Andreas Glas (Autor)

Strukturbiologische und mechanistische Untersuchungen zur Erkennung und Reparatur von DNA-Photoschäden

https://cuvillier.de/de/shop/publications/663

Copyright:
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: https://cuvillier.de

1. Einleitung

1.1 DNA und DNA-Schäden

Eine der wohl bedeutendsten Entdeckungen des letzten Jahrhunderts war die Entschlüsselung der DNA-Struktur durch *Watson* und *Crick* im Jahre 1953.[1] Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) besteht aus den vier Nukleosiden 2'-Desoxyadenosin (**A**), 2'-Desoxycytidin (**C**), 2'-Desoxyguanosin (**G**) und Thymidin (**T**), welche spezifische Wasserstoffbrückenbindungen mit den komplementären Basen eingehen und schließlich die charakteristische DNA-Doppelhelix ausbilden.[2, 3] Nicht zuletzt durch die Arbeiten von *Watson* und *Crick* wissen wir heute, dass die DNA der Träger der genetischen Information ist und nahezu von allen Lebewesen, ausgenommen von einigen Viren, zu diesem Zweck verwendet wird.[4, 5] Die Abfolge der Nukleobasen **A**, **C**, **G** und **T** spielt hierbei eine entscheidende Rolle, da der Aufbau aller Proteine und RNA-Bausteine und folglich des gesamten Organismus durch deren Abfolge bestimmt wird.

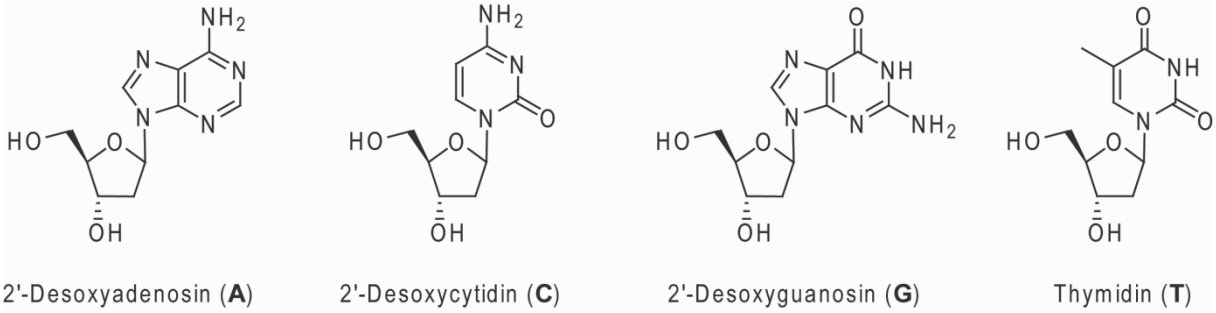


Abb. 3: Die vier Nukleoside der DNA.

Seit längerem ist schon bekannt, dass externe Einflüsse wie zum Bespiel ionisierende Strahlung, UV-Strahlung und toxische Chemikalien (z.B. alkylierende Reagenzien) die DNA schädigen und folglich die genetische Integrität beeinflussen können.[6-9] Zusätzlich zu den bereits genannten Faktoren ist die DNA selbst unter physiologischen Bedingungen ständig spontanen Veränderungen, wie zum Beispiel der Transformation von Cytosin zu Uracil durch Deaminierung[10] oder dem Verlust von Purinen durch Hydrolyse der Bindung zwischen Zucker und Phosphatrückgrat ausgesetzt.[11, 12] Darüberhinaus sind stoffwechselbedingte, reaktive Spezien wie zum Beispiel *reactive oxygen species* (ROS) und *reactive nitrogen*

species (RNS) potentiell gefährliche Substanzen für die DNA.[13] Alles in allem führt dies Schätzungen zu Folge, zu 10^4 – 10^6 Schäden pro Zelle pro Tag.[14] Hierbei können die Schäden an einzelnen Basen oder Nukleosiden, an mehreren Nukleosiden gleichzeitig oder aber auch am Zucker-Phosphatrückgrat der DNA auftreten. Je nach Art der Schädigung der DNA, können die Schäden in unterschiedlichste Klassen eingeteilt werden, wobei die am häufigsten auftretenden, die sogenannten oxidativen Schäden,[15] UV-Schäden,[16] *bulky adducts*[17] sowie Einzel- und Doppelstrangbrüche[18] sind (siehe Abbildung 4).

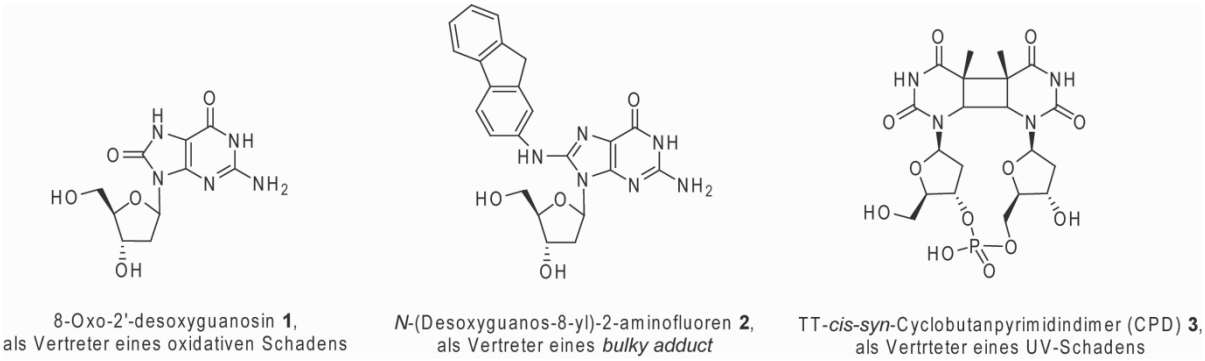


Abb. 4: Beispiele einiger häufig auftretender DNA-Schäden.

Unabhängig von der Art und Häufigkeit der Schäden, haben sie einen mutagenen und teils zytotoxischen Einfluss auf die Zelle. Die Basis hierfür ist eine fehlerhafte Transkription bzw. Replikation oder ein Replikationsstopp. Für alle Lebewesen ist es daher wichtig, die DNA vor etwaigen Schädigungen und dem daraus resultierenden Verlust genetischer Informationen zu schützen und zu bewahren. Im Laufe der Evolution hat sich ein beachtliches Repertoir an DNA-Reparatursystemen entwickelt, welches in der Lage ist, die entstandenen DNA-Schäden zu erkennen und wieder zu beseitigen, um die genetische Integrität aufrechtzuerhalten.

1.2 DNA-Reparatursysteme

Um die zahlreich entstehenden DNA-Schäden reparieren zu können, besitzt jedes Lebewesen einen enorm leistungsfähigen, komplexen und flexiblen Reparaturapparat. Im Großen und Ganzen verfügt eine Zelle über vier unterschiedliche Reparaturmechanismen, welche spezifisch die unterschiedlichen DNA-Veränderungen beheben können (Abbildung 5). Hier wären zum Einen die Exzisionsreparatursysteme *base excision repair* (BER), *nucleotide excision repair* (BER) sowie *mismatch repair* (MMR) und zum Anderen die Reparatur durch homologe DNA-Rekombination zu nennen.[19-22] Zusätzlich zu den eben genannten Reparaturmechanismen können Schäden auch durch direkte Reversion in die intakten Basen beseitigt werden (siehe Kapitel 1.4).

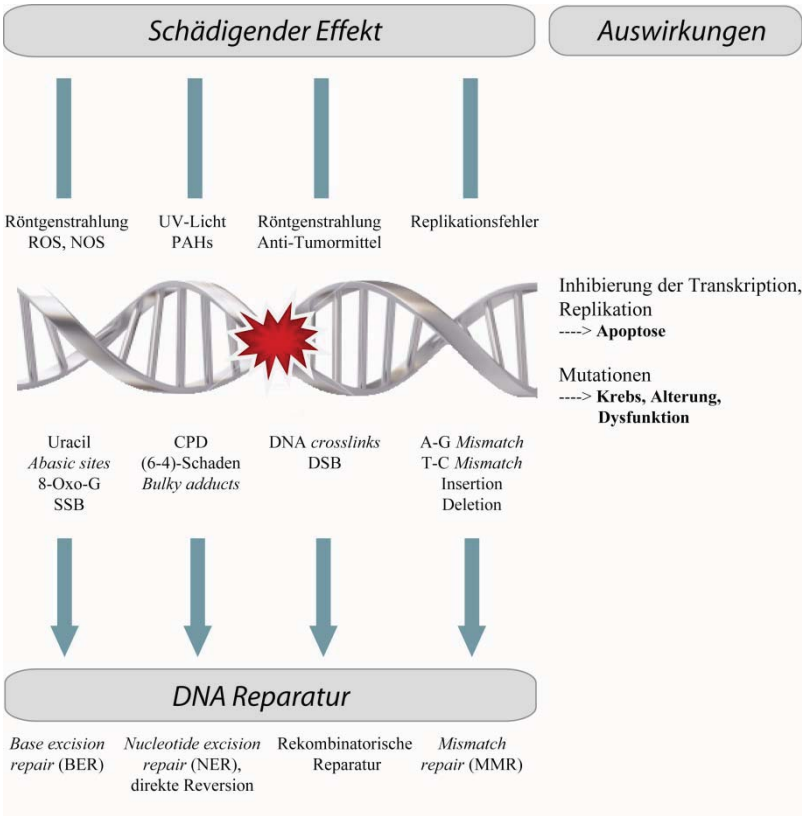
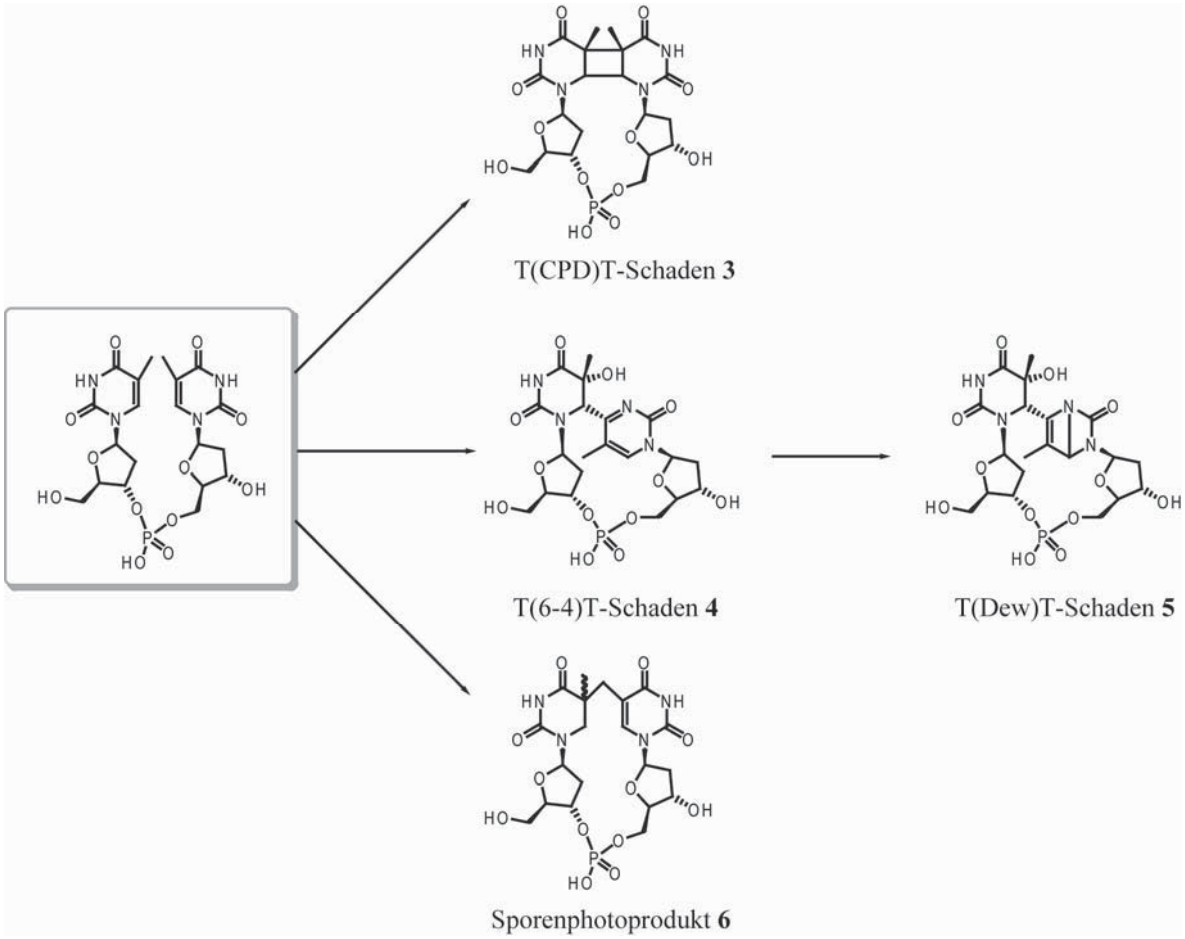


Abb. 5: Ursachen und entsprechende Reparaturmechanismen von DNA-Schäden sowie deren möglichen Auswirkungen auf die Zelle. PAH = polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, SSB = *single strand break*, DSB = *double strand break*.

MMR bietet die Möglichkeit, Fehlpaarungen während der Replikation zu beheben, wobei es sich bei einer Fehlpaarung eigentlich nicht um einen DNA-Schaden handelt, da ein intaktes Nukleotid eingebaut worden ist, jedoch an der falschen Stelle. Anhand von NER kann eine große Vielfalt an DNA-Schäden, wie zum Beispiel UV-induzierte Photoschäden (CPD **3**, (6-4)-Schaden **4**) oder Adduktschäden (*N*-(Desoxyguanos-8-yl)-2-aminofluoren **2**) behoben werden, indem die schadhaften Nukleotide großzügig entfernt und durch intakte wieder ersetzt werden. BER Enzyme reparieren hauptsächlich oxidative Schäden wie zum Beispiel 8-Oxo-G **1**, indem nur das geschädigte Nukleotid entfernt und ersetzt wird. Doppelstrangbrüche und DNA *crosslinks* werden über homologe DNA-Rekombination wieder behoben.

1.3 DNA-Photoschäden

In Anbetracht der immer besser werdenden Nachweistechnologien in den letzten Jahren, konnten seit den ersten Hinweisen bezüglich des Einflusses elektromagnetischer Strahlung verschiedener Wellenlängen auf Nukleinsäuren,[23-25] erhebliche Fortschritte erzielt werden. Es konnten seitdem etliche DNA-Photoschäden charakterisiert und teilweise isoliert werden, welche durch den UV-Anteil des Sonnenlichts entstehen.[16, 26] Die Natur der dabei entstehenden DNA-Photoschäden hängt stark von der Wellenlänge der einstrahlenden Photonen, welche die Zelle treffen, ab.[27] UV-Licht wird hierbei entsprechend dem Wellenlängenbereich in einen UV-A (320 nm – 400 nm), einen UV-B (280 nm – 320 nm) und einen UV-C (100 nm – 280 nm) Anteil unterteilt.[28] Unter den Bedingungen der UV-B und UV-C Strahlung, ist die wohl wichtigste ablaufende photochemische Reaktion die Dimerisierung zweier benachbarter Pyrimidinbasen über eine [2π+2π] Cycloaddition (Schema 1). Hierbei entstehen hauptsächlich die sogenannten Cyclobutanpyrimidindimere (CPD-Photoschäden, **3**), die Pyrimidin-(6-4)-Pyrimidondimere ((6-4)-Photoschäden, **4**), deren Folgeprodukte, die Dewar Valenz-Isomere ((Dew)-Photoschäden, **5**) und das allerdings nur in Sporen vorkommende Sporenphotoprodukt (**6**).



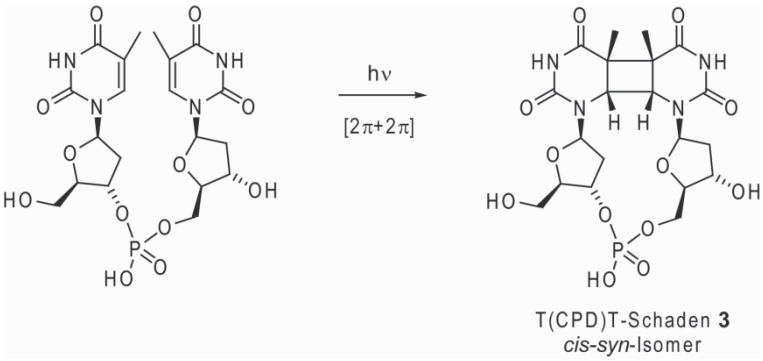
Schema 1: Hauptsächlich entstehende DNA-Photoschäden aus einer TpT-Sequenz.

Aufgrund des Absorptionsmaximums der Nukleinsäuren um 260 nm, absorbiert DNA zwar extrem schwach UV-A Strahlung, jedoch regt der UV-A Anteil endogene Chromophore wie zum Beispiel Riboflavine oder Porphyrine an, wobei reaktiver Singulettsauerstoff produziert wird, welcher spezifisch Guanine angreift und schädigt.[29, 30] Die aus diesen Photooxidationssprozessen resultieren oxidativen Schäden tragen somit zur Schädigung der Zelle bei, jedoch kann man den prozentualen Anteil verglichen mit den Pyrimidindimerschäden vernachlässigen.[31] Im Bereich der UV-C Strahlung treten darüberhinaus noch einige weitere photochemische Reaktionen auf, wie zum Beispiel die Bildung von diversen DNA-Hydraten aus Thymin und Cytosin,[26] der [2π+2π] Cycloaddition zwischen zwei Adeninen[32] bzw. zwischen einem Thymin und einem Adenin.[33] Bedenkt man allerdings, dass der UV-C Anteil der Sonne nahezu vollständig von der Ozonschicht abgefangen wird, so haben die eben genannten Schäden nur einen geringen Anteil an der gesamten Schädigung der DNA durch UV-Licht.

In bakteriellen Sporen[34] tritt noch ein weiterer Photoschaden auf, welcher als Sporenphotoprodukt bekannt ist. Sporen enthalten einen große Menge Dipikolinsäure, wodurch die DNA weitestgehend dehydratisiert, durch so genannten *small acid soluble proteins* (SASPs) verpackt vorliegt.[35] Dies hat zur Folge, dass eben nicht mehr die bekannten CPD- und (6-4)-Schäden entstehen, sondern hauptsächlich das Sporenphotoprodukt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter den typischen Bedingungen des Sonnenlichts, (welches aus 0.3 % UV-B (> 290 nm), 4.7 % UV-A, 40 % sichtbarem Licht und 55 % Infrarotstrahlung besteht)[36] der relativ geringe UV-B Anteil größtenteils für die biologisch relevanten Effekte verantwortlich ist.

1.3.1 Cyclobutanpyrimidindimer (CPD-Photoschaden)

Aufgrund der relativ leichten Zugänglichkeit des bereits vor 50 Jahren erstmals isolierten *cis*,*syn*-Cyclobutanpyrimidindimers (CPD-Schaden, **3**),[37] entwickelte sich dieser Photoschaden in den Folgejahren zu einer Modellverbindung für Untersuchungen zur Entstehung und Reparatur von UV-induzierten DNA-Schädigungen. Formal betrachtet entsteht der Schaden durch eine photochemische [2π+2π] Cycloaddition zwischen den jeweiligen C5-C6 Doppelbindungen zweier benachbarter Pyrimidinbasen (Schema 2).



Schema 2: Photochemische Bildung des CPD-Schadens **3**.