

Photolyasen

Blaulicht repariert DNA-Schäden

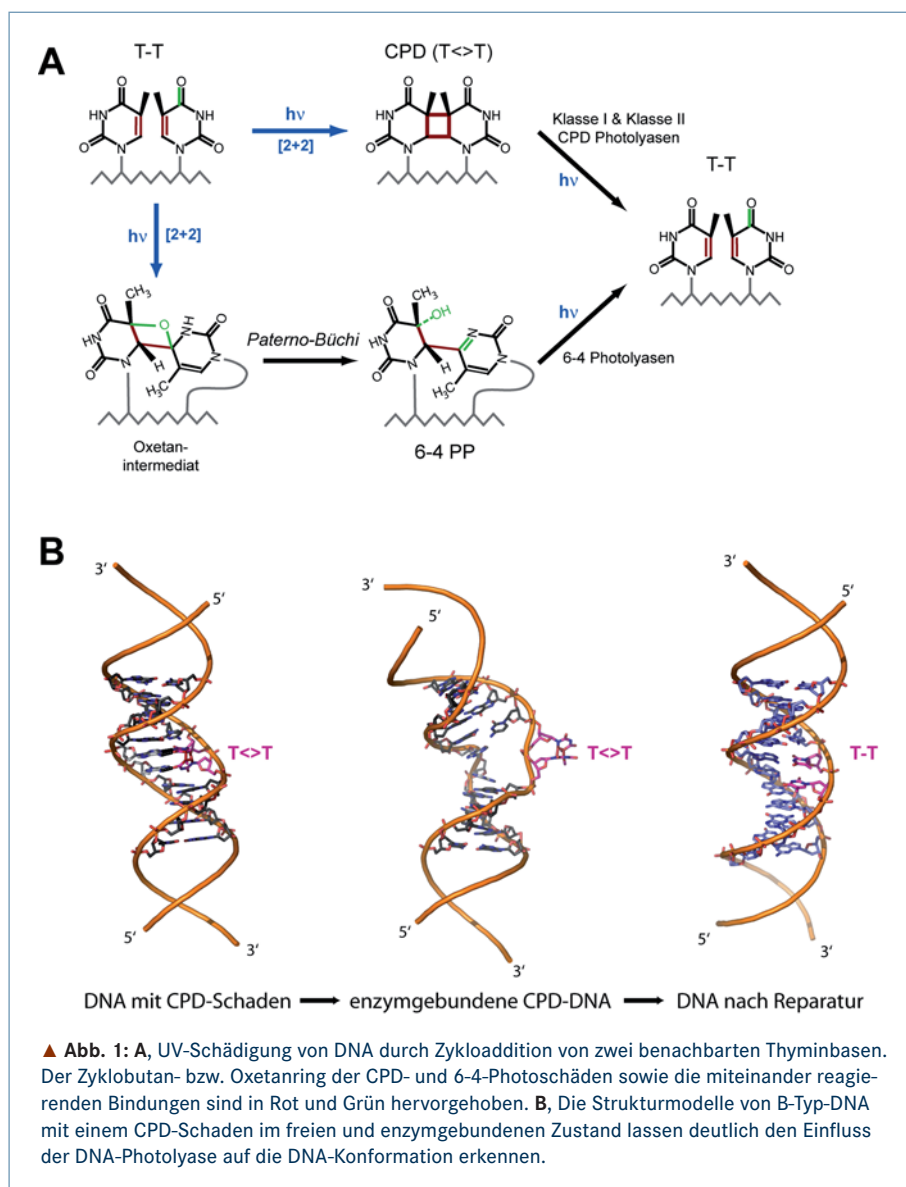
LARS-OLIVER ESSEN
FACHBEREICH CHEMIE, UNIVERSITÄT MARBURG

Der ultraviolette Strahlungsanteil der Sonne, besonders der noch die stratosphärische Ozonschicht passierende Rest an UV-B ($\lambda=280\text{--}315\text{ nm}$), schädigt die Erbsubstanz direkt, indem er photochemische Reaktionen zwischen den Basen der DNA auslöst. DNA-Photolyasen reparieren diese UV-Schäden, indem sie Licht ähnlicher spektraler Bandbreite für die Umkehrreaktion nutzbar machen.

■ Etwa drei Viertel der UV-Schäden gehören zum CPD-Typ (CPD = *cis*, *syn*-Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer) und entstehen durch eine als [2+2]-Cycloaddition bezeichnete photochemische Verknüpfungsreaktion zwischen zwei benachbarten Pyrimidinbasen (**Abb. 1A**).

Interessanterweise scheint diese Schädigung die Struktur der in der B-Konformation vorliegenden DNA nur geringfügig zu stören, da von vier Wasserstoffbrückenbindungen, die durch Watson-Crick-Basenpaarung vom intakten Thyminpaar zum ihm komplementären Adeninpaar geknüpft werden, immer noch drei Bindungen an der CPD-Schadensstelle ausgebildet sind und dort lediglich zu einer leichten Verknickung der B-DNA führen (**Abb. 1B**). Dennoch sind diese CPD-Schäden für die Zelle von Nachteil, da nicht nur Mutationen hervorgerufen werden, sondern auch lebenswichtige Reaktionen wie Transkription oder DNA-Replikation an den CPD-Schadensstellen unvermittelt abbrechen. Eine durch solche UV-Schädigungen bedingte menschliche Erkrankung ist die fatal verlaufende Erbkrankheit *Xeroderma pigmentosum*, bei der der Ausfall entsprechender Reparaturenzyme schon bei geringer Sonneneinstrahlung zu schweren Hautschädigungen führt.

Bereits seit über 50 Jahren ist bekannt, dass UV-geschädigte DNA in vielen Organismen durch blaues oder nah-ultraviolettes Licht effizient repariert werden kann^[1, 2]. Den für diese „Reaktivierung“ verantwortlichen DNA-Photolyasen^[3] gelingt in nur einem Reaktionsschritt die Reparatur der in der B-Form-DNA vorliegenden CPD-Schäden, wobei diese Zykloreversionsreaktion über einen Lichtgetriggerten Radikalmechanismus katalysiert wird^[4, 5]. Dabei stammt die Energie, die zur Aktivierung der reaktionsträgen Cyclobutanringe zunächst benötigt wird, von der Absorption eines blauen Lichtquants ($\lambda=320\text{--}500\text{ nm}$). Analog zur Photosynthese verfügen viele DNA-Photolyasen über ein zusätzliches Antennenmolekül zur besseren Lichtabsorption, wobei die Anregungsenergie auf einen katalytischen Flavin-Cofaktor (FADH) durch Förster-Transfer weitergeleitet wird. Der angeregte Flavin-Cofaktor überträgt in einer sehr raschen Reaktion ein energiereiches Elektron auf den CPD-Schaden. In seiner radikalischen



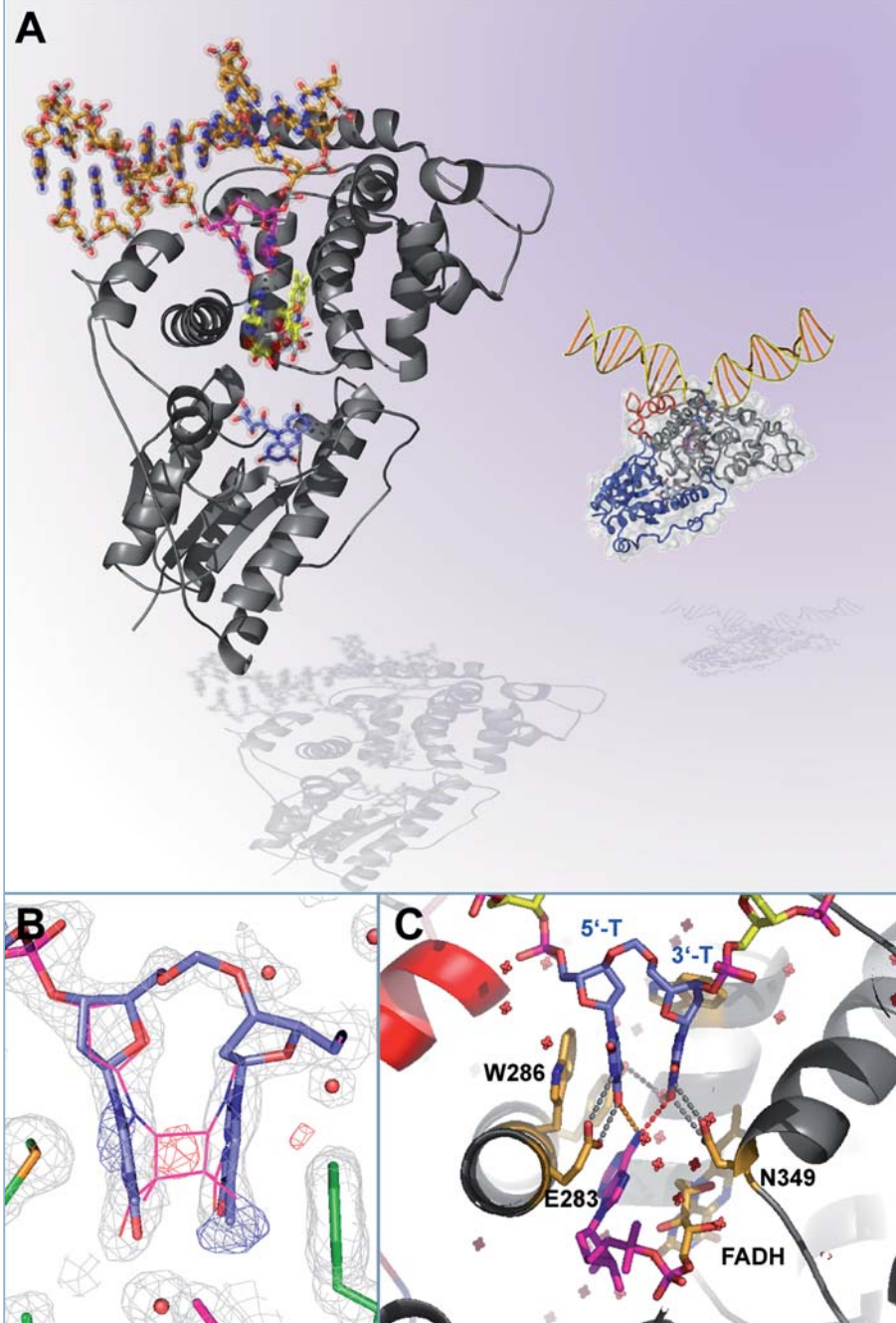


Abb. 2: **A**, Der Komplex aus Photolyase (graues Bändermodell) mit synthetischer UV-geschädigter DNA. Die Anregungsenergie zur Reparatur des DNA-Schadens wird als Photon über ein blaues Farbstoffmolekül (Deazaflavin) eingefangen und über den katalytischen Flavinkofaktor (Gelb) auf den Dimerschaden (Violett) übertragen. Im Hintergrund ist zu erkennen, wie stark die DNA durch die Photolyase verbogen wird. **B**, Differenzelektronendichte (Rot: negativ, Blau: positive Restdichte) zeigt an, dass der CPD-Schaden (Violett) in der Kristallstruktur im reparierten Zustand vorliegt. **C**, Der CPD-Schaden bildet auch kurz nach der Reparatur noch Wasserstoffbrücken mit dem U-förmigen Flavin-Cofaktor (Gelb: Isoalloxazinanteil; violett: Adeningruppe) aus. Elektronen können somit vom Licht-angeregten Isoalloxazin direkt oder über die Adeningruppe auf den CPD-Schaden übertragen werden, um diesen in einer radikalischen Reaktion zu spalten.

►► Form trennt dieser sich innerhalb von nur zwei Nanosekunden in die einzelnen Pyrimidinbasen auf.

Die erste Strukturbestimmung einer DNA-Photolyase aus dem Eubakterium *E. coli*^[6] zeigte, dass der katalytische Flavin-Cofaktor FAD in einer ungewöhnlichen, U-förmigen Konformation im aktiven Zentrum des Enzyms vorlag. Während bei anderen Flavo-

proteinen der FAD-Cofaktor in einer gestreckten Konformation gebunden ist, kontaktiert in der DNA-Photolyase die Adeningruppe des FAD-Cofaktors unmittelbar dessen redoxaktive Isoalloxazingruppe durch van-der-Waals-Wechselwirkungen. Trotz zwei weiterer Photolyase-Strukturen blieb jedoch unklar, wie die schadhafte DNA gebunden wird, wie weit der CPD-Schaden in das aktive Zentrum

des Enzyms ragt und welcher von mehreren postulierten Elektronentransportwegen schließlich im Enzym-Substratkomplex gewählt wird.

Strukturbestimmung

Einen wichtigen Schritt zur Klärung dieser Fragen gelang der Arbeitsgruppe um den Organochemiker Thomas Carell, als sie ein effizientes Verfahren zur chemischen Synthese von CPD-Schäden etablierte^[7]. Nach Einbau in unterschiedlich langen, doppelsträngigen DNA-Oligonukleotiden wurden Cokristalle zusammen mit der Photolyase aus der Blaualge *Anacystis nidulans*, die von Andre Eker an der Universität Rotterdam präpariert wurde, erhalten. Während der Kristallisation durfte kein Licht auf die Kristallisationsexperimente fallen, da sonst die Reparatur durch das Enzym vorzeitig erfolgt wäre. Die Struktur des Photolyase/DNA-Komplexes (**Abb. 2**) wurde mithilfe von Röntgendaten, die an der Swiss Light Source (SLS) in Villigen (Schweiz), gesammelt wurden, röntgenkristallografisch aufgeklärt^[8]. Die Bindung des Enzyms an die den CPD-Schaden enthaltende DNA verknickt diese so stark, dass der CPD-Schaden vollständig in das aktive Zentrum des Enzyms klappt. Dieses erstmals beobachtete Herausklappen von zwei DNA-Basen aus der DNA-Doppelhelix bewirkt, dass der CPD-Schaden den katalytischen Cofaktor unmittelbar kontaktiert. Dabei bilden beide C4-Carbonylgruppen der Thymin Wasserstoffbrückenbindungen mit der Aminogruppe des Adeninanteils vom FAD-Cofaktor aus. Durch diese direkte Anbindung des CPD-Schadens an den Flavin-Cofaktor erscheint nun auch die U-Konformation des Cofaktors als eine äußerst elegante Lösung für einen kurzen Elektronentransportweg (**Abb. 2C**). Das energiereiche Elektron wird dadurch direkt vom Cofaktor auf den Schaden übertragen, ohne dass – wie in vielen anderen Elektronentransportketten – Teile der Polypeptidkette beteiligt sind. Das erklärt, warum so gut wie jedes von der Photolyase aufgenommene Lichtquant zur DNA-Reparatur eingesetzt werden kann.

Nachahmung photochemischer Reaktionen durch Synchrotronstrahlung

Einen interessanten Nebeneffekt hat die Einwirkung der harten Röntgenstrahlung des Synchrotrons auf die Kristalle der DNA-Photolyase: Normalerweise zerstört die längere Einwirkung von Röntgenstrahlung die in den Kristallen enthaltenen Proteine und Nuklein-

säuren durch Bildung von freien Elektronen und Radikalen. Hier jedoch bewirkte ihre Einwirkung auf die Photolyase/DNA-Kristalle unerwarteterweise eine Reparatur des CPD-Schadens bei einer Temperatur von nur -173°C (**Abb. 2B**). Dass die Kristalle vor der Einwirkung der Synchrotronstrahlung in der Tat noch den ungeöffneten CPD-Schaden enthielten, zeigten Kapillarelektrophorese-Analysen an Einzelkristallen. Offensichtlich folgten die durch Synchrotronstrahlung im Kristall freigesetzten Elektronen einem ähnlichen Weg, wie die durch blaues Licht im Enzym erzeugten Elektronen. Die Struktur zeigt demnach einen bei -173°C ausgefrorenen Zustand an, der bei der Blaulicht-getriebenen Reaktion bei Raumtemperatur nur wenige Nanosekunden nach dem eigentlichen Reparaturereignis vorliegt.

Photolyasen: Anwendungen in Tier und Pflanze?

Angesichts der zuvor gemachten Befunde ist noch immer nicht befriedigend geklärt, wie die nur wenig untersuchten KlasseII-

Photolyasen beziehungsweise 6-4-Photolyasen – diese Photolyasen sind in pflanzlichen und tierischen Organismen vertreten – ihrerseits CPD-Schäden oder 6-4-Photoaddukte (**Abb. 1A**) reparieren können. Ebenso faszinierend ist die Frage, wie die mit den Photolyasen aufs engste verwandten Cryptochrome als Blaulicht-Schalter funktionieren können, zumal wesentliche Merkmale der Photochemie anscheinend konserviert sind^[4, 5].

Letztlich sollte daran erinnert werden, dass Menschen wie auch andere plazentale Säugtiere (Mäuse, Pferde etc.) fast die einzigen der Sonne ausgesetzten tierischen Lebewesen sind, die auf die effizienten Photolyasen während der Evolution zugunsten anderer Reparatursysteme verzichtet haben. Interessanterweise konnte an transgenen Mäusen gezeigt werden, dass die Einführung eines zusätzlichen Gens für eine CPD-Photolyase aus einem Beuteltier auch diese Tiere erheblich resistenter gegen ultraviolette Strahlung machte^[9]. Angesichts von Ozonlöchern oder *Science Fiction*-Ideen zur Besiedlung der Mars-

Oberfläche ist es vielleicht beruhigend zu wissen, dass die Natur offensichtlich sehr frühzeitig diese äußerst effizienten DNA-Reparaturenzyme entwickelt hatte. ■

Literatur

- [1] Dulbecco, R. (1949): *Nature* 163: 949–950.
- [2] Kelner, A. (1949): *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 35: 73–79.
- [3] Rupert, C. S. (1960): *J. Gen. Physiol.* 43: 573–595.
- [4] Essen, L.-O. (2006): *Curr. Opin. Struct. Biol.* 16: 51–59.
- [5] Weber, S. (2004): *Biochem. Biophys. Acta* 1707: 1–23.
- [6] Park, H. W., Kim, S. T., Sancar, A. & Deisenhofer, J. (1995): *Science* 268: 1866–1872.
- [7] Butenandt, J., Eker, A. P. M. & Carell, T. (1998): *Chem. Eur. J.* 4: 642–654.
- [8] Mees, A., Klar, T., Gnau, P., Hennecke, U., Eker, A. P., Carell, T., Essen, L. O. (2004): *Science* 306: 1789–1793.
- [9] Jans, J., Schul, W., Sert, Y. G., Rijksen, Y., Rebel, H., Eker, A. P., Nakajima, S., van Steeg, H., de Grijl, F. R., Yasui, A., Hoeijmakers, J. H., van der Horst, G. T. (2005): *Current Biology* 15: 105–115.



Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Lars-Oliver Essen
 Fachbereich Chemie
 Philipps-Universität
 Hans-Meerwein-Straße
 D-35032 Marburg/Lahn
 Tel.: 06421-2822032
 Fax: 06421-2822191
 essen@chemie.uni-marburg.de