durch die DNA-Polymerase III gefüllt, während die DNA-Ligase den Nick repariert.

In Übereinstimmung mit den verschiedenartigen Mechanismen der Strangdiskriminierung wurden bislang keine MutH-Homologe in Eukaryoten gefunden. Dagegen sind jeweils drei Homologe von MutS (MSH2, MSH3 und MSH6) und MutL (MLH1, MLH3 und PMS2) an der eukaryotischen MMR beteiligt (PMS = „Post Meiotic Segregation“; so benannt nach dem Phänotypen eines Hefestamms).<sup>[143]</sup> Das homodimere MutS initiiert die bakterielle MMR und eines der beiden Heterodimere, MutS $\alpha$  (bestehend aus MSH2 und MSH6) oder MutS $\beta$  (bestehend aus MSH3 und MSH6), die eukaryotische MMR (Schema 9).<sup>[139,144]</sup> MutS $\alpha$  bindet an einzelne Fehlpaarungen und an kleine Insertions-Deletions-Blasen, während MutS $\beta$  ausschließlich an Insertions-Deletions-Blasen unterschiedlicher Größe bindet.<sup>[145]</sup> Ähnlich wie im bakteriellen System löst MutS die Gruppierung der MMR-Maschinerie aus. Die ATPase-Aktivität von MutS ist in diesem Prozess entscheidend, wobei ihre genaue Rolle kontrovers diskutiert wird.<sup>[146]</sup> Eine Konformationsänderung von MutS $\alpha$  überführt das Heterodimer in eine gleitende Klammer, die sich entlang der DNA von der Fehlpaarungsstelle weg bewegt. Zur Gruppierung des MMR-Repairosons werden benötigt: MLH1/PMS2 (MutL $\alpha$ ) bei MMR-Initiierung durch MutS $\alpha$  und MLH1/PMS2 (MutL $\alpha$ ) oder MLH1/MLH3 (MutL $\beta$ ) bei Initiierung durch MutS $\beta$ . Es wird angenommen, dass in Analogie zur bakteriellen MMR eine  $\alpha$ - oder  $\Omega$ -Schleife gebildet wird (Schema 9), bei der MutS- und MutL-Proteine an der Basis der Schleife und die Fehlpaarung in der Schleife angeordnet sind.<sup>[147]</sup> Die nachfolgenden Schritte umfassen den Abbau des fehlerhaften Strangabschnitts durch Exonucleasen und – vielleicht – Helicasen. Exo I spielt erwiesenermaßen eine Rolle im MMR-Prozess, weitere Nucleasen oder Helicasen konnten bislang jedoch nicht identifiziert werden.<sup>[148]</sup> Die Reparatursynthese wird von der Replikationsmaschinerie ausgeführt. Die direkte Kopplung der Replikationsmaschinerie mit dem MMR-System wird durch PCNA, den Prozessivitätsfaktor in der Replikation, sichergestellt. Es wurde zudem gezeigt, dass PCNA mit den eukaryotischen MutS- und MutL-Homologen wechselwirkt.<sup>[149]</sup>

## 6.2. Erkennung von Schäden bei der Fehlpaarungsreparatur

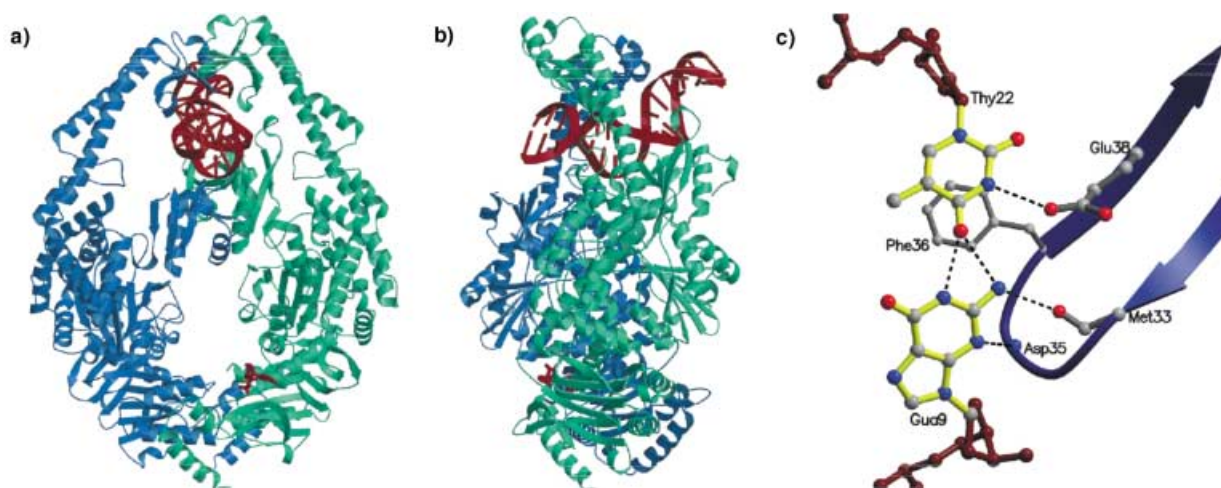
Zwei kürzlich veröffentlichte Kristallstrukturanalysen der bakteriellen MutS-Homodimere, die an eine Fehlpaarung



**Schema 9.** Fehlpaarungsreparaturmechanismus beim Menschen: Der eingeschnittene Strang enthält die fehlerbehaftete Base. Eine Basen-Basen-Fehlpaarung, die aus einer fehlerhaften Replikation resultiert, wird vom MSH6-MSH2-Heterodimer (MutS $\alpha$ ) erkannt. ATP ermöglicht das bidirektionale Einfädeln der DNA durch MutS $\alpha$  und das Zusammenkommen von MLH1/PMS2 (MutL $\alpha$ ) mit PCNA unter Bildung einer Schleifenstruktur, bei der die MMR-Proteine an der Basis und die Fehlpaarung in der Schleife angeordnet sind. Danach werden eine oder mehrere Exonucleasen und Helicasen aktiviert, um den fehlerbehafteten Strang abzubauen. PCNA rekrutiert die Replikationsmaschinerie, die die Lücke auffüllt, und DNA-Ligase I, die den Nick schließt.

bzw. an eine ungepaarte Base binden, ermöglichten einen Einblick in den Mechanismus der Schadenserkenkung in der MMR.<sup>[150,151]</sup> Die Gesamtstruktur des Komplexes wurde mit einem Paar betender Hände verglichen, wobei Daumen und Finger die DNA festhalten (Abbildung 5 a). Eines der bemerkenswertesten Merkmale dieser Struktur ist, dass die beiden identischen Polypeptide des MutS-Dimers in asymmetrischer Weise an die Fehlpaarung binden. Demnach wechselwirkt das nominale Homodimer mit der beschädigten Stelle in Form eines funktionalen Heterodimers, bei dem beide Untereinheiten an die DNA binden, aber nur eine mit der Fehlpaarung wechselwirkt. Sehr ähnlich ist interessanterweise der Bindungsmodus von MutS an DNA mit einer fehlgepaarten oder herausgebogenen Base. Die gebundene DNA hat überwiegend eine B-Form-Struktur mit einem starken lokalen Knick von etwa 60° zur großen Furche an der Stelle des fehlgepaarten oder herausgebogenen Nucleotids (Abbildung 5 b). In der Fehlpaarungsstelle ist die Thyminbase zur kleinen Furche hin versetzt und paart mit gegenüberliegendem G unter Bildung eines Wasserstoffbrückenmusters, das sich von dem einer G-T-Fehlpaarung in Lösung unterscheidet (Abbil-





**Abbildung 5.** Kristallstruktur des MutS-DNA-Komplexes: a) Überblick über die Struktur des MutS-Homodimers, das an ein Oligonucleotid mit einer G-T-Fehlpaarung gebunden ist (rot: DNA und ADP). Nur eine der Untereinheiten von MutS (grün) wechselwirkt mit der Fehlpaarung; die zweite (blau) bindet an die DNA, nicht aber mit der Fehlpaarung. Die beiden identischen Untereinheiten von MutS wechselwirken also mit der Fehlpaarung in Form eines funktionalen Heterodimers. b) Seitenansicht von (a), um 80° rotiert; die DNA ist an der Fehlpaarungsstelle etwa um 60° geknickt. c) Wechselwirkungsstelle von MutS mit fehlgepaartem T. Die Struktur der G-T-Fehlpaarung unterscheidet sich von der eines G-T-Wobblepaares in freier DNA, das Wasserstoffbrücken zwischen Guanin-O6 und Thymin-N3 sowie zwischen Guanin-N1 und Thymin-O2 aufweist. Phe36 stapelt mit Thymin und ist für die Bindung von MutS und für MMR essenziell. Die Wasserstoffbrücke von Glu38 zu Thymin ist essenziell für MMR, aber nicht für die Bindung von MutS an eine G-T-Fehlpaarung. Wiedergabe mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Magazines Ltd. 2000.<sup>[150]</sup>

dung 5c). Die Base T wechselwirkt mit dem hochkonservierten Phe-X-Glu-Motiv, wobei Phe mit der fehlgepaarten oder herausgebogenen Base über  $\pi$ -Stapelung wechselwirkt. Crosslink-Experimente mit 5-Ioduracil und Mutationsanalysen bestätigen die unmittelbare Rolle dieses Restes als Basenbindungsfaktor. Interessanterweise unterbinden Mutationen des entsprechenden Phe-Restes in MSH6 – nicht aber solche in MSH2 – die MMR-Aktivität. Dies belegt, dass MSH6 die Untereinheit von MutS $\alpha$  ist, die mit der Fehlpaarung wechselwirkt.<sup>[152]</sup> Der Glutamatrest des Phe-X-Glu-Motivs bildet eine Wasserstoffbrücke zur N3-H-Position des fehlgepaarten oder ungepaarten Thymins. Mutationen im Glu-Rest beeinträchtigen die Bindungsaktivität von MutS an Fehlpaarungsstellen nicht signifikant, ergeben aber einen MMR-defizienten Phänotyp *in vivo*. Substitution von T mit dem isosterischen Difluortoluol, das keine Wasserstoffbrücken bilden kann, beeinflusst die Bindungsaktivität ebenfalls nur marginal.<sup>[153]</sup> Die Wasserstoffbrücke zwischen Glu und T könnte demzufolge maßgeblich an der Fehlpaarungsdiskriminierung in einem Folgeschritt der Schadenserkennung beteiligt sein. Der beobachtete Fehlpaarungsmodus lässt vermuten, dass MutS das Genom auf geschwächte Watson-Crick-Wasserstoffbrücken und Stapelungswechselwirkungen hin durchsucht, um fehlgepaarte oder herausgebogene Basen zu erkennen.

Während der Mechanismus der Schadenserkennung durch MutS-Proteine weitgehend entschlüsselt wurde, bleibt eine andere zentrale Frage, die nach der Rolle der ATPase-Aktivität von MutS, bislang unbeantwortet. Studien zufolge ist eine zusammengesetzte ATP-Bindungsstelle, die am gegenüberliegenden Ende der DNA-Bindungsdomäne identifiziert wurde, in beiden Strukturen mit ADP besetzt. Möglicherweise können Strukturanalysen von MutS, das an

ein nichthydrolysierbares ATP-Analogon bindet, die Unterschiede zwischen den ADP- und ATP-gebundenen Zuständen von MutS aufklären.

### 6.3. Biologische Bedeutung von Defekten im MMR-System

Schäden im MMR-Prozess sind mit erblichem nichtpolypossem Darmkrebs (HNPCC), einer familiären Form von frühzeitigem Darmkrebs, verbunden.<sup>[154]</sup> Die Entdeckung, dass Schäden im MMR-System direkt mit einer erhöhten Krebsrate zusammenhängen, war ein wichtiger Durchbruch, der in den letzten Jahren die verstärkte Erforschung von DNA-Reparaturpfaden und verwandten Prozesse ausgelöst hat.<sup>[155]</sup> Warum Defekte im MMR-System in erster Linie zu Krebs in Darm, Endometrium und Eierstöcken führen, nicht aber in anderen Geweben, ist unbekannt. In Einklang mit unseren Erkenntnissen zum MMR-Mechanismus wird HNPCC vorwiegend durch Mutationen in den zwei nicht-redundanten Genen MLH1 (60% der Fälle) und MSH2 (35% der Fälle) ausgelöst. Auch Zellen mit einer Mutation in MSH6 zeigen wegen ihrer Unfähigkeit zur Reparatur einer einzelnen Fehlpaarung einen Mutator-Phänotyp.<sup>[156]</sup> Im Menschen ist dieser Defekt offenbar nicht gravierend genug, um die „klassischen“ HNPCC-Folgen herbeizuführen. Es wurde aber beschrieben, dass Mutationen von MSH6 in der Keimbahn zu einer Altersform von HNPCC führen.<sup>[154]</sup>

Eine detaillierte Analyse der Effekte individueller Gene auf die Karzinogenese gelang mithilfe von Mausmodellen geschädigter MMR-Gene. Anschauliches Beispiel ist eine vergleichende Studie der Tumorbildung in MSH2-, MSH3- und MSH6-defizienten Mäusen: MSH3(–/–)-Mäuse sind tumorfrei, MSH6(–/–)-Mäuse weisen eine gewisse Tumorin-

dikation auf, während MSH2(–/–)-Mäuse eine signifikante Tumoprädisposition zeigen.<sup>[157]</sup> Doppelmutante MSH6(–/–)-MSH3(–/–)-Mäuse entwickeln hingegen Tumore mit einer ähnlichen Häufigkeit wie die MSH2(–/–)-defizienten Tiere, was darauf schließen lässt, dass die Inaktivierung beider Gene (MSH3 und MSH6) vergleichbare Folgen hat wie die Inaktivierung von MSH2. Das Beispiel demonstriert das erfolgreiche Zusammenspiel biochemischer und genetischer Ansätze bei der Untersuchung von DNA-Reparaturwegen. Dank jüngster Erfolge in der Genetik und Biochemie des MMR-Prozesses können nun Genotyp-Phänotyp-Vorhersagen bezüglich der Manifestierung von HNPCC bei einer gegebenen Mutante eines MMR-Gens getroffen werden. Dieser Fortschritt eröffnet Möglichkeiten zur Überwachung von HNPCC-Familien und ermöglicht ein frühzeitiges medizinisches Eingreifen bei Personen mit Prädisposition für Darmkrebs.

Ein zweiter für die Krebstherapie wichtiger Aspekt der MMR hängt mit der Funktion von MMR-Proteinen zusammen, die das Vorliegen von DNA-Schäden an die apoptotische Maschinerie signalisieren. Die Details des Signalisierungsprozesses sind bislang nicht geklärt, es wurde aber gezeigt, dass MMR-defiziente Zellen resistent gegen zahlreiche antitumortheraeutische Wirkstoffe sind, was höchstwahrscheinlich auf die fehlende Induktion der Apoptose durch die MMR-vermittelte Schadensabarbeitung zurückzuführen ist. Anhand des MMR-Status einer Tumorzelle könnten demnach die Erfolgsaussichten einer Chemotherapie zur Behandlung einer bestimmten Tumorklasse vorausgesagt werden.<sup>[158]</sup>

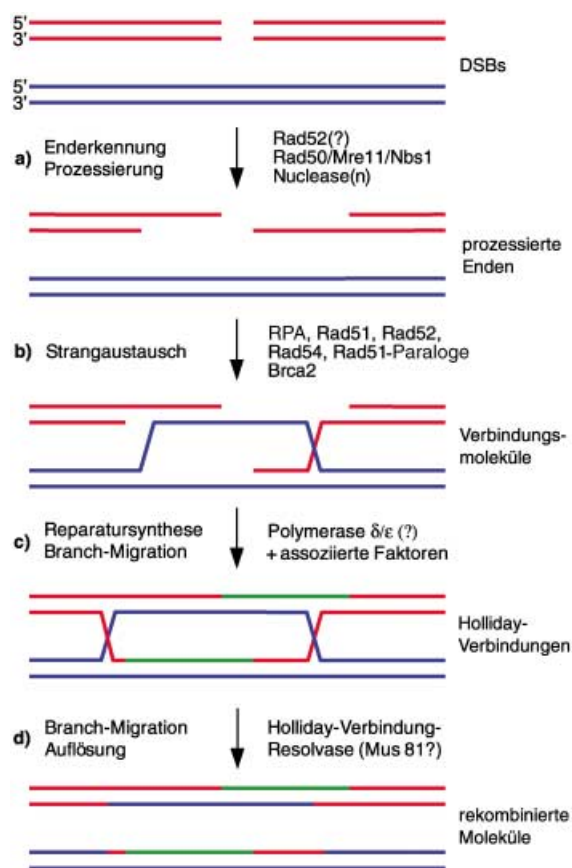
## 7. Reparatur von Doppelstrangbrüchen

Doppelstrangbrüche (DSBs) gehen auf eine Vielzahl von endogenen und exogenen Ursachen zurück. DSBs sind sowohl notwendige als auch versehentlich erzeugte Zwischenprodukte in einer ganzen Reihe von zellulären Transaktionen (siehe Abschnitt 2.2). Sie treten zwar seltener auf als andere Arten endogener Schädigungen, können aber sehr gravierende Konsequenzen haben. In Einklang mit der Schwere der Schäden haben sich zwei unabhängige Pfade zur DSB-Reparatur entwickelt.<sup>[34,36]</sup> Einer dieser beiden Reparaturpfade, die homologe Rekombination (HR), ist ein intrinsisch exakter Reparaturpfad, der extensive Regionen der DNA als codierende Information nutzt. Die homologe DNA wird üblicherweise durch das Schwesterchromatid (eine identische Kopie des Chromatids, das während der Replikation vor der Zellteilung entsteht) zur Verfügung gestellt, kann aber auch vom homologen Chromatid (zweite, nicht identische Kopie eines Chromatids in der Zelle) stammen. Der zweite Pfad umfasst die vergleichsweise einfache, koordinierte Verknüpfung gebrochener DNA-Enden (NHEJ; non-homologous end joining). NHEJ erfordert keine oder extrem kurze homologe Regionen als Templat für die Reparatur. Der Prozess ist nicht notwendigerweise exakt, und häufig werden Deletionen über eine Länge von einigen Nucleotiden am DSB-Ort eingeführt. In Anbetracht strahlungsensitiver Mutanten höherer und niederer Eukaryoten wurde zunächst angenommen, dass NHEJ der vorherrschende oder einzige

Pfad der DSB-Reparatur in höheren Eukaryoten einschließlich dem Menschen ist und HR vornehmlich in niederen Eukaryoten wie *S. cerevisiae* auftritt. Diese Ansicht wurde in den vergangenen Jahren dahingehend revidiert, dass offenbar beide Pfade für alle Eukaryoten bedeutsam sind. Generell ist HR bei schnellteilenden Zellen wichtig und hat eine zentrale Funktion in der S- und G2-Phase des Zellzyklus, in der ein Schwesterchromatid als Templat für HR zur Verfügung steht. NHEJ scheint dagegen in ruhenden oder terminal differenzierten Zellen und in der G1-Phase des Zellzyklus wichtig zu sein, wenn kein Schwesterchromatid zur Verfügung steht. Die beiden DSB-Reparaturpfade erfüllen darüber hinaus spezielle Aufgaben. So ist HR an der Meiose und der Reparatur von Interstrang-Crosslinks maßgeblich beteiligt, während NHEJ für das Zusammenfügen von DNA-Fragmenten bei der Diversitätserzeugung im Immunsystem während der V(D)J-Rekombination und für die Telomerinstandhaltung unerlässlich ist.

### 7.1. Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch homologe Rekombination

Die homologe Rekombination nutzt zur Reparatur von DSBs ein intaktes homologes DNA-Molekül als Templat. Der erste Schritt bei der Reparatur eines DSB ist die Prozessierung der DNA-Enden am Ort des Strangbruchs unter Bildung jeweils einzelsträngiger Überhänge am 3'-Ende (Schema 10).<sup>[35,159,160]</sup> Die einzelsträngigen Enden werden dann im zentralen Schritt der HR zur Suche eines homologen Templates und zur Bildung eines Joint-Moleküls verwendet. Das Joint-Molekül dient als Templat für die Reparatursynthese. Das Schließen des Nicks nach erfolgter Synthese führt zur Bildung einer verzweigten DNA-Struktur (der Holliday-Verbindung), in der die beiden Elternduplexe miteinander verknüpft sind. Die Holliday-Verbindungen können sich entlang der verknüpften DNA bewegen (ein als Branch-Migration bezeichneter Prozess) und lösen sich an einer passenden Stelle der DNA unter Regenerierung zweier intakter Kopien der dsDNA wieder auf. Die Biochemie der homologen Rekombination ist in Bakterien recht detailliert untersucht worden.<sup>[159,161]</sup> Ein Großteil unserer Informationen zum HR-Prozess in Eukaryoten geht auf die Identifizierung von Genen dieses Prozesses mithilfe der Hefegenetik zurück.<sup>[35,162]</sup> So wurde die Existenz von Genen der RAD52-Gruppe aufgedeckt, die eine zentrale Rolle im HR-Prozess einnehmen. Einige dieser Gene, nämlich RAD50, MRE11 und XRS2, wurden mit dem Startprozess der HR zur Bildung einzelsträngiger 3'-Enden in Zusammenhang gebracht, während andere (RAD51, RAD52, RAD54, RAD55, RAD57 und RAD59) bei der homologen Paarung und im Stranginvasionsschritt eine Rolle spielen (Schema 10). HR wird in höheren Eukaryoten durch homologe Gene aus der RAD52-Gruppe von Hefe vermittelt, wobei zusätzliche Gene vorhanden sind. Die Rekonstitution der homologen Rekombination von Eukaryoten gelang bisher nicht, aber die biochemische Funktion einiger beteiligter Proteine wird zunehmend besser verstanden und soll daher im Folgenden diskutiert werden.



**Schema 10.** Doppelstrangbruchreparatur durch homologe Rekombination; die beschädigte DNA ist rot dargestellt, das unbeschädigte homologe Templat blau und die von der Reparatursynthese eingefügte Sequenz grün: a) Initiale Erkennung eines DSB einschließlich der möglichen Bindung des Rad52-Proteins. Die nucleolytische Prozessierung der DNA-Enden zur Bildung von 3'-ssDNA-Überhängen hängt vom Rad50-Mre11-Nbs1-Komplex ab und verläuft wahrscheinlich unter Beteiligung einer bislang unbekannten Nuclease. b) Die ssDNA-Enden werden vom einzelstrangbindenden Protein RPA gebunden; mithilfe von Rad52 und den Rad51-Paralogen (Rad51B, C, D und XRCC2, 3) wird Rad51 zur Bildung eines Nucleoproteinfilaments auf die ssDNA geladen. Das BRCA2-Protein spielt bei der Regulierung der Aktivität von Rad51 eine Rolle und stimuliert wahrscheinlich die Bildung des Rad51-ssDNA-Filaments. Dieses Nucleoproteinfilament sucht nach homologer Duplex-DNA, und eine Strangaustauschreaktion führt zur Bildung eines Verbindungsmoleküls zwischen der beschädigten und der unbeschädigten DNA, ein Schritt, der durch Rad54 stimuliert wird. c) In einem bislang ungenau verstandenen Prozess bewirken DNA-Polymerasen und ihre assoziierten Faktoren Reparatursynthesen unter Bildung von Holliday-Verbindungen. d) Die Holliday-Verbindungen lösen sich durch endonucleolytisches Aufbrechen und Wiederverbinden in einer Reaktion, die vom Mus81-Protein abhängen könnte und letztlich zu zwei intakten DNA-Molekülen führt.

#### 7.1.1. Bindung und Prozessierung der Enden

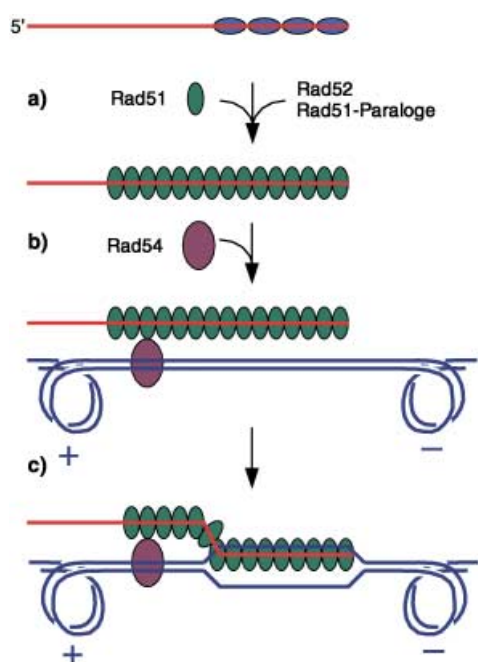
Biochemische und elektronenmikroskopische Studien haben gezeigt, dass Rad52 vorzugsweise an Enden von DSBs, im Speziellen an Enden mit Einzelstrang-DNA-Überhängen bindet.<sup>[163]</sup> Auch wenn genetische Beweise für diese Rolle von Rad52 bislang nicht zur Verfügung stehen, lassen diese Eigenschaften vermuten, dass Rad52 als initialer DSB-

Bindungsfaktor fungiert und so darüber mitentscheidet, ob ein DSB entweder dem HR-Pfad oder dem NHEJ-Pfad zugeführt wird.

DSBs werden nachfolgend mithilfe einer 5'-zu-3'-Exonuclease zur Bildung von 3'-Einzelstrang-DNA zurechtgeschnitten. Beteiligt an diesem Schritt ist ein trimerer Komplex bestehend aus Rad50, Mre11 und Nbs1 (RMN-Komplex) im Menschen und aus Rad50, Mre11 und Xrs2 (RMX-Komplex) in Hefezellen. Laut biochemischen Analysen der RMN- und RMX-Komplexe weist Mre11 Nucleaseaktivität auf, allerdings mit der falschen Polarität (3'→5').<sup>[164]</sup> Dass die Nucleaseaktivität von Mre11 nicht essenziell für HR ist, wird durch genetische Analysen gestützt, demzufolge nucleasedefiziente Mutanten von Mre11 keinen auffälligen Defekt in der Rekombination aufweisen.<sup>[165]</sup> Es kann daher angenommen werden, dass der RMN-Komplex mit anderen Faktoren zusammenarbeitet, die die erforderliche 5'-zu-3'-Exonucleaseaktivität aufweisen.<sup>[166]</sup> Rad50/Mre11/Nbs1 ist der einzige bekannte Faktor, der sowohl für HR wie auch NHEJ (siehe Abschnitt 7.2) wichtig ist und außerdem eine zusätzliche Funktion bei der DNA-Schadenssignalisierung hat.

#### 7.1.2. Homologe Paarung und Strangaustausch

Der zentrale Schritt in der HR ist die homologe Paarung und die Strangaustauschreaktion, die die gebrochenen DNA-Enden mit dem für die Reparatursynthese verwendeten Donor-Templat zusammenbringt (Schema 11). Das zentrale Protein in diesem Schritt ist in Eukaryoten das Rad51-Protein, das in vielen Eigenschaften seinem besser erforschten bakteriellen Homologen, dem RecA-Protein, ähnelt. Rad51 und RecA polymerisieren auf ssDNA zu Nucleoproteinfilamenten (rechtshändigen superhelicalen Strukturen, die im Elektronenmikroskop sichtbar sind) mit einer Proteinmonomer/Nucleotid-Stöchiometrie von 1:3. Die Nucleoproteinfilamente sind die aktiven Spezies für die Suche nach Homologien im Donor-Templatmolekül und in der Austauschreaktion.<sup>[167]</sup> RecA ist in der Katalyse der Strangaustauschreaktion leistungsfähiger als Rad51, das seinerseits nur mithilfe anderer Faktoren, darunter RPA, Rad52 und einer Reihe von Proteinen mit Homologien zu Rad51, in effizienter Weise Nucleoproteinfilamente bilden kann. Das einzelstrangbindende Protein RPA bindet zur Auflösung von Sekundärstrukturen an die Einzelstrang-Überhänge. Es wurde gezeigt, dass Rad52, das komplementäre ssDNA hybridisiert und DNA-Enden binden kann, die Strangaustauschreaktion durch Binden von Rad51 an ssDNA in Gegenwart von RPA erleichtert.<sup>[168]</sup> Eine ähnliche Rolle zur Stimulation der Strangaustauschreaktion wurde für die Rad51-Homologen in Hefe, Rad55 und Rad57, die ein stabiles Heterodimer bilden, nachgewiesen.<sup>[169]</sup> Interessanterweise gibt es in Säugern fünf weitere Rad51-ähnliche Proteine (XRCC2, XRCC3, Rad51B, Rad51C und Rad51D).<sup>[170]</sup> Während die Beteiligung der fünf Proteine an der homologen Rekombination und ihre essenzielle Funktion für die Erhaltung der genomischen Stabilität zunehmend als gesichert gelten, befindet sich ihre biochemische Charakterisierung noch in den Anfängen.<sup>[171]</sup> Die Proteine scheinen, so wie Rad55 und Rad57 in Hefe, heteromultimere Komplexe zu



**Schema 11.** Homologe Paarung und Strangaustauschreaktion: a) Einzelstrang-3'-Überhänge an DNA werden von RPA gebunden. Das effiziente Laden des Rad51-Proteins auf ssDNA zur Bildung des Nucleoproteinfilaments, in Gegenwart von RPA, wird von Rad52 und den Rad51-Paralogen (Rad51B, C, D und XRCC2, 3) stimuliert. b) Rad51 wechselwirkt im Nucleoproteinfilament mit Rad54. c) Die Invasion der Target-dsDNA durch das Nucleoproteinfilament wird durch das Rad54-Protein stimuliert, das eine superhelicale Torsion in die Target-dsDNA induziert und so die Stranginvasion erleichtert. Rad54 könnte auch den Zugang zur dsDNA verbessern, indem es Histonproteine im Nucleosom entfernt.

bilden, die die Strangaustauschreaktion stimulieren.<sup>[172]</sup> Offen bleibt vorerst, ob einige der Rad51-Paralogen die Strangaustauschreaktion auch in Abwesenheit von Rad51 in signifikanter Weise vermitteln können und ob eine solche Aktivität mit einer unterstützenden Funktion in der homologen Rekombination, z.B. bei der Interstrang-Crosslink-Reparatur, zusammenhängt. Auch Rad54 stimuliert die Rad51-katalysierte Strangaustauschreaktion.<sup>[173]</sup> Anders als bei den erwähnten Proteinen beruht dieser Prozess höchstwahrscheinlich auf einer Erleichterung der Bildung des Joint-Moleküls aus dsDNA und dem aus ssDNA und Rad51 aufgebauten Nucleoproteinfilament. Das Rad54-Protein ist ein Mitglied der Swi2/Snf2-Familie von dsDNA-abhängigen ATPasen, die an vielen Teilschritten des DNA-Metabolismus, z.B. der Chromatinremodellierung, beteiligt sind.<sup>[174]</sup> Rad54 kann die Topologie der DNA modifizieren, und gegenwärtige Modelle gehen davon aus, dass ein solcher Wechsel in der Topologie des dsDNA-Targets die Strangaustauschreaktion erleichtern könnte (Schema 11 c).<sup>[175]</sup> Es wird angenommen, dass Rad54 Zusatzfunktionen hat, z.B. als Faktor zur Erleichterung der Strangaustauschreaktion durch Entfernen von nucleosomalen Proteinen.<sup>[176]</sup>

### 7.1.3. Reparatursynthese, Branch-Migration und Auflösung der Holliday-Verbindung

Die nachfolgenden Schritte in der HR, die Branch-Migration und Auflösung der Holliday-Verbindung, sind in Bakterien rekonstituiert worden. Dabei vermitteln die RuvA- und RuvB-Proteine die Branch-Migration und RuvC katalysiert die Auflösung der Holliday-Verbindung.<sup>[177]</sup> Wie diese Schritte in Eukaryoten ablaufen, ist bis heute nicht verstanden, aber zwei jüngste Entdeckungen markieren den Beginn ihrer Aufklärung. Erstens wurde ein Komplex mit unbekannter Zusammensetzung isoliert, der RuvABC-ähnliche Branch-Migrations-Aktivität und Aktivität zur Auflösung von Holliday-Verbindungen aufweist. Dies lässt vermuten, dass der prinzipielle Mechanismus dieser Schritte in Bakterien und in Eukaryoten analog ist.<sup>[178]</sup> Zweitens wurde dargelegt, dass das Mus81-Protein, das in allen Eukaryoten konserviert ist, im Komplex mit Eme1-Protein in *S. pombe* und als Bestandteil eines Komplexes mit noch unbekannten Zusatzfaktoren in menschlichen Zellen Holliday-Verbindungen in Komplexen auflösen kann.<sup>[179]</sup> Das bei Mus81 beobachtete Spaltungsmuster unterscheidet sich etwas von dem in Zellextrakten gefundenen Muster, und es gibt Hinweise darauf, dass die beiden Aktivitäten nicht identisch sind.<sup>[180]</sup> Die genauen Funktionen der beiden Enzymkomplexe sind bislang unklar.

### 7.1.4. Regulation der homologen Rekombination

Die homologe Rekombination ist ein streng regulierter Prozess, und verschiedene Faktoren beeinflussen unmittelbar die Funktion der beteiligten Proteine.<sup>[2,181]</sup> Ein Beispiel, das hier diskutiert werden soll, ist die Kontrolle von Rad51 durch BRCA2 („breast cancer susceptibility gene 2“). Mutationen in BRCA1- und BRCA2-Genen in Keimbahnzellen führen zu einer Prädisposition für Brustkrebs. Eine mögliche Rolle von BRCA1/2 in der homologen Rekombination wurde ursprünglich aufgrund einer direkten Wechselwirkung zwischen Rad51 und BRCA1/2 und einem Defekt in der Reparatur von DSBs in BRCA1/2-defizienten Zellen postuliert.<sup>[182]</sup> Studien mit BRCA2-Fragmenten haben erste Einblicke in die möglichen Mechanismen der Regulation von Rad51 gewährt. Gemäß der Kristallstruktur des C-terminalen Teilstücks von BRCA2 enthält das Protein Domänen, die sowohl ssDNA wie auch dsDNA binden können.<sup>[183]</sup> Diese Domänen haben zudem die Fähigkeit, die Strangaustauschreaktion von Rad51 zu stimulieren.

Kurze Peptide, die die Wechselwirkungsstelle mit Rad51 imitieren (die Brc-Domäne), inhibieren die Polymerisation von hRad51 und verhindern so die Bildung von Nucleoproteinfilamenten und die Vermittlung der Strangaustauschreaktion.<sup>[184]</sup> Nach strukturellen Studien eines Komplexes aus Rad51 und einem Brc-Peptid initiiert das Brc-Peptid ein Motiv in Rad51, das für die Polymerisation von Rad51 maßgeblich ist.<sup>[185]</sup> Möglicherweise hat BRCA2 demzufolge zwei Funktionen: einerseits die Unterdrückung unerwünschter HR und andererseits die Stimulation von HR im Bedarfsfall. Weiteren Einblick in die Regulation von Rad51 und HR durch BRCA2 könnten Studien mit dem Gesamtprotein



gewähren. BRCA1 und 2 haben außerdem eine Funktion bei der Regulation der zellulären Abwehrreaktion gegen DNA-schädigende Agentien, ein Aspekt, der jedoch außerhalb des Fokus dieses Aufsatzes liegt.<sup>[186]</sup>

## 7.2. Nichthomologes End-Joining

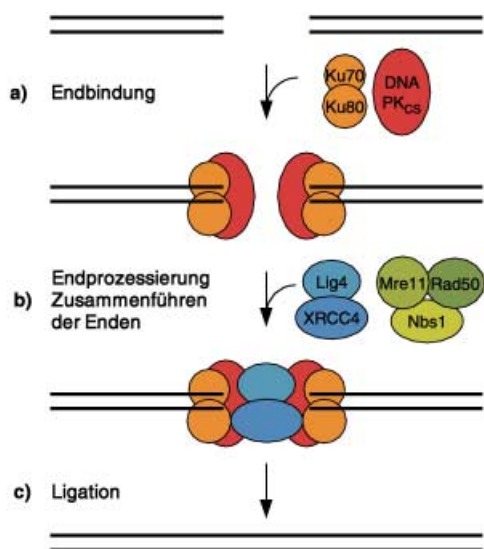
Anders als HR ist NHEJ ein konzeptuell einfacher Pfad, der die Religation gebrochener DNA-Enden einschließt, wobei kein homologes Templat benötigt wird. Da die DNA-Enden beschädigt sein können, ist diese Art der Reparatur nicht zwangsläufig exakt und kann mit dem Verlust einiger Nucleotide verbunden sein. Erkenntnisse über die genetischen Voraussetzungen für NHEJ stammen ursprünglich aus strahlungssensitiven Hamsterzelllinien. Diesen Studien zufolge sind mindestens zwei Komplexe an NHEJ beteiligt: die DNA-Proteinkinase (DNA-PK; diese besteht wiederum aus drei Komponenten: der DNA-PK-katalytischen Untereinheit (DNA-PK<sub>CS</sub>), Ku70 und Ku80) und dem XRCC4-DNA-Ligase-IV-Komplex.<sup>[187]</sup> Darauf aufbauende genetische Studien in Hefe wiesen auf die Rolle des Mre11-Rad50-Xrs2-Komplexes in NHEJ hin. Eine äquivalente Funktion wurde auch für den humanen Mre11-Rad50-Nbs1-Komplex vorgeschlagen.<sup>[188]</sup>

NHEJ wird durch das Ku70/80-Heterodimer initiiert, das selektiv an DNA-Enden bindet und DNA-PK<sub>CS</sub> rekrutiert

(Schema 12).<sup>[189]</sup> DNA-PK<sub>CS</sub> ist eine Proteinkinase, die eine Reihe von Proteinen, einschließlich Ku-Proteine, XRCC4, p53 und andere DNA-PK<sub>CS</sub>-Komplexe, phosphorylieren kann. Bislang ist unklar, welches Protein genau im NHEJ-Prozess phosphoryliert werden muss. Die Verbrückung der beiden DNA-Enden erfordert den Rad50-Mre11-Nbs1-Komplex und den XRCC4-DNA-Ligase-IV-Komplex, und konsequenterweise wechselwirken beide Komplexe mit den Ku-Proteinen.<sup>[190,191]</sup> Sowohl Xrcc4 wie auch Rad50 bestehen aus einer globulären und mehreren langen helicalen Domänen, die intra- und intermolekulare Multimere bilden können; diese Wechselwirkungen sind möglicherweise wichtig zur Verbrückung der DNA-Enden.<sup>[190,192,193]</sup> DSBs, die durch schädigende Agentien hervorgerufen wurden, enthalten beschädigte Ribosereste und können aus diesem Grund nicht direkt religiert werden. Die Prozessierung der Enden muss demzufolge vor der Verknüpfung stattfinden. Hinweisen aus genetischen Experimenten zufolge ist allein die Gegenwart, nicht aber die Nucleaseaktivität von Mre11 zur Kürzung der DNA-Enden notwendig. Mögliche Gene, die bei der Anpassung von DNA-Enden in NHEJ eine maßgebliche Rolle spielen, sind die Flap-Endonuclease FEN-1 und das kürzlich entdeckte Artemis-Gen.<sup>[194]</sup> Dieses Gen, das Homologien zur Metallo- $\beta$ -Lactamasefamilie aufweist, wurde aus dem strahlungssensitiven Phänotyp isoliert, der aus der Inaktivierung von Artemis hervorgeht. Der XRCC4-DNA-Ligase-IV-Komplex katalysiert abschließend den Ligationschritt (Schema 12c).<sup>[195]</sup>

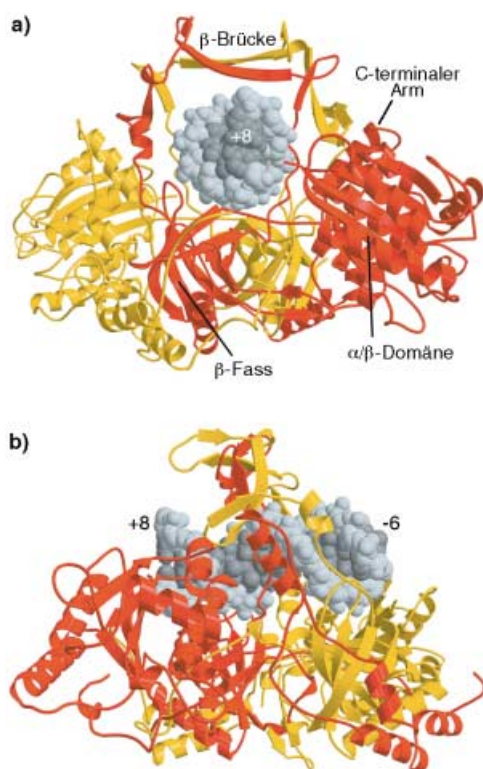
### 7.2.1. Erkennung von DNA-Enden durch Ku70-Ku80

Vor kurzem wurde die Struktur des Ku70-Ku80-Heterodimers, das an ein DNA-Substrat mit nur einem Doppelstrang-Ende gebunden ist, erfolgreich gelöst.<sup>[196]</sup> Ku70 und Ku80 sind nur schwach sequenzzhomolog, weisen aber die gleiche Topologie auf und binden an DNA in Form eines Pseudo-Homodimers. Der Komplex hat eine ringförmige Struktur, in deren Öffnung die DNA eingefädelt ist (Abbildung 6). Eine Seite der DNA wird durch die globuläre  $\beta$ -Fass-Domäne gebunden, die etwa zwei Helixumläufe der DNA bedeckt. Die andere Seite wird durch die schmale  $\beta$ -Brücke gebunden, die aus nur zwei  $\beta$ -Strängen, je einem Strang pro Untereinheit von Ku, aufgebaut ist. Die Ku-Proteine haben keinen direkten Kontakt zu den DNA-Basen und wechselwirken nur mit wenigen Stellen des Zucker-Phosphat-Rückgrats. Die Form des Ringes ist dennoch erstaunlich komplementär zur DNA-Helix. Die ringförmige Struktur erklärt, warum Ku70-Ku80 bevorzugt an DNA-Enden statt an geschlossene zirkuläre Strukturen bindet und nach dem Binden an die DNA-Enden in das Innere der Helix gleiten kann. In Übereinstimmung mit biochemischen Daten bindet der Ku-Komplex in asymmetrischer Weise an DNA, wobei Ku70 näher am Ende positioniert ist.<sup>[197]</sup> Da die Ku-Proteine in Richtung des intakten DNA-Stranges binden, bleibt das Ende zugänglich für Wechselwirkungen mit weiteren Proteinen.



**Schema 12.** DSB-Reparatur durch nichthomologes End-Joining (NHEJ).

a) Die Erkennung von DSBs wird durch die Proteine Ku70 und Ku80 erreicht, die spezifisch an DNA-Enden binden und einen Komplex mit der katalytischen Untereinheit der DNA-Proteinkinase (DNA-PK<sub>CS</sub>) bilden. b) Die beschädigten Enden des Strangbruchs können durch Rad50-Mre11-Nbs1 und eine Nuclease prozessiert werden, wobei einige Basenpaare verloren gehen können. Einige strukturelle Merkmale von Rad50-Mre11-Nbs1 und Xrcc4-DNA-Ligase IV weisen darauf hin, dass sie DNA-Enden zusammenführen können. c) Die Ligation der beiden Enden wird von Xrcc4-DNA-Ligase IV unter Wiederherstellung eines kontinuierlichen DNA-Moleküls ausgeführt. NHEJ kann in intrinsischer Weise fehlerbehaftet sein und zum Verlust einiger Nucleotide führen.



**Abbildung 6.** Struktur des DNA-gebundenen Ku70-Ku80-Komplexes (rot: Ku70, gelb: Ku80, hellgrau: DNA-Rückgrat, dunkelgrau: DNA-Basen). a) Blick entlang der DNA-Helix. Ku70 und Ku80 sind zwar nur schwach homolog, weisen aber weitgehend ähnliche Tertiärstrukturen auf und binden DNA in Form eines asymmetrischen Pseudo-Dimers. Ku70/Ku80 umringen die DNA auf der einen Seite mit einer globulären  $\beta$ -Fass-Domäne und auf der anderen Seite mit einer engen  $\beta$ -Brücke. b) Seitenansicht von (a); die Oberseite der DNA (Position -6) ist lösungsmittelzugänglich und ermöglicht daher zusätzliche Wechselwirkungen der DNA-Enden mit anderen NHEJ-Proteinen. Wiedergabe mit Genehmigung von Macmillan Magazines Ltd 2001.<sup>[195]</sup>

### 7.3. Biologische Folgen eines defekten DSB-Reparaturpfades

Eine wichtige Folge eines Defekts in der DSB-Reparatur ist die chromosomale Instabilität, die sich in einer großräumigen Umordnung der Chromosomen manifestiert. Im Unterschied zur Mutationsinstabilität, die z.B. bei einem Defekt in MMR oder NER auftritt und typischerweise ein einzelnes Gen pro Fall betrifft, kann die chromosomale Instabilität zu einem Verlust ganzer Chromosomenteile mit gravierenden Konsequenzen führen.<sup>[34]</sup> Verschiedene humane Syndrome wurden bereits mit Defekten in der Reparatur von DSB in Zusammenhang gebracht. Die meisten stammen nicht direkt von Defekten in HR oder NHEJ, sondern eher von einer defekten Regulation der DSB-Reparatur. Beispiele für damit verbundene Krankheiten sind: Ataxia Telangiectasia (AT; verursacht durch einen Defekt im ATM-Gen), eine AT-ähnliche Funktionsstörung (verursacht durch einen Defekt in MRE11) und das Nijmegen-Breakage-Syndrom (verursacht durch einen Defekt in NBS1).<sup>[198]</sup> Von den komplexen Phänotypen dieser Krankheiten sind die Prädisposition für Krebs, Immundefizienz und Hypersensitivität gegen ionisierende Strahlung als typische Merkmale im Zusammenhang

mit einer defekten DSB-Reparatur zu nennen. Zellen der betroffenen Patienten weisen eine erhöhte chromosomale Translokationsrate auf und sind nicht in der Lage, die spezifischen Zellzyklus-Checkpunkte zu aktivieren. Die Mutationen in MRE11 und NBS, die der Ursprung dieser Syndrome sind, führen nicht zum gesamten Ausfall der DNA-Reparatur, vielmehr scheint es, dass sie die Fähigkeit der Zellen zur Aktivierung der Zellzyklus-Checkpunkte beeinträchtigen. Bemerkenswerterweise wirken Nullmutationen von MRE11 und RAD50 in Mäusen sogar auf zellulärem Niveau letal, was auf deren essenzielle Funktion in der DNA-Reparatur hindeutet.<sup>[199]</sup> Die Prädisposition für Brustkrebs und Eierstockkrebs von Individuen mit Mutationen in den BRCA1/2-Genen kann in analoger Weise verstanden werden. Nullmutationen in diesen Genen führen zu einer frühen embryonalen Letalität, während partiell defekte Gene zwar prinzipiell lebensfähig sind, gleichwohl aber zu einer hohen chromosomalen Instabilität und letztendlich zu Krebs führen.<sup>[186]</sup>

Dass Defekte in NHEJ zu einer Sensibilisierung gegen ionisierende Strahlung führen, ist bereits seit langem aus Studien mit mutierten Hamsterzellen, bei denen die Gene für KU70, KU80 und XRCC4 defizient sind, bekannt.<sup>[187]</sup> Die nachfolgende Züchtung von Mäusen, die defizient in den NHEJ-Komponenten KU70, KU80, DNA-PK $\alpha$ , XRCC4 und DNA-Ligase IV sind, ermöglichte weitergehende Analysen der Folgen von NHEJ-Defizienz.<sup>[34,200]</sup> Die normalen Phänotypen solcher Mäuse sind Strahlungssensitivität, Prädisposition für Krebs und eine Immundefizienz wegen Defekten in der V(D)J-Rekombination. Diese Auswirkungen können leicht durch einen Defekt in NHEJ erklärt werden. Die schwere der Phänotypen von NHEJ-defizienten Mäusen reicht von embryonaler Letalität (XRCC4 und DNA-Ligase IV) über Wachstumsverzögerung (KU70 und KU80) bis hin zu normalem Wachstum (DNA-PK $\alpha$ ). In weitergehenden Analysen von KU70- und KU80-defizienten Mäusen wurden häufige chromosomale Brüche aufgrund defekter DSB-Reparatur identifiziert.<sup>[201]</sup> Der schwerwiegende Phänotyp von XRCC4- und DNA-Ligase-IV-defizienten Mäusen konnte auf einen Defekt in den Neuronen zurückgeführt werden, die während der Hirnentwicklung einer massiven Apoptose unterliegen.<sup>[202]</sup> Diese apoptotische Antwort kann unterdrückt werden, indem die Induktion der Apoptose durch Zerstörung des p53- oder ATM-Gens verhindert wird. Bislang wurde eine kleine Zahl von Patienten mit einer Defizienz in DNA-Ligase IV identifiziert. Symptome sind eine markante Strahlungssensitivität und in einigen Fällen eine Immundefizienz sowie Entwicklungs- und Wachstumsverzögerungen. Die Defekte werden durch Punktmutationen im Gen ausgelöst und resultieren demzufolge nicht in einer vollständig defizienten DNA-Ligase IV.<sup>[203]</sup>

Der biologischen Rolle der HR wurde mithilfe von Knock-out-Mäusen und DT40-Hühnerzelllinien mit verschiedenen defizienten Genen auf den Grund gegangen. Mäuse und Zellen mit defizientem Strang austauschprotein RAD51 sind nicht lebensfähig, was die essenzielle Funktion dieses Gens verdeutlicht.<sup>[204]</sup> Eine direkte Rolle von Rad51 in der Erhaltung der genomischen Stabilität wurde in Hühnerzelllinien demonstriert, bei denen das Vorhandensein von RAD51

konditionell steuerbar ist. Eine unterdrückte Expression von RAD51 verhindert Analysen zufolge die Zellteilung und führt zu einer großen Zahl an Chromatidbrüchen.<sup>[205]</sup> An drei Mausmodellen mit defizienten RAD51-Paralogen (XRCC2, RAD51B und RAD51D) wurde frühe embryonale Letalität festgestellt.<sup>[206]</sup> Zellen mit Defekten in einem der fünf RAD51-Paralogen sind hingegen lebensfähig, und laut Analysen der Knock-out-Zellen spielen diese Gene eine Rolle in der homologen Rekombination und der Instandhaltung der genomischen Stabilität.<sup>[171]</sup> Sogar eine vollständige Unterdrückung von RAD52 in Mäusen und Hühnern bleibt fast ohne Konsequenzen. Die Tiere sind vollständig gesund, und der einzige zelluläre Phänotyp ist eine etwas schwächere HR-Effizienz.<sup>[207]</sup> Dieses Ergebnis steht in scharfem Gegensatz zu Studien in Hefezellen, nach denen bei Mutationen von RAD52 die schwersten Folgen aller HR-defizienten Mutationen beobachtet werden.<sup>[35]</sup> Erklärt werden könnte dieser Unterschied durch den Befund, dass RAD52 und das RAD51-paraloge XRCC3 eine partiell redundante Funktion in DT40-Hühnerzellen haben.<sup>[208]</sup> Auch das Vorliegen einer funktionellen Redundanz und zusätzlicher funktioneller Homologe von RAD52 in Säugern kann in Betracht gezogen werden. RAD54-defiziente Mäuse waren bislang das einzige lebensfähige Säugermodell mit einem echten Defekt in der Rekombination. Embryonale RAD54-Stammzellen sind sensitiv gegen ionisierende Strahlung und das DNA-Interstrang-Crosslinking-Reagens Mitomycin C, ausgewachsene RAD54(–/–)-Mäuse dagegen nur gegen Mitomycin C, nicht aber gegen ionisierende Strahlung.<sup>[209]</sup> Dies und der Befund, dass RAD54- und KU70-defiziente Mäuse sensitiver gegen ionisierende Strahlung sind als einfachdefiziente Tiere, belegt die Synergie der beiden Pfade sowie die größere Bedeutung der HR für die DSB-Reparatur in embryonalen Stammzellen gegenüber HR in adulten Zellen.<sup>[210]</sup>

## 8. Zusammenfassung und Ausblick

Die zentralen Reparaturpfade im Menschen – direkte Reparatur, Basenexzisionsreparatur, Nucleotidexzisionsreparatur, Fehlpaarungsreparatur, homologe Rekombination und nichthomologe Endverknüpfung – erfüllen essenzielle Aufgaben zur Erhaltung der genomischen Integrität. Defekte in vielen dieser Pfade können mit vererbten Syndromen in Zusammenhang gebracht werden und führen zu einer Prädisposition für Krebs. Die molekularen Grundlagen der DNA-Reparatur werden seit einigen Jahren bedeutend besser verstanden. Die Mechanismen der Schadenserkennung und der Katalyse der (im molekularen Sinne) relativ einfachen Pfade DR und BER konnten mit beachtlicher Genauigkeit aufgeklärt werden. Dabei wurde auf eine Kombination von biochemischen, strukturellen und chemischen Ansätzen zurückgegriffen, die hochaufgelöste Strukturen von Reparaturenzymen im Komplex mit ihren DNA-Substraten lieferten. Die komplexeren DNA-Reparaturpfade NER, MMR, HR und NHEJ sind bislang weniger gut verstanden, was angesichts des koordinierten Zusammenspiels von bis zu 30 Polypeptiden nicht verwundern sollte. Es ist anzunehmen, dass chemisch-biologische Methoden in naher Zukunft die

Aufklärung der Schadenserkennungs- und Katalysemechanismen dieser Prozesse rasant beschleunigen werden.

Dieser Aufsatz hat sich auf DNA-Reparaturpfade im engsten Sinne beschränkt, d.h. auf Pfade, die nachweislich aktiv am Entfernen von Schäden aus der DNA unter Wiederherstellung der ursprünglichen DNA-Sequenz beteiligt sind. Es sind weitere menschlich vererbte Krankheiten mit genetischer Instabilität und Prädisposition für Krebs bekannt, die durch Defekte in anderen als den hier beschriebenen Genen verursacht werden. Zu erwähnen sind das Bloom-, das Werner- und das Rothmund-Thomson-Syndrom, die auf defiziente BLM-, WRN- bzw. RECQ4-Gene zurückgehen. Diese Gene codieren für Proteine mit Helicase- oder Helicase-Endonuclease-Aktivität,<sup>[211]</sup> die unter anderem mit NHEJ- und DNA-Replikationsproteinen wechselwirken und vermutlich eine Rolle beim Entfernen ungewöhnlicher DNA-Intermediate aus DNA-Reparatur- und DNA-Replikationsprozessen spielen. Betroffene Patienten weisen unter anderem Anzeichen vorzeitiger Alterung auf. Ein weiteres Syndrom mit spontaner chromosomaler Instabilität als Hauptmerkmal ist die Fanconi-Anämie (FA),<sup>[212]</sup> die durch eine Defizienz in einem der mindestens acht FA-Gene ausgelöst wird. FA-Zellen zeigen auf zellulärer Ebene eine markante Spezifität für Interstrang-Crosslink-Reagentien. Ob FA-Gene direkt eine Funktion in einem Reparaturpfad zur Interstrang-Crosslink-Reparatur oder möglicherweise eine Signalfunktion oder eine regulatorische Funktion haben, ist zurzeit nicht bekannt.

Die Forschungen sowohl zu den traditionellen DNA-Reparaturpfaden als auch zu anderen Pfaden zur Erhaltung der genomischen Stabilität können von chemisch-biologischen Lösungsansätzen immens profitieren. Vielleicht trägt dieser Aufsatz dazu bei, das Interesse der Chemie an der Erforschung der Grundlagen der zahlreichen Mechanismen, die an der Erhaltung der genomischen Stabilität beteiligt sind, weiter zu stimulieren.

## 9. Glossar

Alkylguanintransferase (AGT)	DNA-Reparatur-Enzym, das O6-Alkylguaninaddukte direkt zu Guaninresten umsetzen kann.
AP-Endonuclease	An der BER beteiligtes Enzym, das die Phosphodiesterbindung an der 5'-Seite einer abasischen Stelle hydrolysiert.
AP-Lyase	In Polymerase $\beta$ und einigen DNA-Glycosylasen vorhandene enzymatische Aktivität, die die Spaltung der Bindung zwischen einer abasischen Stelle und der Phosphatgruppe auf der 3'-Seite katalysiert.
BRCA1/2	Gene, die wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Regulation des HR-Prozesses spielen. Defekte in BRCA1/2 führen zu einer Prädisposition für Brustkrebs im Menschen.

CSA	An der TCR beteiligtes Gen, das 5-WD-Repeats enthält, die bei Protein-Protein-Wechselwirkungen eine Rolle spielen; die genauen Funktionen von CSA sind noch nicht bekannt.	Interstrang-Crosslink (ICL)	Eine hochtoxische Modifikation in der DNA, bei der die beiden DNA-Stränge durch eine kovalente Bindung verknüpft sind.
CSB	DNA-abhängige ATPase mit Homologien zu Faktoren für die Chromatin-Remodellierung; CSB ist an TCR beteiligt und liegt im Elongationskomplex der RNA-Polymerase II vor.	Joint-Molekül	Entsteht in der HR durch Verknüpfung der DSB-Enden mit dem Reparaturtemplat und Stranginvasion.
DNA-Glycosylase	Enzyme, die die BER durch Erkennung beschädigter Basen in DNA initiieren und nachfolgend die glycosidische Bindung zwischen Base und dem Zucker-Phosphat-Rückgrat spalten.	Ku70/80	Heterodimeres Protein, das an NHEJ beteiligt ist und den Prozess durch Binden an DNA-Enden initiiert; bildet in vivo einen stabilen Komplex mit DNA-PK <sub>CS</sub> .
DNA-Ligase III	DNA-Ligase mit einer spezifischen Funktion zur Verbindung von Nicks im letzten Schritt der BER.	Long-Patch-Reparatur	Nebenpfad der BER, bei dem zwei bis sechs Nucleotide an der Stelle der beschädigten Base eingefügt werden.
DNA-Ligase IV	Ist an der Schließung von Doppelstrangbrüchen im NHEJ-Prozess beteiligt.	MLH1	MutL-Homolog 1; bildet mit PMS2 das Heterodimer MutL $\alpha$ und mit MLH3 das Heterodimer MutL $\beta$ .
DNA-PK	Komplex aus Ku70, Ku80 und DNA-PK <sub>CS</sub> , der an DNA-Enden bindet und eine Rolle bei der Regulation von NHEJ spielt.	MLH3	MutL-Homolog 3; bildet mit MLH1 das Heterodimer MutL $\beta$ .
DNA-PK <sub>CS</sub>	Große Proteinkinase und Untereinheit von DNA-PK, die unterschiedliche Proteine phosphorylieren kann.	Mre11	Zusammen mit Rad50 und Nbs1 Bestandteil des RMN-Komplexes, der an HR und NHEJ beteiligt ist. Bildet mit MSH2 das Heterodimer MutS $\beta$ , das an der Initiierung der MMR von Insertions-/Deletionsschleifen beteiligt ist.
ERCC1/XPF	Heterodimere strukturspezifische Endonuclease, die die 5'-Inzision in NER ausführt. ERCC1 wechselwirkt mit XPA.	MSH3	MutS-Homolog 3; bildet mit MSH2 das Heterodimer MutS $\alpha$ , das an der Initiierung der MMR von Fehlpaarungen und kleinen Insertions-/Deletionsschleifen beteiligt ist.
Flap-Endonuclease (Fen-1)	Strukturspezifische Endonuclease, die an der Verarbeitung des Folgestranges bei der Replikation und der Prozessierung von Flap-Strukturen beteiligt ist.	MSH6	MutS-Homolog 6; bildet mit MSH2 das Heterodimer MutS $\alpha$ , das an der Initiierung der MMR von Fehlpaarungen und kleinen Insertions-/Deletionsschleifen beteiligt ist. Bildet mit Rad50 und Mre11 den RMN-Komplex, der in der HR und NHEJ aktiv ist.
Globale Genreparatur (GGR)	NER-Prozess, der an einer beliebigen Stelle innerhalb des Genoms, außer in aktiv transkribierten Genen stattfindet.	Nbs1	Superhelicale Struktur, die Rad51 (und RecA) mit ssDNA ausbildet; das Nucleoproteinfilament ist die aktive Spezies im Stranginvasionsschritt der HR.
hHR23B	Stabilisiert XPC und enthält ubiquitinähnliche Domänen, die wahrscheinlich bei der Regulation der NER eine Rolle spielen.	Nucleoproteinfilament	Enzymatisch katalysiertes Herausrotieren einzelner Nucleotide aus der Doppelhelix in die aktive Tasche des Enzyms.
Holliday-Verbindung	Nach seinem Entdecker Robin Holliday benanntes Vierstrang-DNA-Molekül, bei dem das Reparaturtemplat mit dem beschädigten Strang nach der Reparatursynthese verbunden ist. Holliday-Verbindungen werden unter Wiederherstellung der beiden ursprünglichen dsDNA-Moleküle aufgelöst.	Nucleotid-Flipping	Flavin-abhängiges Reparaturenzym, das durch UV-Bestrahlung generierte Pyrimidindimere in die entsprechenden Monomere überführt. Am Short-Patch-Reparaturpfad der BER beteiligtes Enzym, das zusätzlich zur Polymeraseaktivität eine AP-Lyase-Aktivität aufweist.
		Photolyase	Wichtigste Polymerasen der DNA-Replikation; sie sind am Reparatursyntheseschritt der Long-Patch-BER, an der NER, der Fehlpaar-
		Polymerase $\beta$	
		Polymerase $\delta/\epsilon$	



Rad50	rungsreparatur und der homologen Rekombination beteiligt. Bildet zusammen mit Mre11 und Nbs1 den RMN-Komplex, der an HR und NHEJ beteiligt ist.	Transkriptionsgekoppelte Reparatur (TCR)	Spezialisierter NER-Pfad, der die rasche Reparatur von Addukten in aktiv transkribierten Genen vermittelt.
Rad51	Wichtigstes eukaryotisches Protein, das Strangaustauschreaktionen und homologe Paarungsreaktionen vermittelt.	V(D)J-Rekombination	Spezialisierter ortsspezifischer Rekombinationsprozess, der während der Reifung des Immunsystems zur Erzeugung von Diversität bei den Immunglobulinen und den T-Zellen-Rezeptoren aktiv ist.
Rad51-Paraloge	Ein Paralog ist ein Gen, das homolog zu einem anderen Gen im gleichen Genom ist. Säuger haben fünf Rad51-Paraloge (Rad51B, C, D und XRCC2, 3), die an der HR beteiligt sind.	XPA	Protein, das spezifisch an geschädigte DNA bindet und mit RPA, TFIIH und ERCC1 wechselwirkt. XPA ist wahrscheinlich an der Schadensüberprüfung nach der initialen Schadenserkenkung beteiligt.
Rad52	Protein, das DNA-Enden bindet und In-vitro-Aktivität zur Hybridisierung von ssDNA aufweist; stimuliert die Bildung des Nucleoproteinfilaments durch Rad51.	XPC	Schadenserkenkungsprotein der globalen Genreparatur. XPC bildet einen stabilen Komplex mit hHR23B und wird in der transkriptionsgekoppelten Reparatur nicht benötigt.
Rad54	DNA-abhängige ATPase mit Analogien zu Proteinen, die an der Chromatin-Remodellierung beteiligt sind und eine Änderung in der DNA-Topologie induzieren können. Rad54 wechselwirkt mit Rad51 und stimuliert dieses.	XPE/DDB1/2	Protein-Heterodimer aus p48 (DDB2) und p125 (DDB1), das spezifisch an geschädigte DNA bindet, jedoch für die In-vitro-Kernreaktion der NER nicht erforderlich ist.
Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	Unterschiedliche Sauerstoff-haltige Radikale, die im oxidativen Metabolismus auftreten und Schäden an Biomolekülen wie DNA und Proteinen verursachen.	XPG	Strukturspezifische Endonuclease, die die 3'-Inzision in der NER ausführt.
RecA	Bakterielles Protein, das die Strangaustauschreaktion und die homologe Paarung vermittelt.	XRCC1	An der BER beteiligtes Protein, das Polymerase $\beta$ mit DNA-Ligase III verbrückt.
RPA	ssDNA-bindendes Protein, das an der Replikation, HR, NER und MMR beteiligt ist; wechselwirkt mit vielen Proteinen, die an der Replikation und Reparatur beteiligt sind.	XRCC4	Am NHEJ beteiligtes Protein, das mit DNA-Ligase IV einen heterodimeren Komplex bildet und bei der Verbrückung von DNA-Enden eine Rolle spielen könnte.
Short-Patch-Reparatur	Vorherrschender Pfad der BER, bei dem ein einzelnes Nucleotid an die Stelle der beschädigten Base eingefügt wird.		
Sperrige DNA-Addukte (Bulky DNA Adducts)	Sterisch anspruchsvolle Addukte an DNA-Basen, die die DNA-Doppelhelix lokal verzerren und z.B. durch UV-Licht oder mutagene Substanzen in der Umwelt hervorgerufen werden.		
TFIIH	Aus neun Untereinheiten aufgebauter Faktor, der an der NER und der allgemeinen Transkription beteiligt ist; TFIIH enthält die Helicasen XPB und XPD, die in der NER für das Öffnen der DNA in unmittelbarer Umgebung zur Läsion maßgeblich sind.		

*Ich bin Rolf Buff für die Übersetzung dieses Aufsatzes ins Deutsche sehr dankbar. Ich möchte mich bei Steve Brunner, Greg Verdine, Tom Ellenberger, Brian Chapados, John Tainer, Titia Sixma und Jonathan Goldberg für Abbildungen, Greg Verdine und Roland Kanaar für die Mitteilung von Daten vor deren Veröffentlichung sowie Primo Schär und Josef Jiricny für die Durchsicht des Manuskripts bedanken. Die Forschung zur DNA-Reparatur im Laboratorium des Autors wird unterstützt vom Schweizerischen Nationalfonds, durch das Human Frontier Science Program, die Europäische Kommission, die Association for International Cancer Research, die Krebsliga des Kantons Zürich und die Sassella-Stiftung. O.D.S. ist START Fellow des Schweizerischen Nationalfonds und EMBO Young Investigator.*

Eingegangen am 11. März 2002 [A523]

- [1] B. B. Zhou, S. J. Elledge, *Nature* **2000**, *408*, 433.
- [2] J. Rouse, S. P. Jackson, *Science* **2002**, *297*, 547.
- [3] T. Rich, R. L. Allen, A. H. Wyllie, *Nature* **2000**, *407*, 777.
- [4] E. C. Friedberg, R. Wagner, M. Radman, *Science* **2002**, *296*, 1627.
- [5] P. M. J. Burgers, E. V. Koonin, E. Bruford, L. Blanco, K. C. Burtis, M. F. Christman, W. C. Copeland, E. C. Friedberg, F. Hanaoka, D. C. Hinkle, C. W. Lawrence, M. Nakanishi, H. Ohmori, L. Prakash, S. Prakash, C.-A. Reynaud, A. Sugino, T. Todo, Z. Wang, J.-C. Weill, R. Woodgate, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 43487; M. F. Goodman, B. Tiffin, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, *1*, 101; R. Woodgate, *Genes Dev.* **1999**, *13*, 2191.
- [6] E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede, *DNA Repair and Mutagenesis*, American Society for Microbiology, Washington, **1995**.
- [7] T. Lindahl, R. D. Wood, *Science* **1999**, *286*, 1897.
- [8] J. H. Hoeijmakers, *Nature* **2001**, *411*, 366.
- [9] O. D. Schärer, L. Deng, G. L. Verdine, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 526; S. S. David, S. D. Williams, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1221.
- [10] O. D. Schärer, J. Jiricny, *Bioessays* **2001**, *23*, 270.
- [11] O. D. Schärer, *Chimia* **2001**, *55*, 340.
- [12] J. T. Stivers, A. C. Drohat, *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *396*, 1.
- [13] T. Carell, L. T. Burgdorf, L. M. Kundu, M. Cichon, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 491.
- [14] B. Alberts, *Cell* **1998**, *92*, 291.
- [15] T. Lindahl, *Nature* **1993**, *362*, 709.
- [16] L. A. Loeb, B. D. Preston, *Annu. Rev. Genet.* **1986**, *20*, 201.
- [17] J. Nakamura, V. E. Walker, P. B. Upton, S. Y. Chiang, Y. W. Kow, J. A. Swenberg, *Cancer Res.* **1998**, *58*, 222.
- [18] L. A. Frederico, T. A. Kunkel, B. R. Shaw, *Biochemistry* **1990**, *29*, 2532; J. C. Shen, W. M. Rideout III, P. A. Jones, *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 972.
- [19] K. B. Beckman, B. N. Ames, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 19633; J. Cadet, C. D'Ham, T. Douki, J. P. Pouget, J. L. Ravanat, S. Sauvaigo, *Free Radical Res.* **1998**, *29*, 541; J. Cadet, T. Delatour, T. Douki, D. Gasparutto, J. P. Pouget, J. L. Ravanat, S. Sauvaigo, *Mutat. Res.* **1999**, *424*, 9.
- [20] C. J. Burrows, J. G. Muller, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109.
- [21] D. Wang, D. A. Kreuzer, J. M. Essigmann, *Mutat. Res.* **1998**, *400*, 99.
- [22] F. Le Page, E. E. Kwok, A. Avrutskaya, A. Gentil, S. A. Leadon, A. Sarasin, P. K. Cooper, *Cell* **2000**, *101*, 159.
- [23] L. J. Marnett, *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 361; L. J. Marnett, J. P. Plastaras, *Trends Genet.* **2001**, *17*, 214.
- [24] B. Rydberg, T. Lindahl, *EMBO J.* **1982**, *1*, 211; L. R. Barrows, P. N. Magee, *Carcinogenesis* **1982**, *3*, 349; R. Saffhill, G. P. Margison, P. J. O'Connor, *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *823*, 111.
- [25] M. Bignami, M. O'Driscoll, G. Aquilina, P. Karran, *Mutat. Res.* **2000**, *462*, 71.
- [26] H. Nilsen, H. E. Krokan, *Carcinogenesis* **2001**, *22*, 987.
- [27] J. L. Ravanat, T. Douki, J. Cadet, *J. Photochem. Photobiol. B* **2001**, *63*, 88.
- [28] V. Purohit, A. K. Basu, *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, *13*, 673; J. Szeliga, A. Dipple, *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 1; E. R. Jamieson, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467.
- [29] A. Sancar, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 43; R. D. Wood, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 23465; W. L. de Laat, N. G. Jaspers, J. H. Hoeijmakers, *Genes Dev.* **1999**, *13*, 768.
- [30] B. Giese, *Chimia* **2001**, *55*, 275; M. M. Greenberg, *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, *11*, 1235.
- [31] W. K. Pogozelski, T. D. Tullius, *Chem. Rev.* **1998**, *98*.
- [32] S. S. Wallace, *Radiat. Res.* **1998**, *150*, S60; B. M. Sutherland, P. V. Bennett, O. Sidorkina, J. Laval, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 103.
- [33] M. M. Cox, M. F. Goodman, K. N. Kreuzer, D. J. Sherratt, S. J. Sandler, K. J. Mariani, *Nature* **2000**, *404*, 37; S. C. Kowalczykowski, *Trends Biochem. Sci.* **2000**, *25*, 156.
- [34] D. C. van Gent, J. H. Hoeijmakers, R. Kanaar, *Nat. Rev. Genet.* **2001**, *2*, 196.
- [35] F. Paques, J. E. Haber, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1999**, *63*, 349.
- [36] K. K. Khanna, S. P. Jackson, *Nat. Genet.* **2001**, *27*, 247.
- [37] L. J. Niedernhofer, M. Riley, N. Schnetz-Boutaud, G. Sanduwaran, A. K. Chaudhary, G. R. Reddy, L. J. Marnett, *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, *10*, 556.
- [38] J. E. Hearst, *Chem. Res. Toxicol.* **1989**, *2*, 69; F. P. Gasparro, A. Felli, I. M. Schmitt, *Recent Results Cancer Res.* **1997**, *143*, 101.
- [39] P. D. Lawley, D. H. Phillips, *Mutat. Res.* **1996**, *355*, 13; S. R. Rajski, R. M. Williams, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2723.
- [40] M. L. Drunkert, R. Kanaar, *Mutat. Res.* **2001**, *486*, 217; P. J. McHugh, V. J. Spanswick, J. A. Hartley, *Lancet Oncol.* **2001**, *2*, 483.
- [41] G. B. Sancar, *Mutat. Res.* **2000**, *451*, 25.
- [42] A. E. Pegg, *Mutat. Res.* **2000**, *462*, 83.
- [43] D. S. Daniels, C. D. Mol, A. S. Arvai, S. Kanugula, A. E. Pegg, J. A. Tainer, *EMBO J.* **2000**, *19*, 1719; J. E. Wibley, A. E. Pegg, P. C. Moody, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 393.
- [44] L. L. Dumenco, E. Allay, K. Norton, S. L. Gerson, *Science* **1993**, *259*, 219; T. Tsuzuki, K. Sakumi, A. Shiraiishi, H. Kawate, H. Igarashi, T. Iwakuma, Y. Tominaga, S. Zhang, S. Shimizu, T. Ishikawa, *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 1215; H. Kawate, K. Sakumi, T. Tsuzuki, Y. Nakatsuru, T. Ishikawa, S. Takahashi, H. Takano, T. Noda, M. Sekiguchi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 5116.
- [45] D. B. Ludlum, *Cancer Invest.* **1997**, *15*, 588.
- [46] a) T. P. Brent, J. S. Remack, D. G. Smith, *Cancer Res.* **1987**, *47*, 6185; T. P. Brent, J. S. Remack, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 6779; P. E. Gonzaga, L. Harris, G. P. Margison, T. P. Brent, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 3961; P. E. Gonzaga, P. M. Potter, T. Q. Niu, D. Yu, D. B. Ludlum, J. A. Rafferty, G. P. Margison, T. P. Brent, *Cancer Res.* **1992**, *52*, 6052; b) D. M. Noll, N. D. Clarke, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 4025.
- [47] M. E. Dolan, R. C. Moschel, A. E. Pegg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 5368; R. C. Moschel, M. G. McDougall, M. E. Dolan, L. Stine, A. E. Pegg, *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 4486; M. E. Dolan, A. E. Pegg, *Clin. Cancer Res.* **1997**, *3*, 837; R. S. McElhinney, D. J. Donnelly, J. E. McCormick, J. Kelly, A. J. Watson, J. A. Rafferty, R. H. Elder, M. R. Middleton, M. A. Willington, T. B. H. McMurry, G. P. Margison, *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 5265.
- [48] H. S. Friedman, J. Pluda, J. A. Quinn, R. B. Ewesuedo, L. Long, A. H. Friedman, I. Cokgor, O. M. Colvin, M. M. Haglund, D. M. Ashley, J. N. Rich, J. Sampson, A. E. Pegg, R. C. Moschel, R. E. McLendon, J. M. Provenzale, E. S. Stewart, S. Tourt-Uhlig, A. M. Garcia-Turner, J. E. Herndon II, D. D. Bigner, M. E. Dolan, *J. Clin. Oncol.* **2000**, *18*, 3522; R. L. Schilsky, M. E. Dolan, D. Bertucci, R. B. Ewesuedo, N. J. Vogelzang, S. Mani, L. R. Wilson, M. J. Ratain, *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 3025; H. S. Friedman, *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 2967.
- [49] R. B. Roth, L. D. Samson, *Mutat. Res.* **2000**, *462*, 107; L. P. Encell, D. M. Landis, L. A. Loeb, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 143; K. Kleibl, G. P. Margison, *Neoplasia* **1998**, *45*, 181.
- [50] E. Seeberg, L. Eide, M. Bjoras, *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20*, 391; H. E. Krokan, R. Standal, G. Slupphaug, *Biochem. J.* **1997**, *325*, 1; H. E. Krokan, H. Nilsen, F. Skorpen, M. Otterlei, G. Slupphaug, *FEBS Lett.* **2000**, *476*, 73.
- [51] A. E. Vidal, I. D. Hickson, S. Boiteux, J. P. Radicella, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 1285.

- [52] S. L. Allinson, I. I. Dianova, G. L. Dianov, *EMBO J.* **2001**, *20*, 6919.
- [53] T. R. Waters, P. Gallinari, J. Jiricny, P. F. Swann, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 67; C. D. Mol, T. Izumi, S. Mitra, J. A. Tainer, *Nature* **2000**, *403*, 451.
- [54] U. Hardeland, R. Steinacher, J. Jiricny, P. Schär, *EMBO J.* **2002**, *21*, 1456.
- [55] Y. Kubota, R. A. Nash, A. Klungland, P. Schär, D. E. Barnes, T. Lindahl, *EMBO J.* **1996**, *15*, 6662; R. A. Bennett, D. M. Wilson III, D. Wong, B. Dimple, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 7166; A. E. Vidal, S. Boiteux, I. D. Hickson, J. P. Radicella, *EMBO J.* **2001**, *20*, 6530.
- [56] B. Pascucci, M. Stucki, Z. O. Jonsson, E. Dogliotti, U. Hubscher, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33696; Y. Matsumoto, K. Kim, J. Hurwitz, R. Gary, D. S. Levin, A. E. Tomkinson, M. S. Park, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 33703.
- [57] M. Otterlei, E. Warbrick, T. A. Nagelhus, T. Haug, G. Slupphaug, M. Akbari, P. A. Aas, K. Steinsbekk, O. Bakke, H. E. Krokan, *EMBO J.* **1999**, *18*, 3834.
- [58] H. Nilsen, K. A. Haushalter, P. Robins, D. E. Barnes, G. L. Verdine, T. Lindahl, *EMBO J.* **2001**, *20*, 4278.
- [59] B. Hendrich, U. Hardeland, H. H. Ng, J. Jiricny, A. Bird, *Nature* **1999**, *401*, 301; U. Hardeland, M. Bentele, T. Lettieri, R. Steinacher, J. Jiricny, P. Schär, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2001**, *68*, 235.
- [60] S. Um, M. Harbers, A. Benecke, B. Pierrat, R. Losson, P. Chambon, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 20728; B. Zhu, Y. Zheng, D. Hess, H. Anglikar, S. Schwarz, M. Siegmann, S. Thiry, J. P. Jost, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 5135.
- [61] S. Boiteux, J. P. Radicella, *Biochimie* **1999**, *81*, 59.
- [62] M. M. Slupska, W. M. Luther, J. H. Chiang, H. Yang, J. H. Miller, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 6210.
- [63] M. L. Michaels, C. Cruz, A. P. Grollman, J. H. Miller, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 7022; A. P. Grollman, M. Moriya, *Trends Genet.* **1993**, *9*, 246.
- [64] A. Klungland, M. Hoss, D. Gunz, A. Constantinou, S. G. Clarkson, P. W. Doetsch, P. H. Bolton, R. D. Wood, T. Lindahl, *Mol. Cell* **1999**, *3*, 33; T. Bessho, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 979.
- [65] T. K. Hazra, T. Izumi, I. Boldogh, B. Imhoff, Y. W. Kow, P. Jaruga, M. Dizdaroglu, S. Mitra, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 3523; V. Bandaru, S. Sunkara, S. S. Wallace, J. P. Bond, *DNA Repair* **2002**, *1*.
- [66] M. D. Wyatt, J. M. Allan, A. Y. Lau, T. E. Ellenberger, L. D. Samson, *Bioessays* **1999**, *21*, 668.
- [67] K. G. Berdal, R. F. Johansen, E. Seeberg, *EMBO J.* **1998**, *17*, 363.
- [68] B. J. Glassner, L. J. Rasmussen, M. T. Najarian, L. M. Posnick, L. D. Samson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 9997.
- [69] K. A. Haushalter, M. W. Todd Stukenberg, M. W. Kirschner, G. L. Verdine, *Curr. Biol.* **1999**, *9*, 174.
- [70] M. L. Dodson, M. L. Michaels, R. S. Lloyd, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 32709.
- [71] H. M. Nash, S. D. Bruner, O. D. Schärer, T. Kawate, T. A. Addona, E. Spooner, W. S. Lane, G. L. Verdine, *Curr. Biol.* **1996**, *6*, 968.
- [72] T. P. Hilbert, R. J. Boorstein, H. C. Kung, P. H. Bolton, D. Xing, R. P. Cunningham, G. W. Teebor, *Biochemistry* **1996**, *35*, 2505.
- [73] V. L. Schramm, B. A. Horenstein, P. C. Kline, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 18259; T. D. Heightman, A. T. Vasella, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 794; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 750; D. L. Zechel, S. G. Withers, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 11.
- [74] R. M. Werner, J. T. Stivers, *Biochemistry* **2000**, *39*, 14054.
- [75] B. Castaing, S. Boiteux, C. Zelwer, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 389; B. Castaing, J. L. Fourrey, N. Hervouet, M. Thomas, S. Boiteux, C. Zelwer, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 608.
- [76] O. D. Schärer, H. M. Nash, J. Jiricny, J. Laval, G. L. Verdine, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 8592.
- [77] O. D. Schärer, J.-Y. Ortholand, A. Ganesan, K. Ezaz-Nikpay, G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6623; L. Deng, O. D. Schärer, G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7865.
- [78] O. D. Schärer, G. L. Verdine, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10781; O. D. Schärer, T. Kawate, P. Gallinari, J. Jiricny, G. L. Verdine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 4878; S. L. Porello, S. D. Williams, H. Kuhn, M. L. Michels, S. S. David, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10684; C. L. Chepanoske, S. L. Porello, T. Fujiwara, H. Sugiyama, S. S. David, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 3197.
- [79] C. D. Mol, S. S. Parikh, C. D. Putnam, T. P. Lo, J. A. Tainer, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, *28*, 101; A. K. McCullough, M. L. Dodson, R. S. Lloyd, *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, *68*, 255; T. Hollis, A. Lau, T. Ellenberger, *Mutat. Res.* **2000**, *460*, 201; L. H. Pearl, *Mutat. Res.* **2000**, *460*, 165; T. Hollis, A. Lau, T. Ellenberger, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2001**, *68*, 305; D. J. Hosfield, D. S. Daniels, C. D. Mol, C. D. Putnam, S. S. Parikh, J. A. Tainer, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2001**, *68*, 315.
- [80] S. Klimasauskas, S. Kumar, R. J. Roberts, X. Cheng, *Cell* **1994**, *76*, 357; K. M. Reinisch, L. Chen, G. L. Verdine, W. N. Lipscomb, *Cell* **1995**, *82*, 143.
- [81] S. S. Parikh, C. D. Putnam, J. A. Tainer, *Mutat. Res.* **2000**, *460*, 183.
- [82] R. Savva, K. McAuley-Hecht, T. Brown, L. Pearl, *Nature* **1995**, *373*, 487; C. D. Mol, A. S. Arvai, G. Slupphaug, B. Kavli, I. Alseth, H. E. Krokan, J. A. Tainer, *Cell* **1995**, *80*, 869.
- [83] B. Kavli, G. Slupphaug, C. D. Mol, A. S. Arvai, S. B. Peterson, J. A. Tainer, H. E. Krokan, *EMBO J.* **1996**, *15*, 3442.
- [84] G. Slupphaug, C. D. Mol, B. Kavli, A. S. Arvai, H. E. Krokan, J. A. Tainer, *Nature* **1996**, *384*, 87.
- [85] S. S. Parikh, C. D. Mol, G. Slupphaug, S. Bharati, H. E. Krokan, J. A. Tainer, *EMBO J.* **1998**, *17*, 5214.
- [86] S. S. Parikh, G. Walcher, G. D. Jones, G. Slupphaug, H. E. Krokan, G. M. Blackburn, J. A. Tainer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 5083.
- [87] Y. L. Jiang, K. Kwon, J. T. Stivers, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 42347.
- [88] A. C. Drohat, J. T. Stivers, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1840.
- [89] A. C. Drohat, J. T. Stivers, *Biochemistry* **2000**, *39*, 11865.
- [90] A. R. Dinner, G. M. Blackburn, M. Karplus, *Nature* **2001**, *413*, 752.
- [91] A. Y. Lau, O. D. Schärer, L. Samson, G. L. Verdine, T. Ellenberger, *Cell* **1998**, *95*, 249.
- [92] A. Y. Lau, M. D. Wyatt, B. J. Glassner, L. D. Samson, T. Ellenberger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 13573.
- [93] S. D. Bruner, D. P. Norman, G. L. Verdine, *Nature* **2000**, *403*, 859.
- [94] G. L. Verdine, S. D. Bruner, *Chem. Biol.* **1997**, *4*, 329.
- [95] S. D. Bruner, D. P. G. Norman, J. C. Fromme, G. L. Verdine, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **2000**, *65*, 103.
- [96] L. Chen, K. A. Haushalter, C. M. Lieber, G. L. Verdine, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 345.
- [97] J. Dong, A. C. Drohat, J. T. Stivers, K. W. Pankiewicz, P. R. Carey, *Biochemistry* **2000**, *39*, 13241; J. T. Stivers, K. W. Pankiewicz, K. A. Watanabe, *Biochemistry* **1999**, *38*, 952.
- [98] D. M. Wilson III, L. H. Thompson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12754; S. Xanthoudakis, R. J. Smeyne, J. D. Wallace, T. Curran, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 8919; H. Gu, J. D. Marth, P. C. Orban, H. Mossmann, K. Rajewsky, *Science* **1994**, *265*, 103; R. S. Tebbbs, M. L. Flannery, J. J. Meneses, A. Hartmann, J. D. Tucker, L. H. Thompson, J. E. Cleaver, R. A. Pedersen, *Dev. Biol.* **1999**, *208*, 513.
- [99] B. P. Engelward, G. Weeda, M. D. Wyatt, J. L. Broekhof, J. de Wit, I. Donker, J. M. Allan, B. Gold, J. H. Hoeijmakers,

- L. D. Samson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 13087; B. Hang, B. Singer, G. P. Margison, R. H. Elder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 12869; A. Klungland, I. Rosewell, S. Hollenbach, E. Larsen, G. Daly, B. Epe, E. Seeberg, T. Lindahl, D. E. Barnes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 13300; O. Minowa, T. Arai, M. Hirano, Y. Monden, S. Nakai, M. Fukuda, M. Itoh, H. Takano, Y. Hippou, H. Aburatani, K. Masumura, T. Nohmi, S. Nishimura, T. Noda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 4156; M. Takao, S. Kanno, T. Shiromoto, R. Hasegawa, H. Ide, S. Ikeda, A. H. Sarker, S. Seki, J. Z. Xing, X. C. Le, M. Weinfeld, K. Kobayashi, J. Miyazaki, M. Muijtjens, J. H. J. Hoeijmakers, G. van der Horst, A. Yasui, *EMBO J.* **2002**, *21*, 3486; M. T. Ocampo, W. Chaung, D. R. Marenstein, M. K. Chan, A. Altamirano, A. K. Basu, R. J. Boorstein, R. P. Cunningham, G. W. Teebor, *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 6111.
- [100] H. Nilsen, I. Rosewell, P. Robins, C. F. Skjelbred, S. Andersen, G. Slupphaug, G. Daly, H. E. Krokan, T. Lindahl, D. E. Barnes, *Mol. Cell* **2000**, *5*, 1059.
- [101] E. C. Friedberg, L. B. Meira, *Mutat. Res.* **2000**, *459*, 243.
- [102] D. Gunz, M. T. Hess, H. Naegeli, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 25089.
- [103] M. T. Hess, U. Schwitter, M. Petretta, B. Giese, H. Naegeli, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6664; K. Sugawara, T. Okamoto, Y. Shimizu, C. Masutani, S. Iwai, F. Hanaoka, *Genes Dev.* **2001**, *15*, 507.
- [104] A. Aboussekhra, M. Biggerstaff, M. K. Shivji, J. A. Vilpo, V. Moncollin, V. N. Podust, M. Protic, U. Hübscher, J. M. Egly, R. D. Wood, *Cell* **1995**, *80*, 859; D. Mu, C. H. Park, T. Matsunaga, D. S. Hsu, J. T. Reardon, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 2415; S. J. Araujo, F. Tirode, F. Coin, H. Pospiech, J. E. Syvaaja, M. Stucki, U. Hübscher, J. M. Egly, R. D. Wood, *Genes Dev.* **2000**, *14*, 349; M. Araki, C. Masutani, T. Maekawa, Y. Watanabe, A. Yamada, R. Kusumoto, D. Sakai, K. Sugawara, Y. Ohkuma, F. Hanaoka, *Mutat. Res.* **2000**, *459*, 147.
- [105] J. Q. Svejstrup, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 21.
- [106] V. A. Bohr, C. A. Smith, D. S. Okumoto, P. C. Hanawalt, *Cell* **1985**, *40*, 359; I. Mellon, G. Spivak, P. C. Hanawalt, *Cell* **1987**, *51*, 241.
- [107] D. P. Batty, R. D. Wood, *Gene* **2000**, *241*, 193.
- [108] T. Ikegami, I. Kuraoka, M. Saijo, N. Kodo, Y. Kyogoku, K. Morikawa, K. Tanaka, M. Shirakawa, *Nat. Struct. Biol.* **1998**, *5*, 701; G. W. Buchko, S. Ni, B. D. Thrall, M. A. Kennedy, *Nucleic Acids Res.* **1998**, *26*, 2779; G. W. Buchko, C. S. Tung, K. McAteer, N. G. Isern, L. D. Spicer, M. A. Kennedy, *Nucleic Acids Res.* **2001**, *29*, 2635; A. Bochkarev, R. A. Pfuetzner, A. M. Edwards, L. Frappier, *Nature* **1997**, *385*, 176; A. Bochkarev, E. Bochkareva, L. Frappier, A. M. Edwards, *EMBO J.* **1999**, *18*, 4498; E. Bochkareva, V. Belegu, S. Korolev, A. Bochkarev, *EMBO J.* **2001**, *20*, 612; P. Schultz, S. Fribourg, A. Poterszman, V. Mallouh, D. Moras, J. M. Egly, *Cell* **2000**, *102*, 599; W. H. Chang, R. D. Kornberg, *Cell* **2000**, *102*, 609.
- [109] K. Sugawara, J. M. Ng, C. Masutani, S. Iwai, P. J. van der Spek, A. P. Eker, F. Hanaoka, D. Bootsma, J. H. Hoeijmakers, *Mol. Cell* **1998**, *2*, 223.
- [110] E. Evans, J. G. Moggs, J. R. Hwang, J. M. Egly, R. D. Wood, *EMBO J.* **1997**, *16*, 6559.
- [111] M. Wakasugi, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6669.
- [112] M. Wakasugi, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 18759.
- [113] M. Volker, M. J. Mone, P. Karmakar, A. van Hoffen, W. Schul, W. Vermeulen, J. H. Hoeijmakers, R. van Driel, A. A. van Zee-land, L. H. Mullenders, *Mol. Cell* **2001**, *8*, 213.
- [114] M. Yokoi, C. Masutani, T. Maekawa, K. Sugawara, Y. Ohkuma, F. Hanaoka, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 9870.
- [115] N. Iyer, M. S. Reagan, K. J. Wu, B. Canagarajah, E. C. Friedberg, *Biochemistry* **1996**, *35*, 2157; S. Nocentini, F. Coin, M. Saijo, K. Tanaka, J. M. Egly, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 22991; S. J. Araujo, E. A. Nigg, R. D. Wood, *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 2281.
- [116] M. Missura, T. Buterin, R. Hindges, U. Hübscher, J. Kaspar-kova, V. Brabec, H. Naegeli, *EMBO J.* **2001**, *20*, 3554.
- [117] L. Li, S. J. Elledge, C. A. Peterson, E. S. Bales, R. J. Legerski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 5012; L. Li, C. A. Peterson, X. Lu, R. J. Legerski, *Mol. Cell. Biol.* **1995**, *15*, 1993; C. H. Park, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 5017; M. Saijo, I. Kuraoka, C. Masutani, F. Hanaoka, K. Tanaka, *Nucleic Acids Res.* **1996**, *24*, 4719.
- [118] Z. He, L. A. Henricksen, M. S. Wold, C. J. Ingles, *Nature* **1995**, *374*, 566; W. L. de Laat, E. Appeldoorn, K. Sugawara, E. Weterings, N. G. Jaspers, J. H. Hoeijmakers, *Genes Dev.* **1998**, *12*, 2598.
- [119] A. M. Sijbers, W. L. de Laat, R. R. Ariza, M. Biggerstaff, Y.-F. Wei, J. G. Moggs, K. C. Carter, B. K. Shell, E. Evans, M. C. de Jong, S. Rademakers, J. de Rooij, N. G. J. Jaspers, J. H. J. Hoeijmakers, R. D. Wood, *Cell* **1996**, *86*, 811.
- [120] A. O'Donovan, A. A. Davies, J. G. Moggs, S. C. West, R. D. Wood, *Nature* **1994**, *371*, 432.
- [121] T. Matsunaga, D. Mu, C. H. Park, J. T. Reardon, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 20862; M. Wakasugi, J. T. Reardon, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16030.
- [122] E. Evans, J. Fellows, A. Coffey, R. D. Wood, *EMBO J.* **1997**, *16*, 625; M. R. Lieber, *Bioessays* **1997**, *19*, 233; A. Constantinou, D. Gunz, E. Evans, P. Lalle, P. A. Bates, R. D. Wood, S. G. Clarkson, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 5637.
- [123] W. L. de Laat, E. Appeldoorn, N. G. J. Jaspers, J. H. J. Hoeij-makers, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 7835.
- [124] J. H. Enzlin, O. D. Schärer, *EMBO J.* **2002**, *21*, 2045.
- [125] J. Y. Tang, B. J. Hwang, J. M. Ford, P. C. Hanawalt, G. Chu, *Mol. Cell* **2000**, *5*, 737; M. Wakasugi, M. Shimizu, H. Morioka, S. Linn, O. Nikaido, T. Matsunaga, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 15434; M. Wakasugi, A. Kawashima, H. Morioka, S. Linn, A. Sancar, T. Mori, O. Nikaido, T. Matsunaga, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 1637.
- [126] D. Mu, D. S. Hsu, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 8285; D. Mu, A. Sancar, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 7570.
- [127] A. B. Houtsmuller, S. Rademakers, A. L. Nigg, D. Hoogstraten, J. H. Hoeijmakers, W. Vermeulen, *Science* **1999**, *284*, 958.
- [128] D. Bootsma, K. H. Kraemer, J. E. Cleaver, J. H. J. Hoeijmakers in *The Genetic Basis of Cancer* (Hrsg.: B. Vogelstein, K. W. Kinzler), McGraw-Hill, New York, **1998**, S. 245.
- [129] J. de Boer, J. H. Hoeijmakers, *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 453.
- [130] E. Bergmann, J. M. Egly, *Trends Genet.* **2001**, *17*, 279.
- [131] A. J. van Gool, G. T. van der Horst, E. Citterio, J. H. Hoeijma-kers, *EMBO J.* **1997**, *16*, 4155.
- [132] P. K. Cooper, T. Nospikel, S. G. Clarkson, S. A. Leadon, *Science* **1997**, *275*, 990.
- [133] W. Vermeulen, E. Bergmann, J. Auriol, S. Rademakers, P. Frit, E. Appeldoorn, J. H. Hoeijmakers, J. M. Egly, *Nat. Genet.* **2000**, *26*, 307.
- [134] W. Vermeulen, S. Rademakers, N. G. Jaspers, E. Appeldoorn, A. Raams, B. Klein, W. J. Kleijer, L. K. Hansen, J. H. Hoeij-makers, *Nat. Genet.* **2001**, *27*, 299.
- [135] J. McWhir, J. Selfridge, D. J. Harrison, S. Squires, D. W. Melton, *Nat. Genet.* **1993**, *5*, 217; G. Weeda, I. Donker, J. de Wit, H. Morreau, R. Janssens, C. J. Vissers, A. Nigg, H. van Steeg, D. Bootsma, J. H. J. Hoeijmakers, *Curr. Biol.* **1997**, *7*, 427.
- [136] T. A. Kunkel, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 18251.
- [137] P. Modrich, *Annu. Rev. Genet.* **1991**, *25*, 229.
- [138] P. Modrich, R. Lahue, *Annu. Rev. Biochem.* **1996**, *65*, 101.
- [139] J. Jiricny, *EMBO J.* **1998**, *17*, 6427.
- [140] R. S. Lahue, K. G. Au, P. Modrich, *Science* **1989**, *245*, 160.
- [141] S. S. Su, R. S. Lahue, K. G. Au, P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 6829.

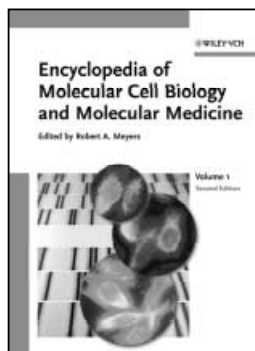


- [142] K. M. Welsh, A. L. Lu, S. Clark, P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 15624; K. G. Au, K. Welsh, P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 12142.
- [143] B. D. Harfe, S. Jinks-Robertson, *Annu. Rev. Genet.* **2000**, 34, 359.
- [144] P. Hsieh, *Mutat. Res.* **2001**, 486, 71.
- [145] I. Iaccarino, G. Marra, F. Palombo, J. Jiricny, *EMBO J.* **1998**, 17, 2677; I. Iaccarino, F. Palombo, J. Drummond, N. F. Totty, J. J. Hsuan, P. Modrich, J. Jiricny, *Curr. Biol.* **1996**, 6, 484; F. Palombo, I. Iaccarino, E. Nakajima, M. Ikejima, T. Shimada, J. Jiricny, *Curr. Biol.* **1996**, 6, 1181; 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; J. Genschel, S. J. Littman, J. T. Drummond, P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 19895.
- [146] L. J. Blackwell, D. Martik, K. P. Bjornson, E. S. Bjornson, P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 32055; L. J. Blackwell, K. P. Bjornson, D. J. Allen, P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 34339; S. Gradia, D. Subramanian, T. Wilson, S. Acharya, A. Makhov, J. Griffith, R. Fishel, *Mol. Cell* **1999**, 3, 255; I. Iaccarino, G. Marra, P. Dufner, J. Jiricny, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 2080.
- [147] D. J. Allen, A. Makhov, M. Grilley, J. Taylor, R. Thresher, P. Modrich, J. D. Griffith, *EMBO J.* **1997**, 16, 4467.
- [148] P. Szankasi, G. R. Smith, *Science* **1995**, 267, 1166; D. X. Tishkoff, N. Filosi, G. M. Gaida, R. D. Kolodner, *Cell* **1997**, 88, 253; P. T. Tran, J. A. Simon, R. M. Liskay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 9760.
- [149] A. Umar, A. B. Buermeyer, J. A. Simon, D. C. Thomas, A. B. Clark, R. M. Liskay, T. A. Kunkel, *Cell* **1996**, 87, 65; R. E. Johnson, G. K. Kovvali, S. N. Guzder, N. S. Amin, C. Holm, Y. Habraken, P. Sung, L. Prakash, S. Prakash, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 27987; J. C. Eissenberg, R. Ayyagari, X. V. Gomes, P. M. Burgers, *Mol. Cell. Biol.* **1997**, 17, 6367; H. E. Kleczkowska, G. Marra, T. Lettieri, J. Jiricny, *Genes Dev.* **2001**, 15, 724.
- [150] M. H. Lamers, A. Perrakis, J. H. Enzlin, H. H. Winterwerp, N. de Wind, T. K. Sixma, *Nature* **2000**, 407, 711.
- [151] G. Obmolova, C. Ban, P. Hsieh, W. Yang, *Nature* **2000**, 407, 703.
- [152] V. A. Malkov, I. Biswas, R. D. Camerini-Otero, P. Hsieh, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 23811; J. Bowers, T. Sokolsky, T. Quach, E. Alani, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 16115; P. Dufner, G. Marra, M. Raschle, J. Jiricny, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 36550; R. Das Gupta, R. D. Kolodner, *Nat. Genet.* **2000**, 24, 53.
- [153] M. J. Schofield, F. E. Brownell, S. Nayak, C. Du, E. T. Kool, P. Hsieh, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 45505; K. Drotschmann, W. Yang, F. E. Brownell, E. T. Kool, T. A. Kunkel, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 46225.
- [154] J. Jiricny, M. Nystrom-Lahti, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2000**, 10, 157.
- [155] R. Fishel, M. K. Lescoe, M. R. Rao, N. G. Copeland, N. A. Jenkins, J. Garber, M. Kane, R. Kolodner, *Cell* **1993**, 75, 1027; F. S. Leach, N. C. Nicolaides, N. Papadopoulos, B. Liu, J. Jen, R. Parsons, P. Peltomaki, P. Sistonen, L. A. Aaltonen, M. Nystrom-Lahti, *Cell* **1993**, 75, 1215; 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; C. E. Bronner, S. M. Baker, P. T. Morrison, G. Warren, L. G. Smith, M. K. Lescoe, M. Kane, C. Earabino, J. Lipford, A. Lindblom, P. Tannergård, R. J. Bollag, A. R. Godwin, D. C. Ward, M. Nordenskjöld, R. Fishel, R. Kolodner, R. M. Liskay, *Nature* **1994**, 368, 258; N. Papadopoulos, N. C. Nicolaides, Y.-F. Wei, S. M. Ruben, K. C. Carter, C. A. Rosen, W. A. Haseltine, R. D. Fleischmann, C. M. Fraser, M. D. Adams, J. C. Venter, S. R. Hamilton, G. M. Petersen, P. Watson, H. T. Lynch, P. Peltomaki, J.-P. Mecklin, A. de la Chapelle, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, *Science* **1994**, 263, 1625; N. C. Nicolaides, N. Papadopoulos, B. Liu, Y. F. Wei, K. C. Carter, S. M. Ruben, C. A. Rosen, W. A. Haseltine, R. D. Fleischmann, C. M. Fraser, M. D. Adams, J. C. Venter, S. R. Hamilton, G. M. Petersen, A. de la Chapelle, B. Vogelstein, K. W. Kinzler, *Nature* **1994**, 371, 75; N. Papadopoulos, N. C. Nicolaides, B. Liu, R. Parsons, C. Lengauer, F. Palombo, A. D'Arrigo, S. Markowitz, J. K. Willson, K. W. Kinzler, J. Jiricny, B. Vogelstein, *Science* **1995**, 268, 1915.
- [156] W. Edelmann, K. Yang, A. Umar, J. Heyer, K. Lau, K. Fan, W. Liedtke, P. E. Cohen, M. F. Kane, J. R. Lipford, N. Yu, G. F. Crouse, J. W. Pollard, T. Kunkel, M. Lipkin, R. Kolodner, R. Kucherlapati, *Cell* **1997**, 91, 467.
- [157] N. de Wind, M. Dekker, N. Claij, L. Jansen, Y. van Klink, M. Radman, G. Riggins, M. van der Valk, K. van't Wout, H. te Riele, *Nat. Genet.* **1999**, 23, 359.
- [158] G. M. Li, *Oncol. Res.* **1999**, 11, 393.
- [159] S. C. Kowalczykowski, D. A. Dixon, A. K. Eggleston, S. D. Lauder, W. M. Rehauer, *Microbiol. Rev.* **1994**, 58, 401.
- [160] G. A. Cromie, J. C. Connelly, D. R. Leach, *Mol. Cell* **2001**, 8, 1163; M. Modesti, R. Kanaar, *Genome Biol.* **2001**, 2.
- [161] S. C. West, *Annu. Rev. Genet.* **1997**, 31, 213.
- [162] J. C. Game, *Semin. Cancer Biol.* **1993**, 4, 73.
- [163] E. Van Dyck, A. Z. Stasiak, A. Stasiak, S. C. West, *Nature* **1999**, 398, 728; C. A. Parsons, P. Baumann, E. Van Dyck, S. C. West, *EMBO J.* **2000**, 19, 4175; A. Z. Stasiak, E. Larquet, A. Stasiak, S. Muller, A. Engel, E. Van Dyck, S. C. West, E. H. Egelman, *Curr. Biol.* **2000**, 10, 337.
- [164] K. M. Trujillo, S. S. Yuan, E. Y. Lee, P. Sung, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 21447; T. T. Paull, M. Gellert, *Mol. Cell* **1998**, 1, 969.
- [165] D. A. Bressan, B. K. Baxter, J. H. Petrini, *Mol. Cell. Biol.* **1999**, 19, 7681.
- [166] H. Tsubouchi, H. Ogawa, *Mol. Biol. Cell* **2000**, 11, 2221; S. Moreau, E. A. Morgan, L. S. Symington, *Genetics* **2001**, 159, 1423.
- [167] T. Ogawa, X. Yu, A. Shinohara, E. H. Egelman, *Science* **1993**, 259, 1896; P. Sung, *Science* **1994**, 265, 1241; P. Baumann, F. E. Benson, S. C. West, *Cell* **1996**, 87, 757; R. C. Gupta, L. R. Bazemore, E. I. Golub, C. M. Radding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 463; P. Baumann, S. C. West, *Trends Biochem. Sci.* **1998**, 23, 247.
- [168] F. E. Benson, P. Baumann, S. C. West, *Nature* **1998**, 391, 401; J. H. New, T. Sugiyama, E. Zaitseva, S. C. Kowalczykowski, *Nature* **1998**, 391, 407; A. Shinohara, T. Ogawa, *Nature* **1998**, 391, 404; P. Sung, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 28194.
- [169] P. Sung, *Genes Dev.* **1997**, 11, 1111.
- [170] J. Thacker, *Trends Genet.* **1999**, 15, 166; L. H. Thompson, D. Schild, *Mutat. Res.* **2001**, 477, 131.
- [171] N. Liu, J. E. Lamerdin, R. S. Tebbs, D. Schild, J. D. Tucker, M. R. Shen, K. W. Brookman, M. J. Siciliano, C. A. Walter, W. Fan, L. S. Narayana, Z.-Q. Zhou, A. W. Adamson, K. J. Sorensen, D. J. Chen, N. J. Jones, L. H. Thompson, *Mol. Cell* **1998**, 1, 783; R. D. Johnson, N. Liu, M. Jasin, *Nature* **1999**, 401, 397; A. J. Pierce, R. D. Johnson, L. H. Thompson, M. Jasin, *Genes Dev.* **1999**, 13, 2633; M. Takata, M. S. Sasaki, E. Sonoda, T. Fukushima, C. Morrison, J. S. Albala, S. M. Swagemakers, R. Kanaar, L. H. Thompson, S. Takeda, *Mol. Cell. Biol.* **2000**, 20, 6476; M. Takata, M. S. Sasaki, S. Tachiiri, T. Fukushima, E. Sonoda, D. Schild, L. H. Thompson, S. Takeda, *Mol. Cell. Biol.* **2001**, 21, 2858.
- [172] J. P. Braybrooke, K. G. Spink, J. Thacker, I. D. Hickson, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 29100; D. Schild, Y. Lio, D. W. Collins, T. Tsomondo, D. J. Chen, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 16443; K. A. Miller, D. M. Yoshikawa, I. R. McConnell, R. Clark, D. Schild, J. S. Albala, *J. Biol. Chem.* **2001**, 13, 13; H. Kurumizaka, S. Ikawa, M. Nakada, K. Eda, W. Kagawa, M. Takata, S. Takeda, S. Yokoyama, T. Shibata, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 5538; J. Y. Masson, M. C. Tarsounas, A. Z. Stasiak, A. Stasiak, R. Shah, M. J. McIlwraith, F. E. Benson, S. C. West, *Genes Dev.*

- 2001, 15, 3296; S. Sigurdsson, S. Van Komen, W. Bussen, D. Schild, J. S. Albala, P. Sung, *Genes Dev.* **2001**, 15, 3308; N. Liu, D. Schild, M. P. Thelen, L. H. Thompson, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 1009; C. Wiese, D. W. Collins, J. S. Albala, L. H. Thompson, A. Kronenberg, D. Schild, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 1001; H. Kurumizaka, S. Ikawa, M. Nakada, R. Enomoto, W. Kagawa, T. Kinebuchi, M. Yamazoe, S. Yokoyama, T. Shibata, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 14315.
- [173] H. Jiang, Y. Xie, P. Houston, K. Stemke-Hale, U. H. Mortensen, R. Rothstein, T. Kodadek, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 33181; B. Clever, H. Interthal, J. Schmuckli-Maurer, J. King, M. Sigrüst, W. D. Heyer, *EMBO J.* **1997**, 16, 2535; T. L. Tan, J. Essers, E. Citterio, S. M. Swagemakers, J. de Wit, F. E. Benson, J. H. Hoeijmakers, R. Kanaar, *Curr. Biol.* **1999**, 9, 325; G. Petukhova, S. Stratton, P. Sung, *Nature* **1998**, 393, 91.
- [174] S. M. Swagemakers, J. Essers, J. de Wit, J. H. Hoeijmakers, R. Kanaar, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 28292.
- [175] J. Essers, R. W. Hendriks, J. Wesoly, C. E. Beerens, B. Smit, J. H. Hoeijmakers, C. Wyman, M. L. Dronkert, R. Kanaar, *DNA Repair* **2002**, 1, 779.
- [176] D. Ristic, C. Wyman, C. Paulusma, R. Kanaar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 8454; S. Van Komen, G. Petukhova, S. Sigurdsson, S. Stratton, P. Sung, *Mol. Cell* **2000**, 6, 563.
- [177] A. K. Eggleston, A. H. Mitchell, S. C. West, *Cell* **1997**, 89, 607.
- [178] A. Constantinou, A. A. Davies, S. C. West, *Cell* **2001**, 104, 259.
- [179] M. N. Boddy, P.-H. L. Gaillard, W. H. McDonald, P. Shanahan, J. R. Yates III, P. Russell, *Cell* **2001**, 107, 537; X.-B. Chen, R. Melchionna, C.-M. Denis, P.-H. Gaillard, A. Blasina, I. Van de Weyer, M. N. Boddy, P. Russell, J. Vialard, C. H. McGowan, *Mol. Cell* **2001**, 8, 1117.
- [180] A. Constantinou, X. B. Chen, C. H. McGowan, S. C. West, *EMBO J.* **2002**, 21, 5577.
- [181] S. P. Jackson, *Carcinogenesis* **2002**, 23, 687.
- [182] J. N. Snouwaert, L. C. Gowen, A. M. Latour, A. R. Mohn, A. Xiao, L. DiBiase, B. H. Koller, *Oncogene* **1999**, 18, 7900; M. E. Moynahan, J. W. Chiu, B. H. Koller, M. Jasin, *Mol. Cell* **1999**, 4, 511; M. E. Moynahan, A. J. Pierce, M. Jasin, *Mol. Cell* **2001**, 7, 263.
- [183] H. Yang, P. D. Jeffrey, J. Miller, E. Kinnucan, Y. Sun, N. H. Thoma, N. Zheng, P. L. Chen, W. H. Lee, N. P. Pavletich, *Science* **2002**, 297, 1837.
- [184] A. A. Davies, J. Y. Masson, M. J. McIlwraith, A. Z. Stasiak, A. Stasiak, A. R. Venkitaraman, S. C. West, *Mol. Cell* **2001**, 7, 273.
- [185] L. Pellegrini, D. S. Yu, T. Lo, S. Anand, M. Lee, T. L. Blundell, A. R. Venkitaraman, *Nature* **2002**, 420, 287.
- [186] A. R. Venkitaraman, *Cell* **2002**, 108, 171.
- [187] P. A. Jeggo, *Radiat. Res.* **1998**, 150, S80.
- [188] S. E. Critchlow, S. P. Jackson, *Trends Biochem. Sci.* **1998**, 23, 394; J. E. Haber, *Trends Genet.* **2000**, 16, 259.
- [189] W. S. Dynan, S. Yoo, *Nucleic Acids Res.* **1998**, 26, 1551; G. C. Smith, S. P. Jackson, *Genes Dev.* **1999**, 13, 916.
- [190] L. Chen, K. Trujillo, W. Ramos, P. Sung, A. E. Tomkinson, *Mol. Cell* **2001**, 8, 1105.
- [191] J. Huang, W. S. Dynan, *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 667; W. Goedecke, M. Eijpe, H. H. Offenberg, M. van Aalderen, C. Heyting, *Nat. Genet.* **1999**, 23, 194; S. A. Nick McElhinny, C. M. Snowden, J. McCarville, D. A. Ramsden, *Mol. Cell. Biol.* **2000**, 20, 2996.
- [192] M. S. Junop, M. Modesti, A. Guarne, R. Ghirlando, M. Gellert, W. Yang, *EMBO J.* **2000**, 19, 5962; B. L. Sibanda, S. E. Critchlow, J. Begun, X. Y. Pei, S. P. Jackson, T. L. Blundell, L. Pellegrini, *Nat. Struct. Biol.* **2001**, 8, 1015; K. P. Hopfner, A. Karcher, L. Craig, T. T. Woo, J. P. Carney, J. A. Tainer, *Cell* **2001**, 105, 473; K. P. Hopfner, A. Karcher, D. S. Shin, L. Craig, L. M. Arthur, J. P. Carney, J. A. Tainer, *Cell* **2000**, 101, 789.
- [193] M. de Jager, J. van Noort, D. C. van Gent, C. Dekker, R. Kanaar, C. Wyman, *Mol. Cell* **2001**, 8, 1129.
- [194] D. Moshous, I. Callebaut, R. de Chasseval, B. Corneo, M. Cavazzana-Calvo, F. Le Deist, I. Tezcan, O. Sanal, Y. Bertrand, N. Philippe, A. Fischer, J.-P. de Villartay, *Cell* **2001**, 105, 177; Y. Ma, U. Pannicke, K. Schwarz, M. R. Lieber, *Cell* **2002**, 108, 781; X. Wu, T. E. Wilson, M. R. Lieber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 1303.
- [195] U. Grawunder, M. Wilm, X. Wu, P. Kulesza, T. E. Wilson, M. Mann, M. R. Lieber, *Nature* **1997**, 388, 492; S. E. Critchlow, R. P. Bowater, S. P. Jackson, *Curr. Biol.* **1997**, 7, 588; G. Herrmann, T. Lindahl, P. Schär, *EMBO J.* **1998**, 17, 4188; S. H. Teo, S. P. Jackson, *Curr. Biol.* **2000**, 10, 165.
- [196] J. R. Walker, R. A. Corpina, J. Goldberg, *Nature* **2001**, 412, 607.
- [197] S. Yoo, A. Kimzey, W. S. Dynan, *J. Biol. Chem.* **1999**, 274, 20034.
- [198] Y. Shiloh, *Annu. Rev. Genet.* **1997**, 31, 635; J. P. Carney, R. S. Maser, H. Olivares, E. M. Davis, M. Le Beau, J. R. Yates III, L. Hays, W. F. Morgan, J. H. Petrini, *Cell* **1998**, 93, 477; R. Varon, C. Vissinga, M. Platzer, K. M. Cerosaletti, K. H. Chrzanowska, K. Saar, G. Beckmann, E. Seemanova, P. R. Cooper, N. J. Nowak, M. Stumm, C. M. R. Weemaes, R. A. Gatti, R. K. Wilson, M. Digweed, A. Rosenthal, K. Sperling, P. Concannon, A. Reis, *Cell* **1998**, 93, 467; G. S. Stewart, R. S. Maser, T. Stankovic, D. A. Bressan, M. I. Kaplan, N. G. Jaspers, A. Raams, P. J. Byrd, J. H. Petrini, A. M. Taylor, *Cell* **1999**, 99, 577; M. B. Kastan, D. S. Lim, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2000**, 1, 179.
- [199] Y. Xiao, D. T. Weaver, *Nucleic Acids Res.* **1997**, 25, 2985; G. Luo, M. S. Yao, C. F. Bender, M. Mills, A. R. Bladl, A. Bradley, J. H. Petrini, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 7376.
- [200] D. O. Ferguson, F. W. Alt, *Oncogene* **2001**, 20, 5572; A. J. Pierce, J. M. Stark, F. D. Araujo, M. E. Moynahan, M. Berwick, M. Jasin, *Trends Cell Biol.* **2001**, 11, S52.
- [201] D. O. Ferguson, J. M. Sekiguchi, S. Chang, K. M. Frank, Y. Gao, R. A. DePinho, F. W. Alt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 6630; M. J. Dfilippantonio, J. Zhu, H. T. Chen, E. Meffre, M. C. Nussenzweig, E. E. Max, T. Ried, A. Nussenzweig, *Nature* **2000**, 404, 510; Z. E. Karanjawala, U. Grawunder, C. L. Hsieh, M. R. Lieber, *Curr. Biol.* **1999**, 9, 1501.
- [202] K. M. Frank, N. E. Sharpless, Y. Gao, J. M. Sekiguchi, D. O. Ferguson, C. Zhu, J. P. Manis, J. Horner, R. A. DePinho, F. W. Alt, *Mol. Cell* **2000**, 5, 993; Y. Gao, D. O. Ferguson, W. Xie, J. P. Manis, J. Sekiguchi, K. M. Frank, J. Chaudhuri, J. Horner, R. A. DePinho, F. W. Alt, *Nature* **2000**, 404, 897; Y. Lee, D. E. Barnes, T. Lindahl, P. J. McKinnon, *Genes Dev.* **2000**, 14, 2576.
- [203] E. Riballo, S. E. Critchlow, S. H. Teo, A. J. Doherty, A. Priestley, B. Broughton, B. Kysela, H. Beamish, N. Plowman, C. F. Arlett, A. R. Lehmann, S. P. Jackson, P. A. Jeggo, *Curr. Biol.* **1999**, 9, 699; E. Riballo, A. J. Doherty, Y. Dai, T. Stiff, M. A. Oettinger, P. A. Jeggo, B. Kysela, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 31124; M. O'Driscoll, K. M. Cerosaletti, P. M. Girard, Y. Dai, M. Stumm, B. Kysela, B. Hirsch, A. Gennery, S. E. Palmer, J. Seidel, R. A. Gatti, R. Varon, M. A. Oettinger, H. Neitzel, P. A. Jeggo, P. Concannon, *Mol. Cell* **2001**, 8, 1175.
- [204] D. S. Lim, P. Hasty, *Mol. Cell. Biol.* **1996**, 16, 7133; T. Tsuzuki, Y. Fujii, K. Sakumi, Y. Tominaga, K. Nakao, M. Sekiguchi, A. Matsushiro, Y. Yoshimura, T. Morita, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 6236.
- [205] E. Sonoda, M. S. Sasaki, J. M. Buerstedde, O. Bezzubova, A. Shinohara, H. Ogawa, M. Takata, Y. Yamaguchi-Iwai, S. Takeda, *EMBO J.* **1998**, 17, 598.
- [206] Z. Shu, S. Smith, L. Wang, M. C. Rice, E. B. Kmiec, *Mol. Cell. Biol.* **1999**, 19, 8686; B. Deans, C. S. Griffin, M. Maconochie, J. Thacker, *EMBO J.* **2000**, 19, 6675; D. L. Pittman, J. C. Schimenti, *Genesis* **2000**, 26, 167.
- [207] T. Rijkers, J. Van Den Ouweland, B. Morolli, A. G. Rolink, W. M. Baarends, P. P. Van Sloun, P. H. Lohman, A. Pastink, *Mol. Cell. Biol.* **1998**, 18, 6423; Y. Yamaguchi-Iwai, E. Sonoda,

- J. M. Buerstedde, O. Bezzubova, C. Morrison, M. Takata, A. Shinohara, S. Takeda, *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 6430.
- [208] A. Fujimori, S. Tachiiri, E. Sonoda, L. H. Thompson, P. K. Dhar, M. Hiraoka, S. Takeda, Y. Zhang, M. Reth, M. Takata, *EMBO J.* **2001**, *20*, 5513.
- [209] J. Essers, R. W. Hendriks, S. M. Swagemakers, C. Troelstra, J. de Wit, D. Bootsma, J. H. Hoeijmakers, R. Kanaar, *Cell* **1997**, *89*, 195.
- [210] J. Essers, H. van Steeg, J. de Wit, S. M. Swagemakers, M. Vermeij, J. H. Hoeijmakers, R. Kanaar, *EMBO J.* **2000**, *19*, 1703; M. Takata, M. S. Sasaki, E. Sonoda, C. Morrison, M. Hashimoto, H. Utsumi, Y. Yamaguchi-Iwai, A. Shinohara, S. Takeda, *EMBO J.* **1998**, *17*, 5497.
- [211] P. Mohaghegh, I. D. Hickson, *Hum. Mol. Genet.* **2001**, *10*, 741; J. Shen, L. A. Loeb, *Mech. Ageing Dev.* **2001**, *122*, 921; R. M. Brosh, V. A. Bohr, *Exp. Gerontol.* **2002**, *37*, 491.
- [212] H. Joenje, K. J. Patel, *Nat. Rev. Genet.* **2001**, *2*, 446; M. Grompe, A. D'Andrea, *Hum. Mol. Genet.* **2001**, *10*, 2253.
- [213] Note added in Proof: Eine Reihe neuester Studien hat die Existenz eines weiteren direkten Reparaturpfades, der von Bakterien bis zum Menschen konserviert ist, aufgezeigt: die oxidative Demethylierung von 1-Methyladenin und 3-Methylcytosin durch das AlkB-Protein: S. C. Trewick, T. F. Henshaw, R. P. Hausinger, T. Lindahl, B. Sedgwick, *Nature* **2002**, *419*, 174; P. Ø Farnes, R. F. Johansen, E. Seeberg, *Nature* **2002**, *419*, 178; T. Duncan, S. C. Trewick, P. Koivisto, P. A. Bates, T. Lindahl, B. Sedgwick, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16660; P. A. Aas, M. Otterlei, P. Ø Farnes, C. B. Vågbo, F. Skorpen, M. Akbari, O. Sundheim, M. Bjørås, G. Slupphaug, E. Seeberg, H. E. Krokan, *Nature* **2003**, *421*, 859.
- [214] Note added in Proof: Neue Studien haben Defekte im MYH-Gen in einen Zusammenhang mit einer familiären Form von Darmkrebs gebracht: N. Al-Tassan, N. H. Chmiel, J. Maynard, N. Fleming, A. L. Livingston, G. T. Williams, A. K. Hodges, D. R. Davies, S. S. David, J. R. Sampson, J. P. Cheadle, *Nat. Genet.* **2002**, *30*, 227; S. Jones, P. Emmerson, J. Maynard, J. M. Best, S. Jordan, G. T. Williams, J. R. Sampson, J. P. Cheadle, *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 2961.

## The Nucleus of Knowledge



ROBERT A. MEYERS, *Ramtech Ltd., Tarzana, CA, USA (ed.)*  
**Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine**  
 16 Volume Set

"This series is a classic..." -  
 Molecular Medicine Today/Trends in  
 Molecular Medicine

### The insight of 10 Nobel laureates

The second edition of the preceding "Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine" provides a one-stop working library of the molecular basis of life, disease diagnosis and therapy with a new focus on the integrating cell level.

It was designed in collaboration with a founding board of 10 Nobel laureates. The encyclopedia is published in 16 volumes containing approximately 425 articles. Each article presents an in-depth treatment accompanied by a key word list with definitions and an extensive bipartite bibliography of primary and secondary papers.



<http://meyers-emcbmm.de>

2005. Approx. 10,000 pages.  
 Hardcover.  
 ISBN 3-527-30542-4  
 Prepublication price  
 approx. € 4144.-  
 valid until March 31, 2004  
 thereafter approx. € 4944.-

Publication dates:  
 volumes 1-5 Jan. 2004  
 volumes 6-10 Aug. 2004  
 volumes 11-16 Jan 2005

Register now for the free  
**WILEY-VCH Newsletter!**  
[www.wiley-vch.de/home/pas](http://www.wiley-vch.de/home/pas)

WILEY-VCH • P.O. Box 10 11 61 • D-69451 Weinheim, Germany  
 Fax: +49 (0) 62 01 - 60 61 84  
 e-mail: [service@wiley-vch.de](mailto:service@wiley-vch.de) • [www.wiley-vch.de](http://www.wiley-vch.de)



**WILEY-VCH**

57513052.kn