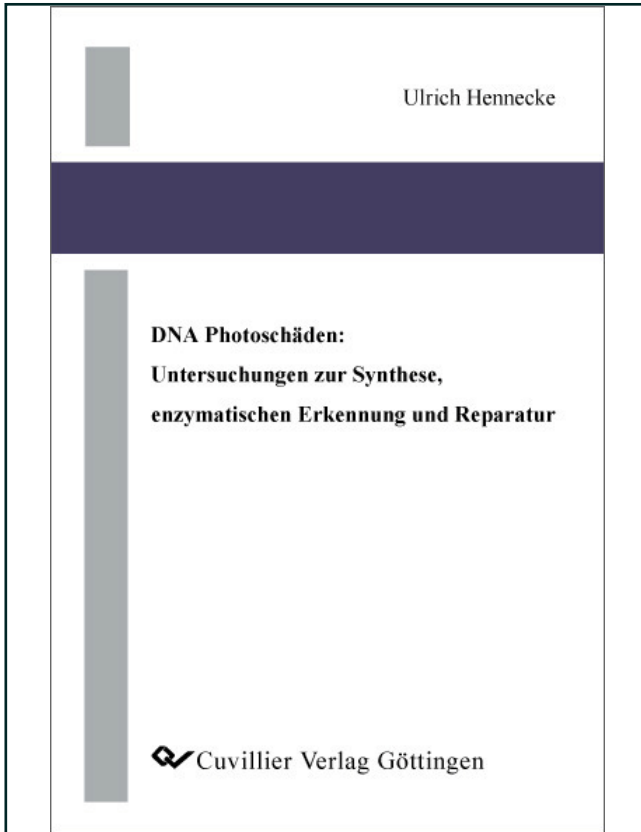




Ulrich Hennecke (Autor)

**DNA Photoschäden: Untersuchungen zur Synthese,
enzymatischen Erkennung und Reparatur**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/1852>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-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

Desoxyribonukleinsäure (DNA) wird von fast allen bekannten Lebewesen zum Speichern der genetischen Information genutzt. Die Abfolge der Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T) legt dabei den Aufbau aller Proteine und RNA Moleküle in der Zelle und damit, letztendlich, den Aufbau des gesamten Organismus fest. Dieses zentrale Dogma der Molekularbiologie und Genetik behält wohl bis auf weiteres seine Gültigkeit, auch wenn insbesondere in jüngster Zeit über einige Ausnahmen berichtet worden ist.^[1, 2] Alle Lebewesen müssen somit bestrebt sein, ihre DNA und damit die genetische Information vor Schäden zu schützen, um keine Informationen zu verlieren. Die DNA ist hierfür ein besonders gut geeignetes, relativ stabiles Molekül und hat viele Eigenschaften, die die gespeicherte Information vor dem Verlust schützen. So ist zum Beispiel die prinzipiell entropisch begünstigte Depolymerisation des Polymers DNA in Form der Hydrolyse der Phosphordiesterbindung in Wasser bei neutralem pH-Wert eine sehr langsame Reaktion, so lange sie nicht effizient katalysiert wird.^[3, 4] Außerdem ist die Information in der DNA durch die spezifische Paarung der einzelnen Basen mit ihrer komplementären Gegenbase und die so erfolgende Ausbildung der berühmten DNA-Doppelhelix zweifach vor Verlust gesichert.^[5]

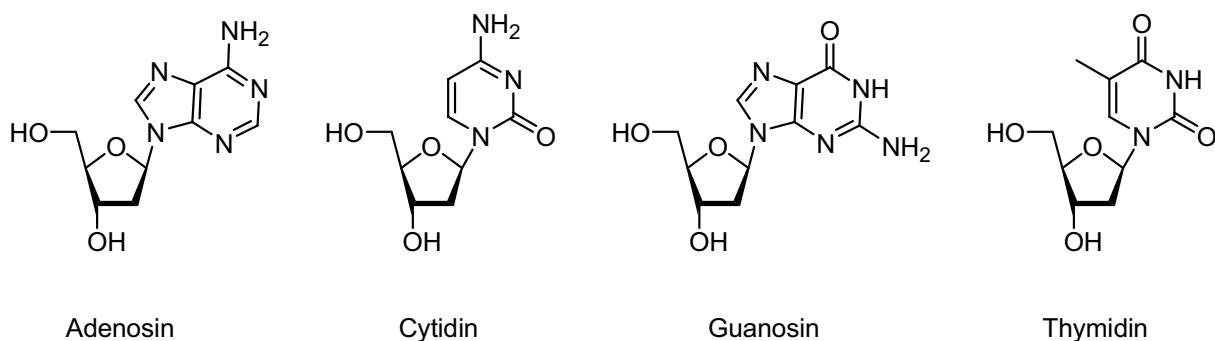


Abbildung 2: Die vier Nucleoside der DNA.

Trotzdem kann kein Lebewesen die Schädigung der DNA und damit die Möglichkeit eines Informationsverlustes verhindern. In der Zelle können ionisierende Strahlung, UV-Strahlung, Radikale und toxische Chemikalien die DNA eines Lebewesens schädigen. Dazu kommen aber auch potenziell gefährliche Substanzen aus dem Stoffwechsel des Organismus selbst, wie zum Beispiel „reactive oxygen species“ (ROS). Dies alles führt dazu, daß in einer Zelle jeden

Tag eine hohe Zahl von DNA-Schäden entsteht. Schätzungen zu Folge können dies bis zu 10^6 Schäden pro Tag und Zelle sein.^[6] Alle Lebewesen waren daher gezwungen, Mechanismen zu entwickeln, um Schäden in der DNA zu erkennen und sie zu beseitigen. Jede Zelle enthält deshalb eine große Zahl von Enzymen, die mit der Erkennung und Reparatur der unterschiedlichsten DNA-Schäden befasst sind. Hinzu kommen weitere Proteine, die Reparaturenzyme unterstützen oder ihre Aktivität regulieren. Jedes Lebewesen ist daher gezwungen, einen gewissen Teil seines Genoms zur Kodierung von Proteinen für dessen Erhalt zu verwenden.

Abhängig davon, durch welche Art von Reagenz die DNA geschädigt wird, können sehr unterschiedliche DNA Schäden entstehen. Prinzipiell können einzelne Basen oder Nucleoside, mehrere Nucleoside gleichzeitig oder auch das Zucker-Phosphatrückgrat der DNA geschädigt werden, bis hin zu dessen Zerfall in zwei Teile (Strangbruch). DNA Schäden werden daher nach der Art der Schädigung in viele Klassen eingeteilt. Zu den wichtigsten Schäden gehören Einzel- und Doppelstrangbrüche^[7], UV-Dimere^[8], oxidative Schäden^[9] und so genannte „Bulky adducts“^[10] (Abbildung 3). Insgesamt sind allein mehr als 50 verschiedene, oxidative Schäden beschrieben.^[11] Jeder dieser Defekte an der DNA hat spezifische Auswirkungen auf die Zelle und kann cytotoxisch oder mutagen sein.

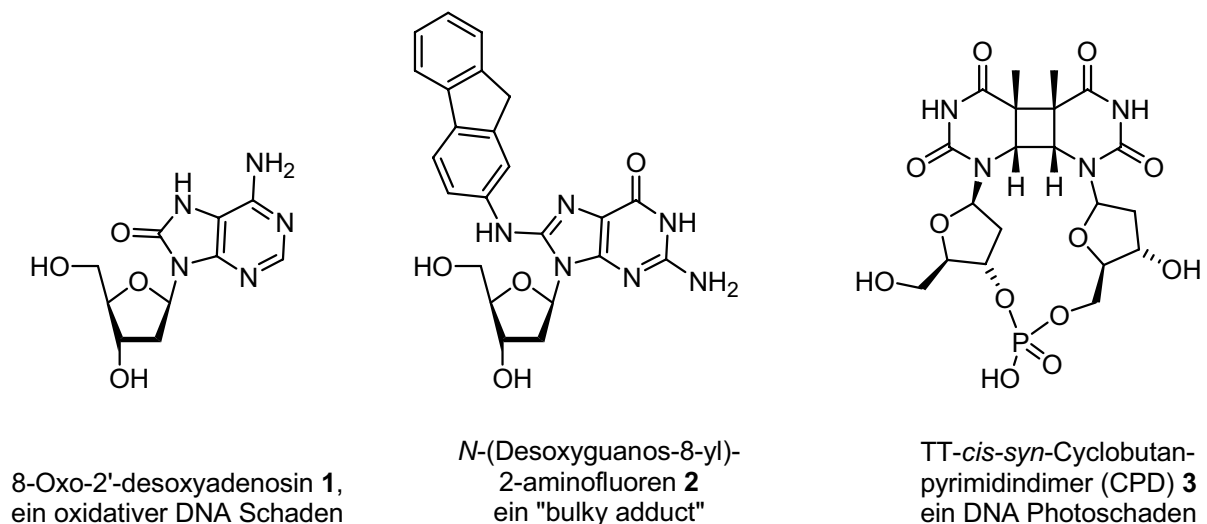
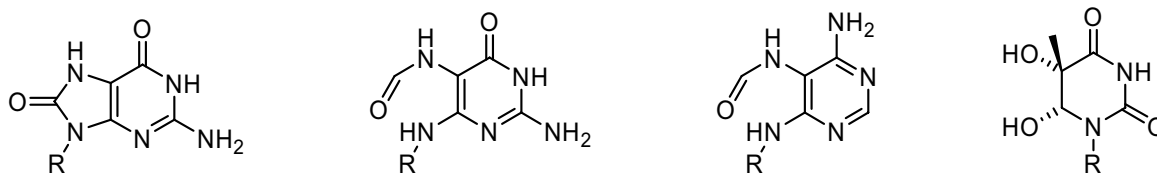


Abbildung 3: Einige häufige DNA Schäden.

1.2 Oxidative Schäden und oxidativer Ladungstransport in DNA

Oxidative DNA Schäden können durch eine Reihe von unterschiedlichen Oxidationsprozessen und Oxidationsmitteln hervorgerufen werden. Neben externen Oxidationsmittel

sind auch Hydroxylradikale und „reactive oxygen species“ aus dem zellinternen Sauerstoffstoffwechsel von großer Bedeutung.^[11] Im Rahmen dieser Arbeit, die sich mit DNA Photoschäden befasst, muss auch besonders auf Photooxidationsprozesse hingewiesen werden. Dabei erfolgt die Oxidation der DNA durch Photosensibilisatoren, die nach Lichtanregung entweder die DNA direkt durch Einelektronenoxidation (SET, Photoreaktion Typ 1) oder durch Bildung von reaktiven Singulett-Sauerstoff und dessen Reaktion mit einer DNA Base (Photoreaktion Typ 2) schädigen.^[12] Als zelluläre Chromophore kommen hierbei zum Beispiel Riboflavinderivate und Porphyrine in Frage, deren Eignung als Photosensibilisatoren gut untersucht ist. Generell kann die Oxidation der DNA über verschiedene Mechanismen wie Einelektronenoxidation, H-Abstraktion oder Addition eines Sauerstoffradikals erfolgen. Entsprechend sind eine große Anzahl von oxidativen DNA Schäden aller Basen bekannt. Am häufigsten kommen allerdings die Schäden des Guanins vor, da diese Base das niedrigste Redoxpotential besitzt.^[13, 14] Der häufigste Schaden des Guanins, das 8-Oxoguanosin **4**, ist daher auch einer der am besten untersuchten DNA Schäden überhaupt. Neben Studien zu seiner Entstehung durch Oxidation des Guanins, sind auch zahlreiche Studien zur Mutagenität, Reparatur und Interaktion mit DNA abhängigen Enzymen veröffentlicht.^[15, 16]



8-Oxo-2'-desoxyguanosin **4** Formamidopyrimidin-dG **5** Formamidopyrimidin-dA **6** Thymidinglykol **7**

Abbildung 4: Einige weitere, wichtige, oxidative DNA Schäden ($R = 2'$ -desoxyribofuranosyl).

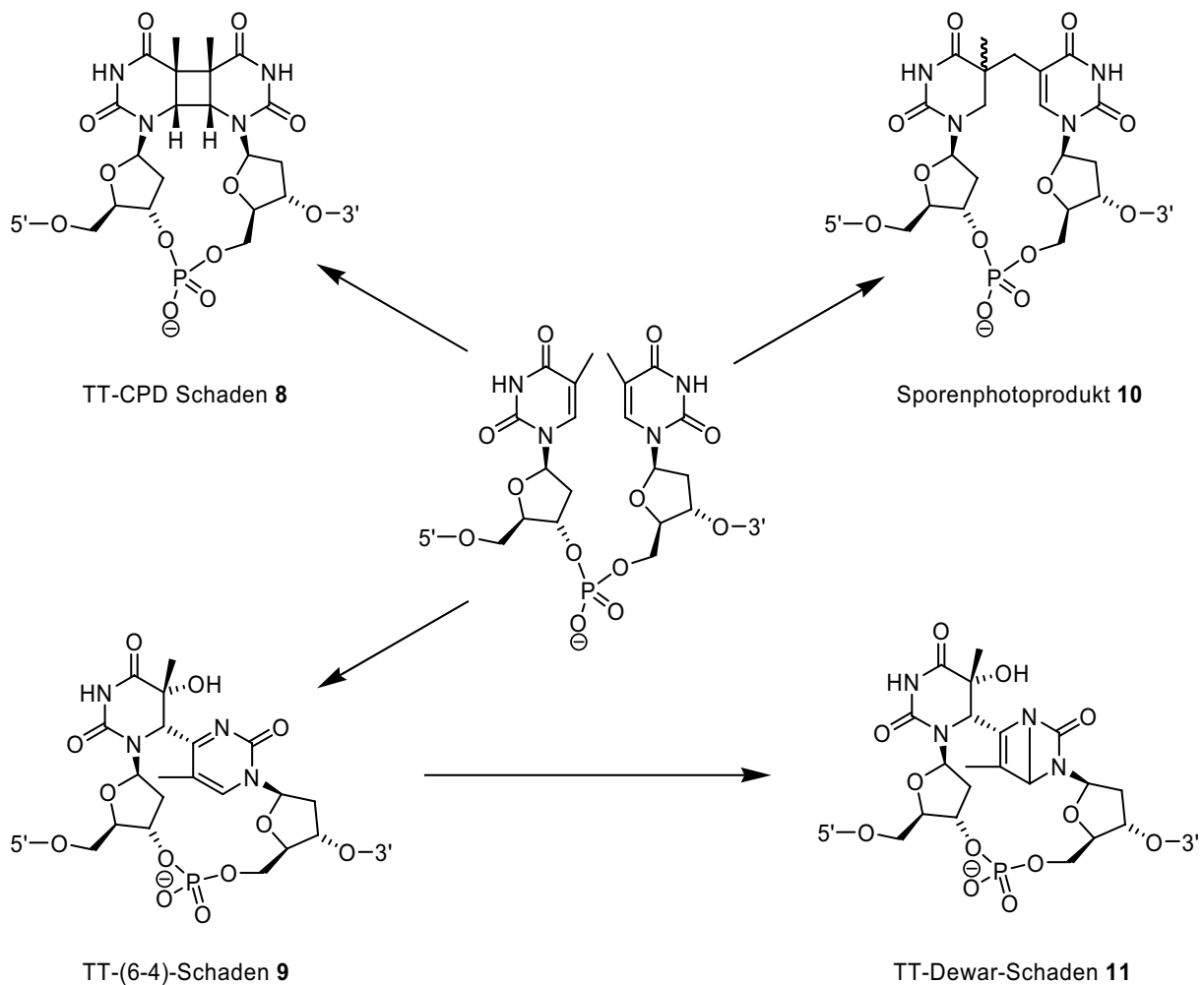
Bei Versuchen zur Oxidation von DNA wurde 1996 zum ersten Mal die Entstehung von oxidativen Schäden in größerer Entfernung von der Stelle des eigentlichen Oxidationsereignisses festgestellt.^[17] Diese Beobachtung konnte nur durch Elektronentransferprozesse in der DNA erklärt werden. Weitere Untersuchungen zum Mechanismus dieses Elektronentransfers führten in den 90er Jahren zu großen Diskussionen über die Leitfähigkeit von DNA. Schon sehr früh hatte es Vermutungen gegeben, dass die Stapelung der DNA Basen und die dadurch erfolgende Interaktion ihrer π -Systeme zu einer außergewöhnlichen Leitfähigkeit bis hin zu Supraleitung entlang des Basenstapels führen könnte.^[18, 19] Einige Wissenschaftler sahen daher neue Experimente zum Elektronentransfer in DNA als Bestätigung für diese Theorie an. Auch erste direkte Leitfähigkeitsmessungen an

DNA ergaben relativ hohe Werte für die Leitfähigkeit von DNA Doppelsträngen.^[20, 21] Um die Jahrtausendwende konnte dann die Arbeitsgruppe Giese zeigen, dass es sich bei den oxidativen Elektronentransferprozessen in der DNA keineswegs um außergewöhnliche Phänomene handelt.^[22] Stattdessen lässt sich der oxidative Elektronentransfer entlang des Basenstapels am besten als Hüpfprozess über die Guanine beschreiben.^[23, 24] Mit ähnlichen Hüpfprozessen wird auch Elektronentransfer in Proteinen beschrieben. Diese Ergebnisse wurden von der Arbeitsgruppe Schuster im Wesentlichen bestätigt.^[25, 26] Die Gruppe Schuster benutzt allerdings zur Beschreibung der Elektronentransferprozesse eine Theorie, die die Wechselwirkung der ladungstragenden Basen mit ihren Nachbarn mit einbezieht. Wertvolle Beiträge wurden auch von Lewis und Wasielewski geleistet, die Hüpfprozesse in DNA mit Kurzpulsspektroskopie untersuchten.^[27, 28] Einen abweichenden Standpunkt zur Theorie des oxidativen Elektronentransportes in DNA vertritt weiterhin Barton, auch wenn sie sich seit den 90er Jahren den herkömmlichen Theorien angenähert hat.^[29] Außerdem zeigte sich in den letzten Jahren, dass die ersten Leitfähigkeitsmessungen an DNA, die auf eine hohe Leitfähigkeit entlang des Basenstapels hingewiesen hatten und damit zur aufgeregten Diskussion beitrugen, nicht bestätigt werden konnten.^[30] Vermutlich wurde in den ersten Messungen statt der Leitfähigkeit der DNA die Leitfähigkeit des die DNA umgebenden Puffersystems gemessen.

1.3 DNA Photoschäden

Eine weitere, sehr wichtige Klasse von DNA Schäden sind die DNA Photoschäden, die durch den UV-Anteil des Sonnenlichtes entstehen.^[8, 31] Die aus biologischer Sicht bei weitem wichtigsten, photochemischen Reaktionen sind die Dimerisierungen von zwei benachbarten Pyrimidinbasen über photochemische [2+2] Cycloadditionen, die durch UV-B-Strahlung und UV-C-Strahlung ausgelöst werden. Die dabei entstehenden Schäden, die Cyclobutanpyrimidindimere (CPD Schäden), die (6-4)-Photoschäden ((6-4)-Schäden) und ihre Folgeprodukte, die Dewarvalenzisomere (Dewar-Schäden), sind die häufigsten Photoschäden und für den Großteil der Wirkung von UV-Strahlung auf DNA-Ebene in der Zelle verantwortlich. Im UV-A Bereich entstehen die CPD Schäden nicht mehr direkt, sondern unter Beteiligung von Triplettensensibilisatoren. Der UV-A Anteil des Sonnenlichtes schädigt die DNA auch über die schon kurz beschriebenen Photooxidationsprozesse und führt damit zu den bekannten, oxidativen Schäden. Diese oxidativen Schädigungen tragen zur Gesamtwirkung der UV-

Strahlung auf die Zelle bei, sind aber gegenüber den Pyrimidindimeren von geringerer Bedeutung.^[32]

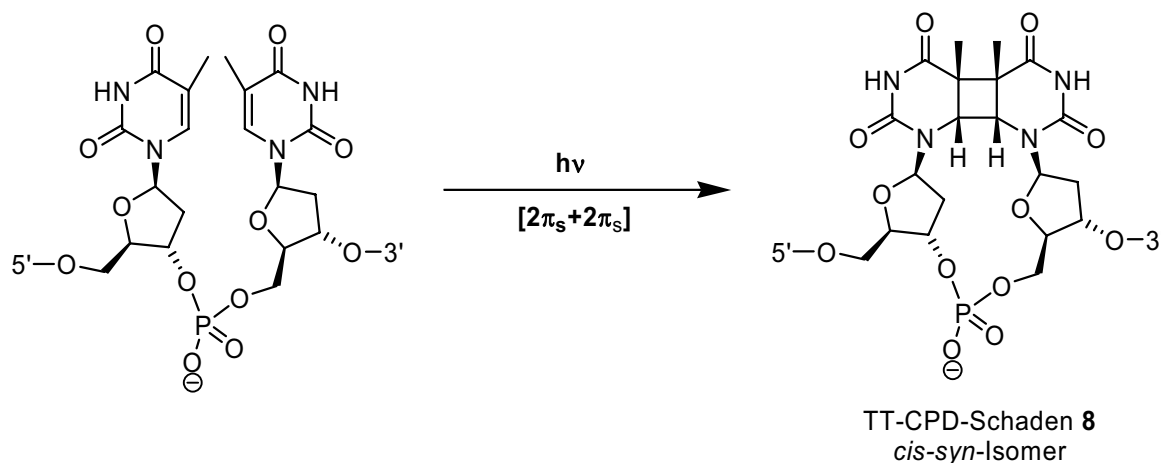


Schema 3: DNA Photochemie und die DNA Photoschäden.

Des Weiteren sind vielfältige, photochemische Reaktionen der DNA Basen im Bereich der UV-C-Strahlung bekannt. Hierzu zählen die Bildung von Hydraten (Cytosin und Thymin)^[31], [2+2]-Cycloaddition zwischen Adenin und Thymin^[33] oder zwei Adeninen^[34], die zu Dimeren führen, oder auch die direkt Photooxidation von Guanin. Die biologische Bedeutung dieser Reaktionen ist allerdings sehr gering, da die UV-C-Strahlung der Sonne fast vollständig von der Ozonschicht absorbiert und damit von der Erdoberfläche ferngehalten wird. Nicht auszuschließen ist allerdings, dass diese Photoschäden früh in der Entwicklung des Lebens von größerer Bedeutung waren, als sich noch keine Ozonschicht ausgebildet hatte, oder daß diese Schäden wieder an Bedeutung gewinnen, falls die Größe des Ozonloches auf der Südhalbkugel doch noch weiter zunimmt. Zusätzlich zu den gerade beschriebenen Schäden ist noch ein weiterer Photoschaden bekannt, der allerdings nur in bakteriellen Sporen auftritt.^[35]

In diesen Sporen ist die DNA mit den so genannten „small acid soluble proteins“ (SASPs) speziell verpackt und weitgehend dehydratisiert.^[36] Außerdem enthalten Sporen große Menge Dipicolinsäure. Dadurch ändert sich die Photochemie der DNA vollständig und die bekannten Photoschäden treten nicht mehr auf. Stattdessen entsteht, mit deutlich verringerter Häufigkeit, aus zwei Thymidinen das Sporenphotoprodukt.

1.3.1 Cyclobutanpyrimidindimere (CPD Schäden)



Schema 4: Bildung des TT-CPD-Photoschadens **8**.

Cyclobutanpyrimidindimere (CPD Schäden) entstehen aus zwei benachbarten Pyrimidinen durch eine photochemische [2+2]-Cycloaddition zwischen den jeweiligen C5-C6-Doppelbindungen (Schema 4).^[8] Durch die in der DNA-Doppelhelix vorgegebene Konformation der Basen (*anti* um die glycosidische Bindung) entsteht nur eines der möglichen Cyclobutanstereoisomere, das so genannte *cis-syn-Isomer*. CPD Schäden können in DNA aus allen denkbaren Kombinationen der beiden Pyrimidinnukleoside Thymin und Cytidin entstehen, allerdings ist die Bildungswahrscheinlichkeit nicht für alle Isomere gleich hoch. Bei Belichtung von DNA mit UV-B Strahlung oder simulierten Sonnenlicht nimmt die Bildungstendenz der CPD Schäden in DNA in der Reihenfolge 5'-T=T-3' > 5'-T=C-3' > 5'-C=T-3' > 5'-C=C-3' ab.^[37, 38] Das TT-Dimer entsteht dabei etwa dreimal häufiger als das TC-Dimer und wird mit einer Quantenausbeute von etwa 2-3 % gebildet (*in vitro* in HomodT-Oligomeren).^[39, 40] In zellulärer DNA (*in vivo*) sind die relativen Häufigkeiten der CPD Schäden ähnlich.^[41, 42]

Durch die kovalente Verknüpfung von zwei benachbarten Basen sind CPD Dimere sterisch anspruchsvolle DNA Schäden, die jedoch nur zu einer kleinen Verzerrung der DNA Doppelhelix führen. Die Basenpaarungen der beteiligten Pyrimidinbasen werden geschwächt,

bleiben aber erhalten. Die Kristallstruktur eines ein CPD Dimer enthaltendes Oligonukleotides zeigt zu dem einem Knick von etwa 30° in der DNA Doppelhelix (Abbildung 5).^[43]

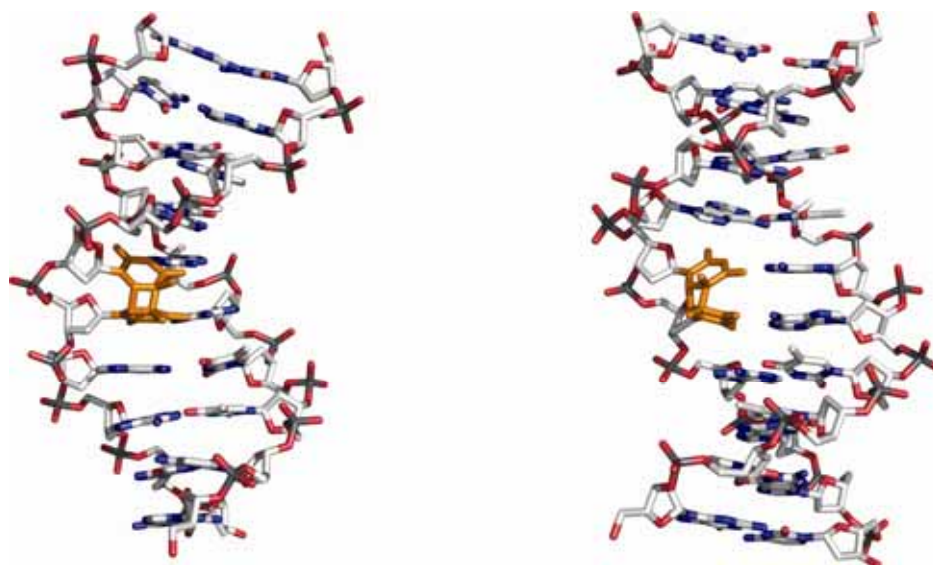


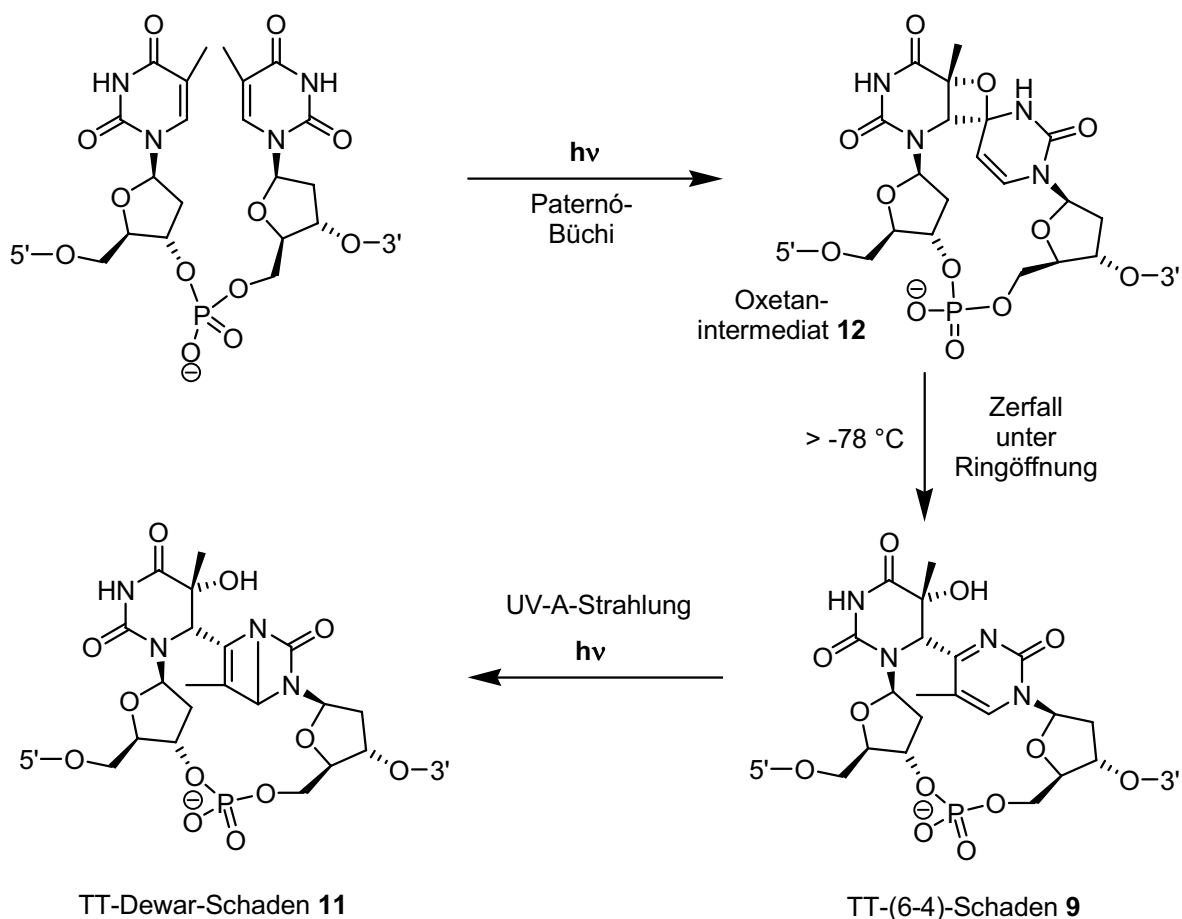
Abbildung 5: Die Kristallstruktur eines DNA Decamers mit einem TT-CPD Schaden. Die Struktur ist aus zwei unterschiedlichen Perspektiven dargestellt mit dem CPD Schaden in der Mitte (orange).

Im Vergleich zu anderen, sterisch anspruchsvollen DNA Schäden wie den „bulky adducts“ oder den im nächsten Abschnitt behandelten (6-4)-Photoschäden sind die Auswirkungen eines CPD Dimers auf die DNA Struktur allerdings nicht so groß. UV-Denaturierungsexperimente mit CPD-enthaltender DNA zeigen, dass ein CPD Schaden die DNA Doppelhelix nur um etwa 6 kJ/mol destabilisiert.^[44]

1.3.2 (6-4)-Photoschäden und ihre Dewarvalenzisomere

(6-4)-Photoschäden entstehen wie die CPD Dimere ebenfalls durch eine photochemische [2+2]-Cycloaddition.^[8, 31] In diesem Fall allerdings reagiert die C5-C6-Doppelbindung des 5'-Nucleosids mit der C4-Carbonylgruppe des 3'-Nucleosides in einer Paternó-Büchi Reaktion zu einem Oxetan. Dieses Oxetan ist in der Zelle nicht stabil und reagiert unter Ringöffnung zum (6-4)-Schaden (Schema 5). Handelt es sich im Fall des 3'-Nucleosids um ein Cytidin, so erfolgt die Reaktion formal aus dem Imin-Tautomer des Cytosin und das entstehende Intermediat ist ein Azetidin, das ebenso wie das Oxetan nicht stabil ist und unter Ringöffnung den (6-4)-Photoschaden bildet. Insgesamt entstehen (6-4)-Photoschäden in der Zelle deutlich seltener als CPD Dimere, das Verhältnis ist ungefähr 1:3 (bei UV-B Belichtung).^[37, 38] An spezifischen Dipyrimidinstellen in der DNA ist dieses Verhältnis aber nicht überall gleich, da die Entstehung von (6-4)-Schäden eine andere Sequenzabhängigkeit

aufweist als im Fall der CPD Schäden. Während zum Beispiel das TT-CPD Dimer zehnmal häufiger entsteht als der entsprechende (6-4)-Schaden, ist das Verhältnis der beiden Schäden zueinander an 5'-Thymidin-3'-Cytidin-Stellen in der DNA etwa gleich. (6-4)-Schäden mit einem 5'-Cytidin entstehen generell nur sehr selten.



Schema 5: Bildung des TT-(6-4)-Schadens **9** und des TT-Dewar-Schadens **11**.

Im Gegensatz zum CPD Schaden konnte bisher keine Kristallstruktur eines DNA Stranges mit einem (6-4)-Schaden erhalten werden. Die aus UV-Denaturierungsexperimenten erhaltene Destabilisierung eines DNA Doppelstranges durch den (6-4)-Schaden von 24 kJ/mol und Strukturuntersuchungen in Lösung mit NMR weisen allerdings auf eine viel stärkere Störung der DNA-Doppelhelix als im Fall des CPD Schadens hin.^[45-48] Der aus dem 3'-Pyrimidin entstehende Pyrimidinonring scheint nicht mehr an einer Basenpaarung beteiligt zu sein und statt Adenin wird hier Guanin als Gegenbase energetisch leicht bevorzugt.^[48] Aus den NMR-Untersuchungen wurde eine Verbiegung des Doppelstranges von 44° an der Stelle des Schadens abgeschätzt.^[45] Andere experimentelle und theoretische Untersuchungen konnten diesen Wert allerdings nicht bestätigen.^[48, 49]