

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Das Verhalten des Cisplatin 1,3-d(GpTpG) Schadens
während der Replikation**

Thomas Reißner

aus

Starnberg

2010

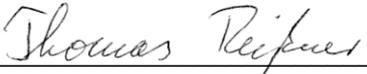
Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Thomas Carell betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 03.08.2010



(Thomas Reißner)

Dissertation eingereicht am 03.08.2010

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Carell

2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Beck

Mündliche Prüfung am 25.10.2010

Meiner Familie

*Leben ist, was uns zustößt,
während wir uns etwas ganz anderes vorgenommen haben.*

Henry Miller

Danksagung

Meinem Doktorvater *Prof. Dr. Thomas Carell* danke ich für die Aufnahme in seine hervorragend ausgestattete Arbeitsgruppe. Durch das von ihm gebotene Arbeitsumfeld (materiell und intellektuell) wurde das Gelingen dieser Arbeit erst möglich. Zudem danke ich ihm für das Verständnis, dass ich eine unvergessliche Reise durch Indochina unternehmen konnte.

Prof. Dr. Wolfgang Beck danke ich für die Übernahme des Koreferats. Bei den Mitgliedern der Prüfungskommission bedanke ich mich für ihr Mitwirken an der mündlichen Prüfung.

Den Kooperationspartnern um *Prof. Dr. Zvi Livneh* vom Weizmann Institute of Science in Rehovot, Israel, danke ich für die gute und fruchtbare Zusammenarbeit.

Ich danke Frau *Slava Gärtner*, Frau *Sabine Voß* und Frau *Claudia Gräf* für ihre schnelle und unbürokratische Hilfe in allen organisatorischen und chemisch-biologischen Belangen.

Den Mitarbeitern der analytischen Serviceabteilungen und Werkstätten der LMU München danke ich für ihre große Hilfe. Insbesondere gilt mein Dank *Daniel Globisch* und *Dr. Werner Spahl* für Hilfe und großen Zeitaufwand bei der Durchführung der massenspektrometrischen Untersuchungen.

Dem *Boehringer Ingelheim Fonds* danke ich für ein Promotionsstipendium von 2007–2009 und dem damit verbundenen Vortrags- und Schulungsprogramm in Blaubeuren und Hirschegg.

Für das schnelle und gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich herzlich *Dr. Sabine Schneider*, *Stephanie Schorr*, *Korbinian Heil*, *Christian Trindler* und *Dr. Markus Müller*.

Allen ehemaligen und aktuellen Kollegen des Arbeitskreis Carell danke ich für die sehr inspirierende und angenehme Arbeitsatmosphäre. Durch zahlreiche Grillabende, Cocktailpartys und gemeinsame, teilweise hemmungslose Ausflüge sorgten sie für die entsprechende Ablenkung vom Laboralltag.

Unter all den stets diskussionsbereiten Mitarbeitern gilt mein ganz besonderer Dank *Dr. Sabine Schneider*. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Ihr unglaubliches Auffassungsvermögen und ihr steter Elan Kristallstrukturen zu lösen sind nicht in Worte zu fassen. Ich wünsche ihr weiterhin viel „Spaß“ bei den Synchrotron-Fahrten und viel Glück beim Aufbau ihrer eigenen Forschungsgruppe.

Meinen Laborkollegen aus F4.012 („Labor Alpenblick“) danke ich für die stets unterhaltsame Arbeitsatmosphäre. *Stephanie Schorr* danke ich für die Unterstützung in biochemischen Fragen, für genügend Protein und das rote Pferd. Bei *Malte Winnacker* (amtierender Bierkönig) möchte ich mich für die zahlreichen Ausflüge ins Münchner Nachtleben (Warum sind wir schon wieder in der Kölschbar?) bedanken. Meinem Box-Kollegen *Korbinian Heil* wünsche ich weiterhin viel Spaß bei Alu-Partys.

Bei *Christian Trindler* („Der Schweizer“ – es gibt nur einen!) möchte ich mich für die zahllosen Diskussionen und tollen Ausflüge an den Sarner See bedanken. *Dr. Markus Müller* danke ich für die Beantwortung von Fragen aller Art sowie einen tollen 10km Lauf. Bei den „alten Marburgern“ (allen voran *Dr. Johannes Gierlich* und *Dr. Uli Hennicke*) möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die stete Diskussionsbereitschaft bedanken. Meinen beiden Praktikanten *Toni Pfaffeneder* und *Felix Gnerlich* danke ich für die tatkräftige Unterstützung. Ich wünsche euch weiterhin viel Spaß im AK Carell. *Vroni Welzmilller* und *Julian Willibald* danke ich für die Unterstützung bei der Gestaltung des Angewandte-Covers.

Der größte Dank gebührt aber meiner Familie! Meine Eltern haben nie aufgegeben an mich zu glauben. Ihr unglaubliches Vertrauen hat mich dazu bewegt während dieser nicht einfachen Zeit durchzuhalten. Meiner Schwester danke ich für ihr offenes Ohr und dass ich immer willkommen bin.

Teile dieser Arbeit sind publiziert oder wurden auf Kongressen präsentiert:

Veröffentlichungen in rezensierten Zeitschriften

- ▶ Sigal Shachar, Omer Ziv, Sharon Avkin, Sheera Adar, John Wittschieben, Thomas Reißner, Stephen Chaney, Errol C. Friedberg, Zhigang Wang, Thomas Carell, Nicholas Geacintov, Zvi Livneh, *EMBO J.* **2009**, *28*, 383–393. Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals.
Highlighted in: Have you seen...? Kei-ichi Takata, Richard D. Wood, *EMBO J.* **2009**, *28*, 313–314. Bypass specialists operate together.
- ▶ Thomas Reißner, Sabine Schneider, Stephanie Schorr, Thomas Carell, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3142–3145; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3077–3080. Kristallstruktur eines Cisplatin-(1,3-GTG)-Schadens in Komplex mit DNA-Polymerase η .
Titelbild: Kristallstruktur eines Cisplatin-(1,3-GTG)-Schadens im Komplex mit DNA-Polymerase η (*Angew. Chem.* 17/2010)
- ▶ Sabine Schneider, Thomas Reißner, Omer Ziv, Zvi Livneh, Thomas Carell, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1521–1524. Translesion Synthesis of 1,3-GTG Cisplatin DNA Lesions.

Konferenzbeiträge

Posterpräsentationen

- 10/2008 Heidelberg, Deutschland; EMBL Conference on Chemical Biology 2008
- 03/2009 München, Deutschland; Synthesefest – A celebration of organic chemistry in Munich
- 08/2009 Glasgow, Schottland; 42nd IUPAC World Chemistry Congress
- 08/2009 Glasgow, Schottland; 42nd IUPAC World Chemistry Congress; Flash poster presentation
- 09/2009 Frankfurt, Deutschland; 3rd European Conference on Chemistry for Life Sciences

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	XV
Summary	XVIII
1. Einleitung	1
1.1. Entdeckung und Entwicklung von Cisplatin	1
1.2. Wirkungsweise von Cisplatin.....	3
1.3. DNA-Addukte von Cisplatin und Analoga.....	4
1.3.1. Verteilung der Platinierungsaddukte von Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin.....	4
1.3.2. Strukturen der 1,2-d(GpG) Addukte.....	5
1.3.3. Struktur des 1,3-d(GpTpG) Adduktes.....	7
1.3.4. Struktur eines Interstrang Adduktes.....	9
1.4. Cisplatin-Protein Addukte	10
1.5. Proteine gebunden an Cisplatin-modifizierte DNA.....	15
1.5.1. Erkennung von Cisplatin-Schäden durch HMG box Proteine.....	15
1.5.2. Inhibierung von RNA Polymerase II durch Cisplatin-DNA Addukte.....	17
1.5.3. Translesion-Synthese von Cisplatin 1,2-d(GpG) Addukten durch DNA Polymerase η	19
1.6. Der quantitative TLS Assay nach Livneh.....	24
1.6.1. Der TLS-Assay	24
1.6.2. Bisher erzielte Ergebnisse.....	25
2. Aufgabenstellung	28
3. Ergebnisse und Diskussion	29
3.1. Aufreinigung und Charakterisierung von Cisplatin-geschädigter DNA	29
3.1.1. Reaktion von Cisplatin mit Oligonukleotiden	29
3.1.2. Isolierung und Charakterisierung von 1,2-d(GpG) Cisplatin geschädigter DNA.....	31
3.1.3. Isolierung und Charakterisierung von 1,3-d(GpTpG) Cisplatin-geschädigter	

DNA	32
3.2. Herstellung und Aufreinigung der 2',3'-Dideoxyprimer	36
3.3. Translesion-Synthese des 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Schadens.....	38
3.4. Expression und Aufreinigung von Pol η	42
3.5. Primerverlängerungsstudien mit 1,3-d(GpTpG) geschädigter DNA und Pol η	43
3.6. Kristallisation des 1,3-d(GpTpG) Cisplatin-Schadens in Komplex mit Pol η	45
3.7. Kristallstruktur eines Cisplatin 1,3-d(GpTpG) Schadens in Komplex mit Pol η	47
4. Material und Methoden	54
4.1. Chemikalien und Lösungsmittel	54
4.2. Enzyme	54
4.3. Laborgeräte	55
4.4. Verwendete Puffer, Medien, Lösungen, Antibiotika und Induktoren	56
4.4.1. Puffer.....	56
4.4.2. Medien	58
4.4.3. Lösungen.....	58
4.4.4. Antibiotika und Induktoren.....	58
4.5. Darstellung, Aufreinigung und Charakterisierung von 1,2-d(GpG)- und 1,3-d(GpTpG) Cisplatin-Schäden.....	59
4.5.1. Auftrennung der platinieren Oligonukleotide.....	59
4.5.2. Charakterisierung durch enzymatischen Verdau	60
4.6. Festphasen-DNA-Synthese.....	61
4.6.1. Reverse DNA-Synthese von 2',3'-Dideoxy-Primer-Strängen	62
4.7. Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen	63
4.8. HPL-Chromatographie	64
4.9. Kapillaronengelelektrophorese	66
4.10. Massenspektrometrie	67
4.10.1. MALDI-ToF	67
4.10.2. HPLC-MS/MS	67
4.11. Mikrobiologische und protein-chemische Methoden	67
4.11.1. Transformation von elektrokompenten <i>E. coli</i>	67
4.11.2. Stammhaltung	68
4.11.3. Induktion der Proteinexpression von Pol η	68

4.11.4. Aufschluss im Durchflusshomogenisator	68
4.11.5. Proteinaufreinigung.....	69
4.11.6. SDS-Gelelektrophorese.....	70
4.12. Primerverlängerungsassay	71
4.12.1. DNA-Hybridisierung	71
4.12.2. Oligonukleotide für den Primerverlängerungsassay	71
4.12.3. Primerverlängerungsassay mit Pol η	71
4.12.4. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	72
4.13. Kristallisation von Pol η in Komplex mit geschädigter DNA und dNTP.....	73
4.14. Aufnahme und Prozessierung der Röntgenbeugungsdaten, Phasenbestimmung und Strukturverfeinerung.....	74
5. Anhang	75
5.1. Abkürzungen.....	75
5.2. Übersicht über die beobachteten Fragmente der Verdauversuche.....	78
5.3. Syntheseprotokolle zur reversen DNA-Synthese	79
5.3.1. Einbau des 5'-CE-dA- bzw. des 5'-CE-dC-Phosphoramidits.....	79
5.3.2. Einbau des 5'-CE-dG- bzw. des 5'-CE-dT-Phosphoramidits.....	80
5.3.3. Einbau des 2',3'-ddG-CE-Phosphoramidits	81
5.4. Experimentelle Daten, Prozessierungs- und Verfeinerungsstatistik der Co-Kristallstruktur.....	82
5.5. Abstandsauftragung der Entfernungen	83
5.6. Daten aus dem TLS-Assay nach <i>Livneh</i>	84
5.6.1. TLS-Prozess über den 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Schaden.....	84
5.6.2. Analyse der Mutationen während des TLS-Prozesses.....	85
6. Literaturverzeichnis.....	86

Zusammenfassung

Cisplatin ist ein weit verbreitetes Zytostatikum, das seine Wirkung durch die Ausbildung von Quervernetzungen innerhalb eines DNA-Stranges entfaltet. Für das Cisplatin 1,2-d(GpG) Dinukleotid-Addukt konnte bereits sowohl *in vitro* als auch in Zellen die zentrale Bedeutung von DNA Polymerase η (Pol η) während des TLS-Prozesses nachgewiesen werden. In Zusammenarbeit mit der Gruppe *Livneh* wurde untersucht, ob der 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Schaden ebenfalls in Zellen überlesen werden kann. Erstaunlicherweise sind humane Zellen in der Lage auch diesen komplexen Schaden zu überlesen, allerdings nur sehr ineffektiv. Da die Anzahl an Mutationen in Pol η defizienten Zellen deutlich erhöht war, konnte eine Beteiligung von Pol η am TLS-Prozess des 3'dGs des Schadens nachgewiesen werden. Somit konnte erneut die Initiator-Rolle von Pol η im Multi-Polymerasen Modell beim Überlesen von Cisplatin-Schäden bestätigt werden.

Um mechanistische Details des Pol η vermittelten TLS-Prozesses zu erhalten, wurde die TLS-Fähigkeit von *S. cerevisiae* Pol η mittels *in vitro* Primerverlängerungsstudien untersucht. Dazu wurde DNA, die den 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Trinukleotid-Schaden enthielt, hergestellt und mittels enzymatischen Verdaus charakterisiert. Mit dieser Methode konnte die Anwesenheit unerwünschter Nebenprodukte ausgeschlossen und die Entstehung des 1,3-Adduktes eindeutig nachgewiesen werden. Im Gegensatz zum 1,2-d(GpG) Addukt konnte Pol η alleine nicht über den 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Schaden replizieren. Einzelnukleotid-Insertionsstudien zeigten, dass gegenüber dem 3'dG fehlerfrei ein dC eingebaut wurde, während der nächste Insertionsschritt nur mit erhöhten Enzymkonzentrationen erfolgte und mutagen war.

Der Mechanismus des Replikationsblockes durch den 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Schaden wurde mittels Röntgenstrukturanalyse auf atomarer Ebene untersucht. Dazu wurde Cisplatin-geschädigte DNA als Templat in Komplex mit dem katalytischen Fragment von Pol η , einem dATP in der aktiven Tasche und einem Primer mit terminaler 2',3'-Dideoxyribose im zweiten Schritt der Verlängerung kristallisiert. Die Kristalle beugten die Röntgenstrahlung bis zu einer Auflösung von 2.5 Å. Im Kristall liegt der Komplex in zwei konformationell verschiedenen Formen vor. In beiden Formen (Komplex A und Komplex B) ist eine perfekte Watson-Crick Basenpaarung des 3'dGs (Pt-GTG) mit dem Primer zu erkennen. Dies erklärt die fehlerfreie Replikation des 3'dGs durch Pol η , welche sowohl in Zellen als auch *in vitro*

beobachtet wurde. Das Hauptmerkmal der beschriebenen Struktur ist das zentrale Thymin des Schadens. Es befindet sich nicht zwischen den beiden Guaninen, sondern ist komplett aus dem DNA-Doppelstrang herausgedreht. Folglich ist das zentrale Thymin unfähig, den zweiten Verlängerungsschritt zu dirigieren, der nun gegenüberliegend zum 5'dG (Pt-GTG) erfolgt.

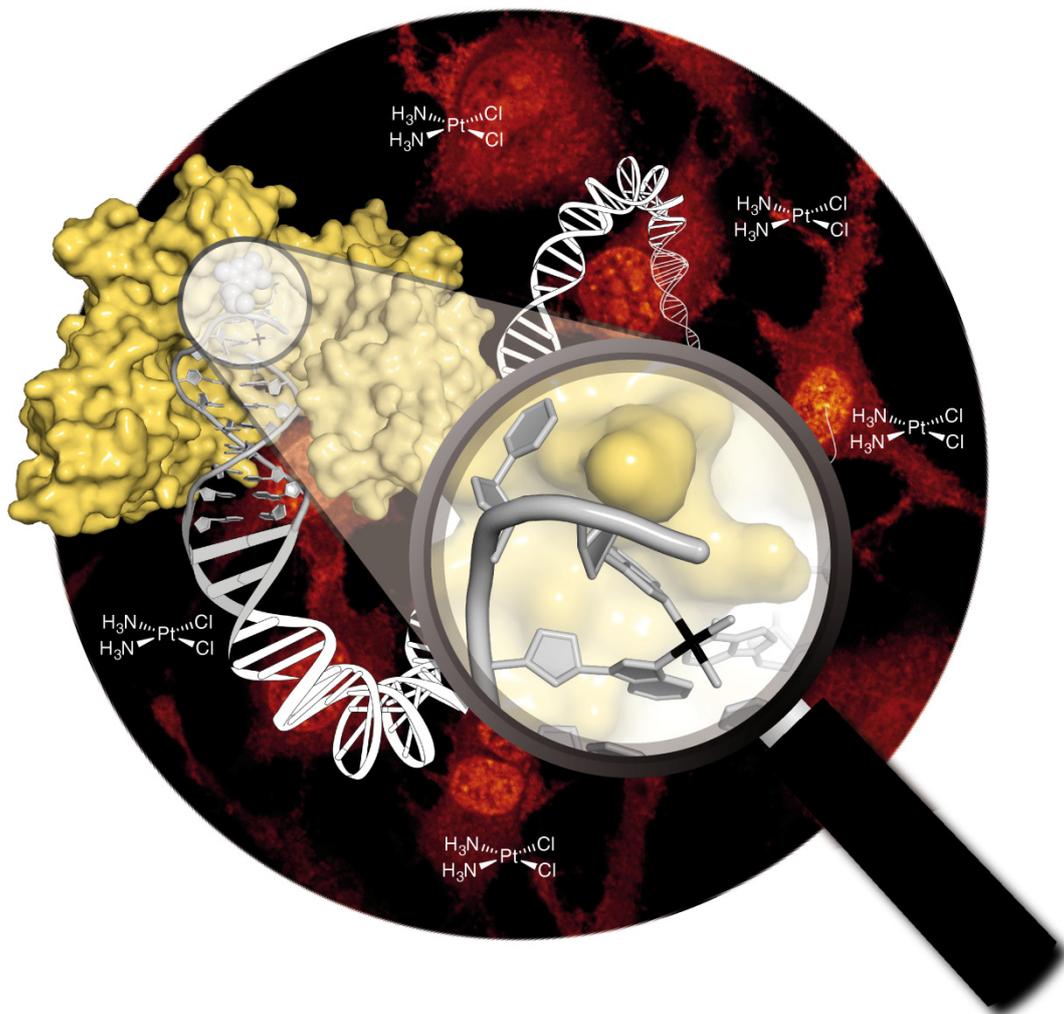


Abbildung 1. Schematische Darstellung des Replikationsblockes von Pol η durch den 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Schaden. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt den Zusammenstoß des zentralen Thymins des Trinukleotidschadens mit dem Protein. Dadurch wird eine weitere Bewegung des Enzyms entlang des DNA-Stranges verhindert.

Die Struktur beschreibt, wie der 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Schaden eine Verlängerung durch Pol η verhindert. Das zentrale Thymin, das durch die Koordination des Platinatoms aus den Trinukleotidschaden herausgedreht ist, ist direkt vor dem Protein positioniert. Es tritt dadurch in sterische Wechselwirkung mit Methionin 74 und verhindert eine weitere Bewegung der Polymerase entlang des DNA-Strangs (Abbildung 1).

Zudem ist zu sehen, warum die Inkorporation gegenüber dem 5'dG des Schadens so

ineffizient verläuft. Die Rotation der DNA in die aktive Tasche des Enzyms (Komplex A → Komplex B) wird durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem dATP in der aktiven Tasche und dem 5'dG des Schadens getrieben. Dabei vergrößert sich aber der Abstand zwischen dem α -Phosphat des dATPs und der „gemodelten“ 3'OH-Gruppe des Primers. Der Abstand von $\sim 8.5 \text{ \AA}$ ist für einen effektiven Nukleotidyltransfer eindeutig zu groß.

Summary

Cisplatin is a widely used cytostatic compound that exerts its anticancer activity by forming intrastrand DNA adducts. For the cisplatin 1,2-d(GpG) dinucleotide adduct the pivotal role of DNA Polymerase η (Pol η) during the TLS process was already verified both *in vitro* and in cells. In a cooperation with the research group of *Livneh* the ability of cells to bypass the 1,3-d(GpTpG) cisplatin lesion was investigated. Surprisingly, human cells were able to bypass this complex lesion, although rather inefficient. Through mutagenic rate analysis, the participation of Pol η in the bypass process of the 3'dG was revealed. Therefore, according to the multi-polymerase model, the role of Pol η as initiator in the bypass reaction of cisplatin lesions was demonstrated again.

To gain further mechanistic insights into this Pol η mediated bypass process, the TLS ability of *S. cerevisiae* Pol η was investigated via *in vitro* primer extension studies. For the experiment an oligonucleotide containing the trinucleotide lesion was produced and characterized using enzymatic digestion. This method allowed us to exclude undesired side products. The presence of the product could be unequivocally verified. In contrast to the 1,2-d(GpG) adduct, Pol η was not able to replicate through the 1,3-d(GpTpG) cisplatin lesion. Single nucleotide insertion studies revealed the correct incorporation of a dC opposite the 3'dG. The next incorporation step could be achieved only with high enzyme concentration and was highly mutagenic.

The mechanism of the replication block by the 1,3-d(GpTpG) cisplatin damage was determined at the molecular level via X-ray crystallography. For that purpose cisplatin damaged DNA as template was crystallized in the second elongation step in complex with a shortened version of Pol η , dATP in the active site and a primer strand which terminates at the 3'-end with a 2',3'-dideoxyribose. The resulting crystals diffracted to 2.5 Å resolution at a synchrotron light source. In the crystal the complex existed in two conformationally different forms. In both forms (complex A and complex B) the primer forms perfect Watson-Crick base pairing with the 3'dG of the lesion (Pt-GTG). This explains the error free replication of the 3'dG by Pol η . The main feature of the structure is the central thymine of the lesion. It is not positioned between the two neighboring guanines but completely rotated out of the DNA duplex. Therefore, the central thymine cannot direct the second elongation step, which then has to occur at the 5'dG (Pt-GTG).

The structure describes how the 1,3-d(GpTpG) cisplatin lesion blocks the elongation by Pol η . The central thymine, which is flipped out of the trinucleotide lesion through the coordination of the platinum atom, is positioned directly in front of the protein. It sterically interacts with methionine 74 and hinders further movement of the polymerase along the DNA template (Figure 1).

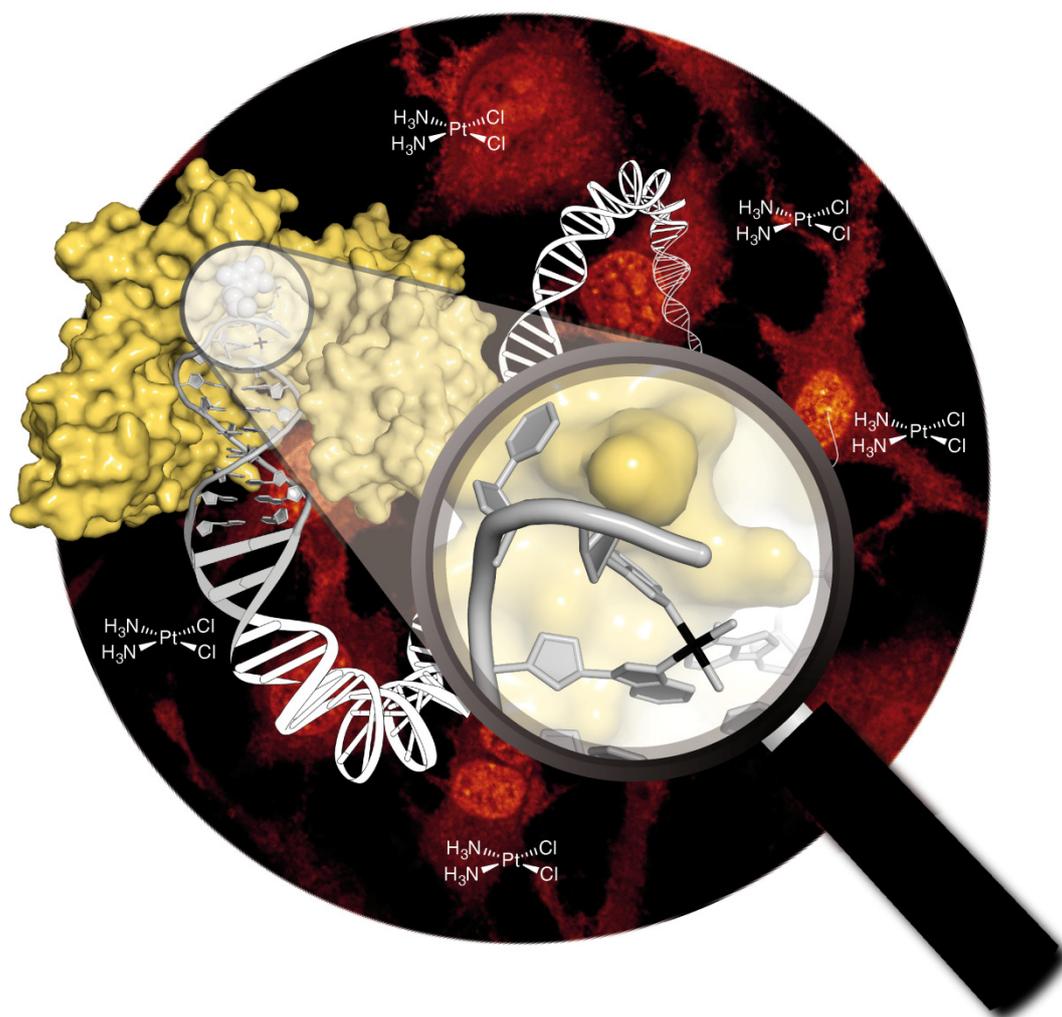


Figure 1. Schematic representation of the replication block of Pol η by the 1,3-d(GpTpG) cisplatin lesion. The magnification shows the clash of the central thymine of the trinucleotide lesion with the protein. This hinders further movement of the enzyme along the DNA template.

The structure further explains why the incorporation opposite the 5'dG of the lesion is so inefficient. The rotation of the DNA into the active site of the enzyme (complex A \rightarrow complex B) is driven by hydrogen bonding between the dATP in the active site and the 5'dG of the lesion. In the process the distance between the α -phosphate of the dATP and the putative 3'OH group of the primer increases. Finally, the distance of $\sim 8.5 \text{ \AA}$ is clearly too

Summary

large for efficient nucleotidyl transfer to occur.

1. Einleitung

1.1. Entdeckung und Entwicklung von Cisplatin

Cisplatin (*cis*-Diammindichloroplatin(II)) ist ein Übergangsmetallkomplex, der erstmals 1844 durch *Peyrone* beschrieben wurde.^[1] Als diese Verbindung in der Mitte des 19. Jahrhunderts entdeckt wurde, wusste *Peyrone* jedoch noch nichts von deren tumorhemmender Wirkung.^[2] Erst über 100 Jahre später (1965) entdeckten *Rosenberg et al.* die zytostatische Aktivität des Komplexes.^[3] Bei der Untersuchung des Wachstums von *Escherichia coli* Bakterien unter Einwirkung eines elektrischen Feldes konnte *Rosenberg* eine vollständig gehemmte Zellteilung bei unvermindertem Bakterienwachstum beobachten. Die Bakterien entwickelten im Verlauf der Experimente lange, fadenförmige Filamente, die bis auf das 300fache ihrer normalen Länge heranwuchsen (Abbildung 2).^[4-5]

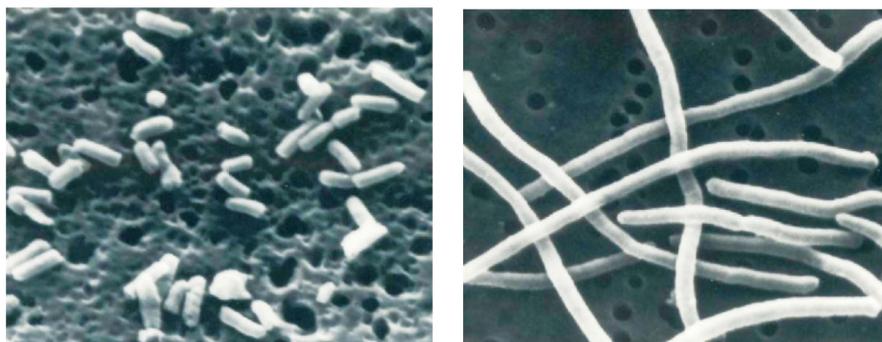


Abbildung 2. Einfluss von Cisplatin auf das Wachstum von *E. coli* Bakterien. Links: Normales Wachstum; Rechts: Filamentartiges Wachstum.^[2] Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

Der Stromfluss wurde in diesen Studien durch zwei Platin-Elektroden in einem Ammoniumchlorid-haltigen Bakterien-Nährmedium erzeugt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass sich die in Ammoniumchlorid-haltiger Umgebung als inert angenommenen Platin-Elektroden während der Elektrolyse zersetzten und zur Bildung von *cis*-Diammintetrachloroplatin(IV)- und *cis*-Diammindichloroplatin(II)-Komplexen führten (Abbildung 3). Diese neutralen Verbindungen waren letztendlich in der Lage, die Zellteilung vollständig zu unterbinden, während das Bakterienwachstum unbeeinflusst blieb.^[6]

Vier Jahre später (1969) konnte die Aktivität von Cisplatin gegenüber Tumoren in einem Maus-Modell nachgewiesen werden.^[7-8] Bereits 1971 wurden die ersten Patienten mit Cisplatin behandelt^[9] und 1978 wurde Cisplatin in den USA für die Tumorbehandlung unter

1. Einleitung

den Handelsnamen Platinol[®] und Platosin[®] durch die FDA (US Food and Drug Administration) zugelassen.^[10] Heute zählt Cisplatin zu den klinisch routinemäßig eingesetzten Zytostatika. Fast jedes zweite Therapieschema für Tumorerkrankungen basiert auf einer platinhaltigen Verbindung. Der jährliche weltweite Umsatz liegt bei etwa 3 Mrd. Euro.^[2]

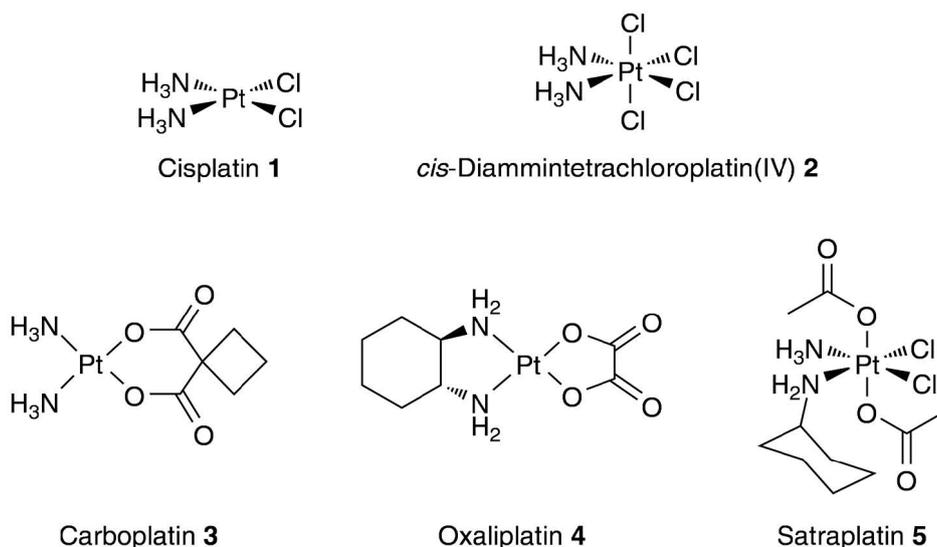


Abbildung 3. *cis*-Diammindichloroplatin(II) **1**, *cis*-Diammintetrachloroplatin(IV) **2**, Carboplatin **3**, Oxaliplatin **4**, Satraplatin **5**.

Cisplatin wird als Erstlinientherapeutikum im Falle von epithelialen Tumoren des Urogenitaltraktes (Ovarien, Hoden, Blase) sowie Bauchspeicheldrüsen-, Kopf-, Magen- und Darm-Tumoren eingesetzt.^[11-12] Im Falle von Hodenkrebs liegt bei einer frühen Diagnose die Heilungschance bei annähernd 100%. Da Cisplatin selbst nicht am Dickdarmkarzinom (einem der häufigsten Tumore) wirkt, stellte die Entwicklung von Oxaliplatin einen großen Fortschritt dar. Die Therapie metastasierter kolorektaler Karzinome hat sich somit in den vergangenen Jahren durch den Einsatz von Oxaliplatin stark verändert. Inzwischen zählt Oxaliplatin (Eloxatin[®]) zu den *Blockbustern* der Pharma-Industrie (jährlicher Umsatz von mehr als 1 Mrd. Euro).^[13] Des Weiteren wird an dem vielversprechenden platinhaltigen Chemotherapeutikum Satraplatin geforscht. Im Gegensatz zu den momentan auf dem Markt verfügbaren platinhaltigen Chemotherapeutika, die intravenös verabreicht werden müssen, kann Satraplatin oral eingenommen werden.^[14]

Trotz all dieser Vorteile treten beim Einsatz von platinhaltigen Medikamenten schwere Nebenwirkungen auf. Neben Schädigung des Hörvermögens, Übelkeit, Neurotoxizität und peripherer Neuropathie unterbindet vor allem eine akute und kumulative Nierentoxizität den

längerfristigen und hochdosierten Einsatz des Medikamentes.^[15-19]

1.2. Wirkungsweise von Cisplatin

Während einer Chemotherapie wird Cisplatin intravenös verabreicht. Der Transport des Chemotherapeutikums erfolgt nach der Injektion über die Blutbahn. Wegen der hohen Konzentration an Chlorid-Ionen im Blut (~100 mM), liegt Cisplatin als neutraler Komplex vor (Abbildung 4). Innerhalb einer Zelle ist die Chlorid-Ionen Konzentration erheblich geringer (~4 mM). Nachdem der Komplex die Zellmembran durchquert hat, hydrolysiert Cisplatin im Zytoplasma zu kationischen Aquakomplexen (Abbildung 4). Das Chemotherapeutikum wird dabei gleichermaßen von gesunden als auch von Krebszellen aufgenommen. Die entstandene elektrophile Spezies $[cis\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ kann nun mit den unterschiedlichen zellulären Bestandteilen reagieren. Als reaktive Partner stehen Proteine, RNA, DNA, Membranphospholipide, Mikrofilamente und thiolhaltige Moleküle^[20] (z. B. Glutathion) zur Verfügung.^[12]

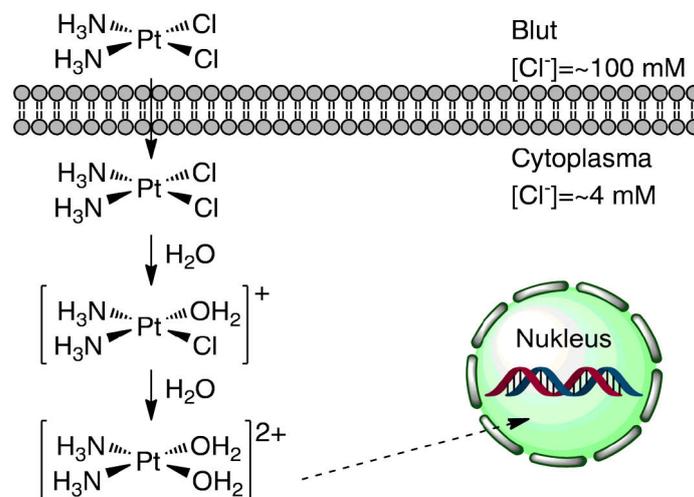


Abbildung 4. Hydrolyse von Cisplatin innerhalb der Zelle.

Um überhaupt mit der DNA zu reagieren, muss das aktivierte Cisplatin eine Unzahl an zellulären Bestandteilen passieren und in den Zellkern diffundieren. Hat Cisplatin den Zellkern erreicht, reagiert es dort durch die hohe Nukleotidkonzentration primär mit DNA. *Lippard und Mitarbeiter* beschreiben, dass die Monoaquaspezies $[\text{cis}\text{-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$ zuerst ein monofunktionelles Addukt mit Guanin oder Adenin bildet. Anschließend wird der weitere Chlorid-Ligand hydrolysiert und es entsteht eine Quervernetzung der Basen (Abbildung 4).^[21-23] Die dabei entstandenen Addukte beeinträchtigen bzw. blockieren die

Transkription und die Replikation der Erbinformation gänzlich. Schnellteilendes Gewebe, zu denen die Tumorzellen gehören, wird durch die Hemmung der Replikation besonders geschädigt.^[24]

1.3. DNA-Addukte von Cisplatin und Analoga

Die Haupteigenschaft von Cisplatin besteht darin, kovalente Bindungen mit den DNA-Basen einzugehen. Die entstandenen DNA-Addukte begründen die Zelltoxizität von Cisplatin und den daraus resultierenden Zelltod. Cisplatin bildet mehrere Addukte mit DNA, die sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen wurden. Dabei koordiniert das Platin-Atom vor allem an das *N7*-Atom der Purinbasen. Es besitzt dabei eine starke Präferenz für Guanin gegenüber Adenin.^[25] Die möglichen Bindungsmodi beinhalten monofunktionelle Addukte, bifunktionelle Verknüpfungen (sowohl Intrastrang als auch Interstrang) und Protein-DNA Verbindungen (Abbildung 5).^[26-27]

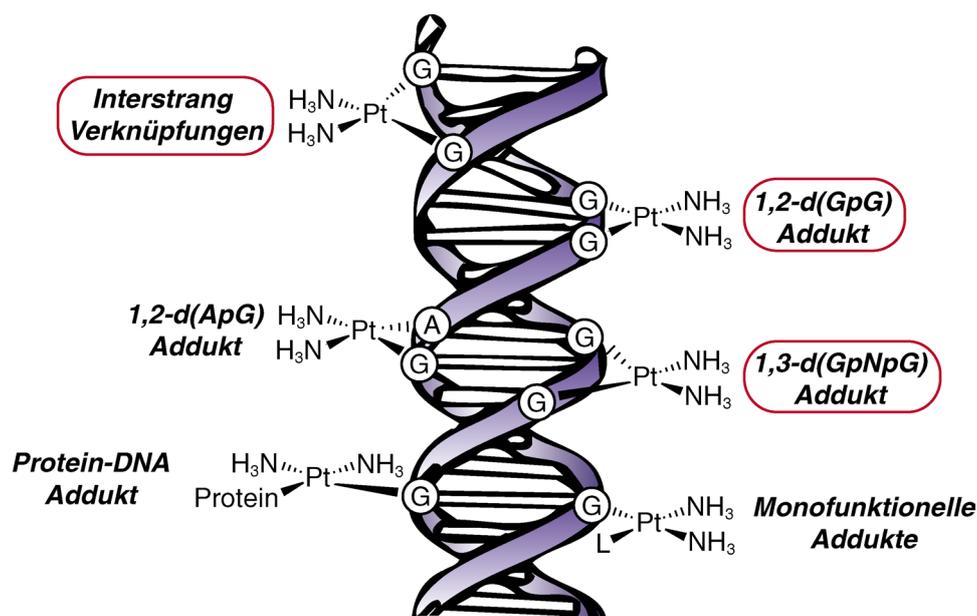


Abbildung 5. Interaktion von Cisplatin mit DNA-Nukleobasen. Von den rot umrandeten Cisplatin-Addukten sind Röntgen- bzw. NMR-Strukturen bekannt.

1.3.1. Verteilung der Platinierungsaddukte von Cisplatin, Carboplatin und Oxaliplatin

Durch die *cis*-Anordnung der Abgangsgruppen (im Falle von Cisplatin: Chlorid) sind Intrastrang-Addukte zwischen zwei benachbarten Nukleobasen die am häufigsten beobachtete Spezies. Als Hauptprodukt von Cisplatin bildet sich dabei das Intrastrang 1,2-d(GpG) Addukt (60–65%). Als weitere Produkte entstehen das Intrastrang 1,2-d(ApG) Addukt (25–30%) und das Intrastrang 1,3-d(GpNpG) Addukt, in dem eine Base zwischen zwei benachbarten

Guaninen sitzt. Produkte, die sehr selten beobachtet werden, sind Interstrang Verknüpfungen und Protein-DNA Addukte (Tabelle 1). Auf Grund des hohen Vorkommens von 1,2-d(GpG) Intrastrang Addukten wird diesem Schaden die Zytotoxizität von Cisplatin zugeordnet.^[28-30] Interessanterweise konnte die Bildung eines 1,2-(GpA) Adduktes nicht nachgewiesen werden.^[31] Oxaliplatin zeigt ein ähnliches DNA-Addukt Spektrum wie Cisplatin.^[32-33] Der einzige Unterschied ist, dass die Oxaliplatin-DNA Schäden eine $[\text{Pt}(\text{DACH})]^{2+}$ -Gruppe enthalten und keine $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ -Gruppe (Abbildung 3).

Cisplatin-Addukt	Vorkommen
1,2-d(GpG)	~65%
1,2-d(ApG)	~25%
1,3-d(GpNpG)	~5–10%
Interstrang Verknüpfungen	<1%
Monofunktionelle Addukte	<1%

Tabelle 1. Verteilung der entstandenen Cisplatin-Addukte nach Analyse von gereinigter DNA behandelt mit Cisplatin oder von isolierter DNA von mit Cisplatin behandelten Patienten.^[34]

Obwohl Carboplatin **3** dieselben Addukte wie Cisplatin bildet, ist die Produktverteilung grundlegend verschieden.^[35] Als Hauptprodukt wird der 1,3-d(GpNpG) Schaden (36%) beschrieben, gefolgt von 30% 1,2-d(GpG) Addukten und 15% 1,2-d(ApG) Addukten (Tabelle 2).

Carboplatin-Addukt	Vorkommen
1,3-d(GpNpG)	36%
1,2-d(GpG)	30%
1,2-d(ApG)	16%
Interstrang Verknüpfungen & monofunktionelle Addukte	3–4%

Tabelle 2. Verteilung der DNA-Addukte nach Behandlung mit Carboplatin.^[35]

Auch hier lässt die Anzahl der Intrastrang-Addukte darauf schließen, dass diese für die Zytotoxizität von Carboplatin verantwortlich sind.

1.3.2. Strukturen der 1,2-d(GpG) Addukte

Bei der Aufklärung der Strukturen dieser Addukte konzentrierte man sich anfänglich auf Röntgenstrukturen von platinieren Di- oder Trinukleotiden.^[30, 36-37] Erst mit der

Strukturaufklärung eines DNA-Dodekamer Duplexes mit einem spezifischen 1,2-(GpG) Addukt konnten Details über Cisplatin-geschädigte DNA gewonnen werden (Abbildung 6a).^[38-39] Die röntgenkristallographische Untersuchung des Dodekamers d(CCTCTGGTCTCC) • d(GGAGACCAGAGG) (die platingebundenen Basen sind unterstrichen) zeigt wie die Platin-Koordination einen Knick in der DNA-Helix induziert (Abbildung 6a). Die DNA ist um 35–40° in Richtung der großen Furche gekrümmt und die Helix um ~25° aufgeweitet. Die DNA liegt in 5'-Richtung des Schadens in A-Form vor und in 3'-Richtung in B-Form. Der Winkel zwischen den beiden Ebenen, die die koordinierten Guaninringsysteme aufspannen, beträgt 26°. Dieser Winkel führt zu einer Deformierung der Pt-N7 Bindung. Dadurch ist das Platin-Atom ~1 Å aus der durch die Guaninbasen definierten Ebene herausgehoben, was auf eine beträchtliche Spannung in der näheren Umgebung des DNA-Schadens schließen lässt.^[38-39]

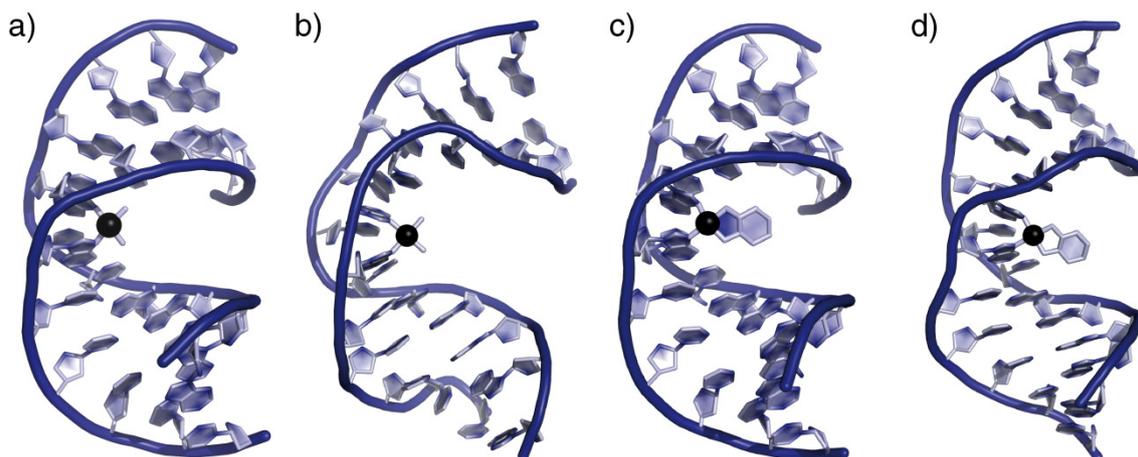


Abbildung 6. Röntgenkristall- und NMR-Strukturen von Doppelstrang-DNA, die ein Cisplatin 1,2-d(GpG) Addukt enthalten. a) Kristallstruktur des Cisplatin 1,2-d(GpG) Intrastrang Adduktes (1AIO).^[38-39] b) NMR-spektroskopische Struktur des Cisplatin 1,2-d(GpG) Intrastrang Adduktes (1A84).^[40] c) Kristallstruktur des Oxaliplatin 1,2-d(GpG) Intrastrang Adduktes (1IHH).^[41] d) NMR-spektroskopische Struktur des Oxaliplatin 1,2-d(GpG) Intrastrang Adduktes (1PG9).^[42] In Klammern sind die PDB-Zugangscodes angegeben.

Die Strukturaufklärung desselben Cisplatin-DNA Adduktes mittels NMR-Spektroskopie (Abbildung 6b) konnte interessante Unterschiede beider Strukturbestimmungen aufzeigen.^[40] Die NMR-Struktur zeigt eine Krümmung der DNA um 78°, während der Diederwinkel zwischen den Ebenen der benachbarten Guanine einen Wert von 49° einnimmt. Beide Werte sind größer als die entsprechenden Werte der Röntgenstrukturanalyse was den starken Einfluss der Kristallpackung auf die Struktur demonstriert. Dieser fehlt in dem dynamischen System in der flüssigen Phase. Des Weiteren liegt die DNA in der NMR-Struktur ausschließlich in der B-Form vor.^[43] Die gepaarten Basen in 5'-Richtung des Adduktes sind

stärker gegeneinander verdreht, das heißt, die platinierter Base ist viel stärker in Richtung der kleinen Furche der DNA verschoben.^[44-45] Eine hervorragende Übersicht über die einzelnen Parameter und deren tabellarischer Vergleich bietet *Chem. Rev.* **1999**, *99(9)*, 2467–2498.

Das Addukt des cisplatinanalogen Medikamentes Oxaliplatin mit dem bereits oben beschriebenen DNA-Dodekamer d(CCTCTGGTCTCC) konnte ebenfalls röntgenographisch charakterisiert werden (Abbildung 6c).^[46] [Pt(*R,R*-DACH)]²⁺ bildet erwartungsgemäß ein Intrastrang 1,2-d(GpG) Addukt mit den beiden Guaninbasen in der Mitte der Dodecamersequenz. Daraus resultieren eine Krümmung der DNA um ca. 30° zur großen Furche hin und ein Diederwinkel von 25° zwischen den Ebenen der bindenden Guaninbasen. Die DNA enthält sowohl A- als auch B-Form ähnliche Teilbereiche. Dies lässt sich wiederum durch Effekte der Kristallpackung erklären.

Die NMR-Struktur des Oxaliplatin 1,2-d(GpG) Adduktes^[42] ist sehr ähnlich zu der NMR-Struktur des Cisplatin-Adduktes. Die DNA liegt vor allem in der B-Form vor. Jedoch beträgt der Biegungswinkel nur 31° im Gegensatz zu annähernd 80° in der Cisplatin-Struktur. In Analogie zu der Struktur des Cisplatin-Dodecamer-Adduktes kann ebenfalls eine starke Störung der Watson-Crick-Basenpaarung um den DNA Schaden herum beobachtet werden. Die stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen der Liganden zur DNA werden bei den beiden Platinkomplexen jedoch in unterschiedlicher Weise ausgebildet. In dem Oxaliplatin DNA-Addukt findet man eine Wasserstoffbrücke zwischen dem pseudoäquatorialen Wasserstoffatom der Aminogruppe des *R,R*-DACH-Liganden und dem O6-Sauerstoffatom des koordinierenden 3'-Guanins innerhalb des platinieren d(GpG)-Schadens. Im Gegensatz zum Cisplatin-Addukt findet man aber keine Wechselwirkung des Liganden mit einem unspezifischen Phosphatsauerstoff des DNA-Rückgrats. Diese Interaktion kann nur vom biologisch aktiven *R,R*-Isomer (Abbildung 3 4) ausgebildet werden, jedoch nicht vom inaktiven *S,S*-Isomer. Man vermutet, dass diese konformellen Unterschiede für die unterschiedliche Erkennung durch Proteine und das zelluläre Prozessieren verantwortlich sind.^[47-49]

1.3.3. Struktur des 1,3-d(GpTpG) Adduktes

Im Gegensatz zum 1,2-d(GpG) Addukt sind vom Cisplatin 1,3-d(GpTpG) Addukt nur NMR-Strukturen bekannt. Dieser Schaden, der das Hauptaddukt von Carboplatin ist, verändert die Struktur der DNA auf eine andere Art und Weise wie das 1,2-d(GpG) Addukt. Die erste NMR-Struktur wurde 1994 von *van Hout und Mitarbeiter* beschrieben (Abbildung 7a).^[41]

Hier ist die DNA um $\sim 30^\circ$ gebogen und die kleine Furche aufgeweitet. Im Gegensatz zum 1,2-d(GpG) Addukt ist eine starke Störung der DNA-Helix lokal zu finden. Während das 3'dG des Adduktes eine normale Watson-Crick Basenpaarung eingeht, weist das 5'dG eine starke Verzerrung auf, was zu einer gestörten Basenpaarung führt. Des Weiteren ist das zentrale Thymin des 1,3-d(GpTpG) Adduktes komplett von der Basenpaarung ausgeschlossen. Es ist in der kleinen Furche positioniert und geht hydrophobe Wechselwirkungen mit dem 5'dG des Adduktes (Abbildung 7a).

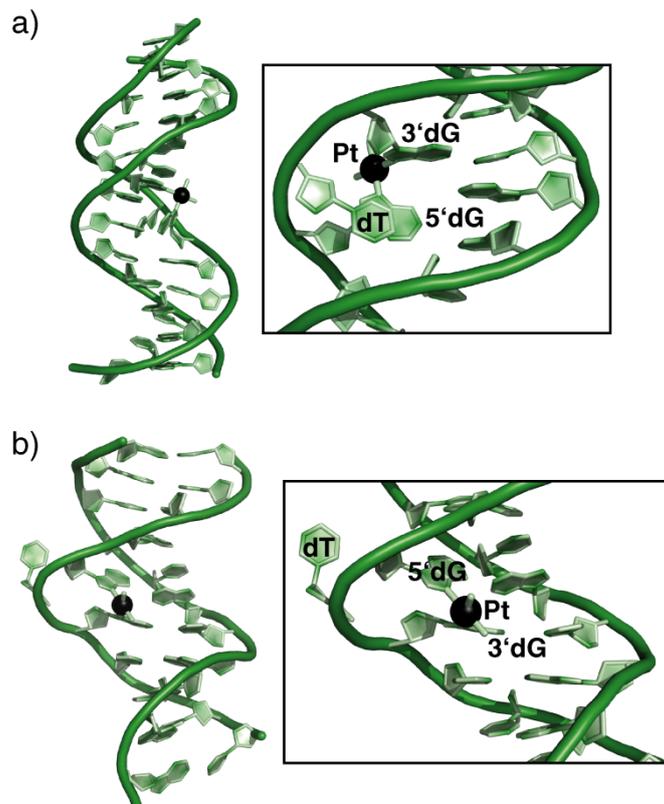


Abbildung 7. a) NMR-spektroskopische Struktur des Cisplatin 1,3-d(GpTpG) Intrastrang Adduktes nach *van Houte* (PDB-Zugangscode: 1DA4).^[41] b) NMR-spektroskopische Struktur des Cisplatin 1,3-d(GpTpG) Intrastrang Adduktes nach *Reedijk* (die Koordinatendatei wurde von Prof. Dr. Jan Reedijk zur Verfügung gestellt).^[50]

Reedijk und Mitarbeiter veröffentlichten 1999 erneut eine NMR-Struktur des 1,3-d(GpTpG) Adduktes.^[50] Sie beobachteten ebenfalls den Verlust der Basenpaarung für das 5'dG und für das zentrale Thymin des Adduktes. Des Weiteren wurde aber beschrieben, dass das zentrale Thymin des 1,3-d(GpTpG) Adduktes aus der kleinen Furche herausgedreht ist. Der Schaden verursacht in dieser Form eine Aufweitung der kleinen Furche. Die Helix ist lokal entwunden und in Richtung der großen Furche gebogen. Diese Struktur stimmt auch mit zuvor beschriebenen biochemischen Daten überein,^[51-53] die ein herausgedrehtes zentrales Thymin

postulierten.

1.3.4. Struktur eines Interstrang Adduktes

Die Charakteristika des Interstrang d(GpG) Adduktes konnten ebenfalls durch NMR-Spektroskopie und Röntgenstrukturanalyse bestimmt und verglichen werden. Die Bildung eines Interstrang Adduktes tritt überwiegend zwischen zwei Guanin-Nukleosidbasen an gegenüberliegenden DNA-Strängen auf und erfordert einen Abstand von ca. 3 Å zwischen den beiden koordinierenden N7-Atomen. Die häufigsten Interstrang Addukte treten zwischen den Sequenzen 5'-CG und 3'-CG auf.^[54] Da innerhalb dieser Sequenzen die beiden Guaninreste einen Abstand von ca. 7–9 Å voneinander einnehmen, bedarf es einer extremen Verzerrung der DNA zur Ausbildung des Interstrang-Crosslinks.

Die Charakterisierung des Platin-Dekamer-Produktes $cis\text{-}\{[Pt(NH_3)_2]^{2+}\{d(CATAGCTATG)_2\}$ mittels NMR-Spektroskopie (Abbildung 8a)^[55] zeigte überraschenderweise eine starke Umstrukturierung der DNA-Struktur an der Koordinationsstelle, die zu einer Positionierung des Cisplatin in der kleinen Furche führt. Es tritt zusätzlich eine Entwindung der Helix um ca. 80° und eine Krümmung um ca. 20–40° in Richtung der großen Furche auf. Die Desoxyribose der platinieren Guanin-Base ist invertiert, wodurch das O4' im Vergleich zu den anderen Nukleotiden in die entgegengesetzte Richtung weist. Zusätzlich ist das ursprünglich mit dem platinieren Guanin gepaarte Cytosin aus der DNA verdrängt und ragt aus der Helixstruktur heraus.

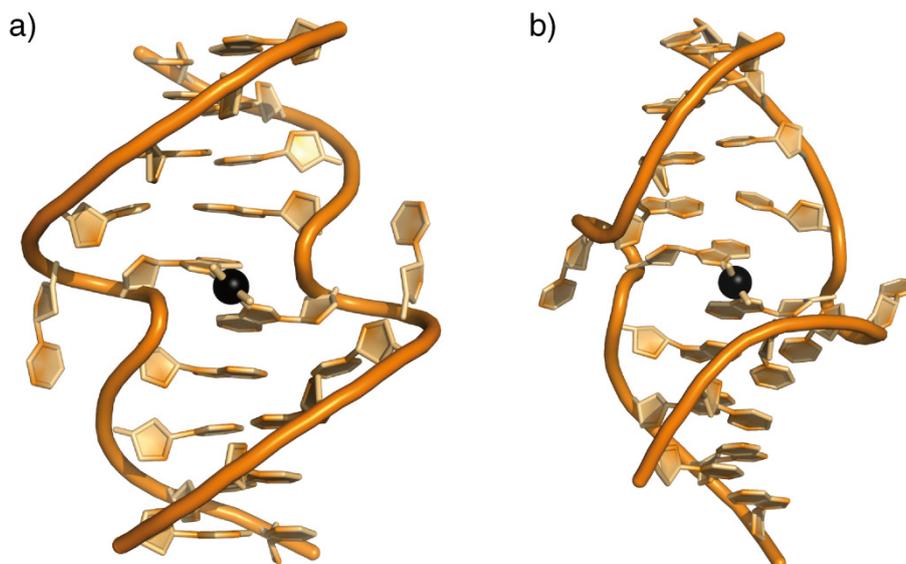


Abbildung 8. a) NMR-spektroskopisch ermittelte Struktur eines Cisplatin Interstrang Adduktes (1DDP).^[55] b) Röntgenkristallstruktur eines Cisplatin Interstrang Adduktes (1A2E).^[56] In Klammern sind die PDB-Zugangscodes angegeben.

Die korrespondierende Röntgenstrukturanalyse des Adduktes bestätigt die veränderte Lage des Cisplatin. Die Helix ist innerhalb der röntgenographisch bestimmten Addukt-Struktur um 47° gekrümmt und um 70° entwunden (Abbildung 8b).^[56]

1.4. Cisplatin-Protein Addukte

Nach der Entdeckung der therapeutischen Wirkung von Cisplatin hat sich die Forschung der folgenden Jahre vor allem auf die Wechselwirkung mit DNA konzentriert. Es verwundert, dass die Interaktion von Platin-basierten Chemotherapeutika mit Proteinen eher auf geringe Beachtung gestoßen ist. Ein nun steigendes Interesse an diesen Wechselwirkungen^[57] begründet sich auf die Rolle von Proteinen bei Aufnahme- und Verteilungsprozessen platinhaltiger Chemotherapeutika sowie deren Einfluss auf die Toxizität.^[58] Die aktuelle Forschung auf diesem Gebiet charakterisiert die möglichen Addukte und deren Reaktivität auf molekularer Ebene sowie identifiziert die wichtigsten Zielproteine der zellulären Prozesse. Dabei spielt die Co-Kristallisation von Therapeutikum und Protein eine wichtige Rolle in der Untersuchung der Wechselwirkung und Beeinflussung der Eigenschaften von Proteinen durch diese niedermolekularen Moleküle.

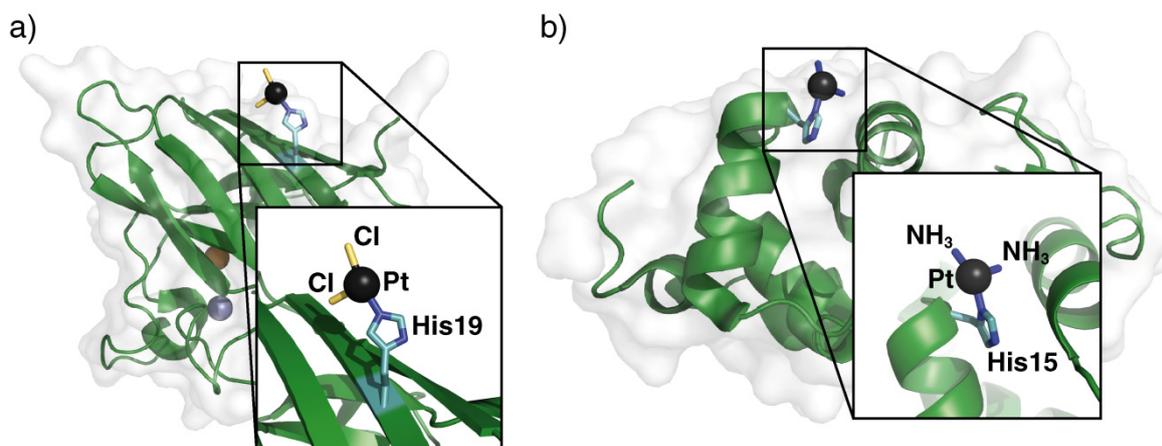


Abbildung 9. a) Kristallstruktur der Kupfer-Zink Superoxid-Dismutase mit gebundenem Cisplatin. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die Koordination des Histidins 19 an das Platin-Atom. Als weitere Liganden konnten zwei Chloride nachgewiesen werden (PDB-Zugangscode: 2AEO). b) Kristallstruktur von Lysozym mit koordiniertem Cisplatin. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt die Koordination an Histidin 15 sowie die Ammoniak-Liganden (PDB-Zugangscode: 2I6Z).

Erst 2006 wird die Kristallstruktur von Cisplatin gebunden an ein Protein beschrieben. Den Forschungsgruppen um *Mangani* und *Messori* gelang die Umsetzung von Kupfer-Zink Superoxid Dismutase aus Rindererythrozyten mit Cisplatin und die anschließende Kristallisation.^[59] Die Forscher konnten zeigen, dass das gebundene Cisplatin keine

strukturellen Änderungen verursacht. Des Weiteren konnten sie eine spezifische Bindung von Cisplatin an das Nε2-Stickstoffatom von Histidin 19 beobachten. Dieses liegt an der Protein-Oberfläche und ist damit am Leichtesten zugänglich. Erstaunlicherweise tragen die Schwefelatome des Enzyms nicht zur Bindung von Cisplatin bei. Als Gründe dafür werden die sterische Abschirmung von Methionin und Cystein sowie die Ausbildung von Disulfidbrücken aufgeführt. Am erstaunlichsten ist die beschriebene Koordination von Cisplatin an das Histidin 19. Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Bindungsmodi von Cisplatin sind hier überraschenderweise die Ammoniak-Liganden ausgetauscht. Der vierte Ligand konnte kristallographisch nicht bestimmt werden. Es wird allerdings Wasser als Ligand vermutet. Das beschriebene Phänomen des Verlustes der beiden Ammoniak-Liganden führen die Autoren als mögliche Erklärung für eine Cisplatin-Inaktivierung an, da für die biologische Aktivität von Cisplatin die NH₃-Liganden benötigt werden.^[60-61]

Dieselbe Forschergruppe berichtete 2007 von der Kristallisation von Lysozym (aus Hühnereiweiß) mit Cisplatin.^[62] Dabei wiesen die Forscher wiederum eine Platinierung ausschließlich an Histidin 15 nach, das sich an der Proteinoberfläche befindet. Die schwer zugänglichen Methionine blieben erneut unmodifiziert. Ebenfalls ähnelte die Kristallstruktur des nativen Proteins der des umgesetzten Proteins. Diesmal wurde aber ein Austausch der Chlorid-Liganden beobachtet. Wiederum konnte der vierte Ligand nicht identifiziert werden. Der Koordinationsmodus von Cisplatin wurde durch massenspektrometrische Methoden bestätigt.

Spezifität der Platinierung von DNA in Gegenwart von Proteinen

Es stellt sich nachwievor die Frage, wie auf Platin basierende Chemotherapeutika in Gegenwart der vielen Schwefel-haltigen Liganden innerhalb der Zelle DNA-Addukte bilden können.^[20, 61] In diesem Zusammenhang untersuchten *Davey und Mitarbeiter* röntgenkristallographisch die Reaktion von Cisplatin und Oxaliplatin mit dem Nukleosom-Kern-Partikel und der daran gebundenen DNA.^[63] Die Forscher benutzten die Methode der differentiellen anomalen Röntgenstreuung durch Schwermetalle. Die gefundenen Platinkoordinationsstellen hatten dabei einen Belegungsgrad (*occupancy*) von ~10–40%.

Für Cisplatin beschrieben *Davey und Mitarbeiter* die Bildung von 1,2-d(ApG) Addukten in der Nähe des Partikelzentrums (Abbildung 10a). Eine Anhäufung von Cisplatin-Addukten beobachteten sie in der Nähe des Partikelterminus mit der Sequenz CAGGTG. Cisplatin

koordiniert hier an 1,2-d(ApG) (CAGGTG), 1,2-d(GpG) (CAGGTG) und 1,3-d(GpTpG) (CAGGTG) (Abbildung 10b–d). Am Histon selber lokalisierten die Forscher Cisplatin an der Aminosäure Methionin 120 (Abbildung 10e) sowie an Methionin 84 (Abbildung 10f). Im Fall von Oxaliplatin koordiniert das Platin-Atom ebenfalls an Methionin 84 und 120, allerdings mit einer starken Bevorzugung von Methionin 84 (Abbildung 11a und b). Koordination an GG Dinukleotide wurde dreimal innerhalb eines TGGGA Abschnittes beobachtet (Abbildung 11c, d und e). Des Weiteren bildeten sich in der Nähe des Partikelzentrums ein 1,2-GA Addukt (Abbildung 11f) und ein 1,2-AG Addukt (Abbildung 11g) innerhalb eines CAGA Abschnittes nahe des Terminus. Die DNA-Platin Stelle mit dem höchsten Belegungsgrad von ~80% wurde am Nukleosom-Terminus durch Ausbildung eines monofunktionellen Adduktes mit dA nachgewiesen (Abbildung 11g).

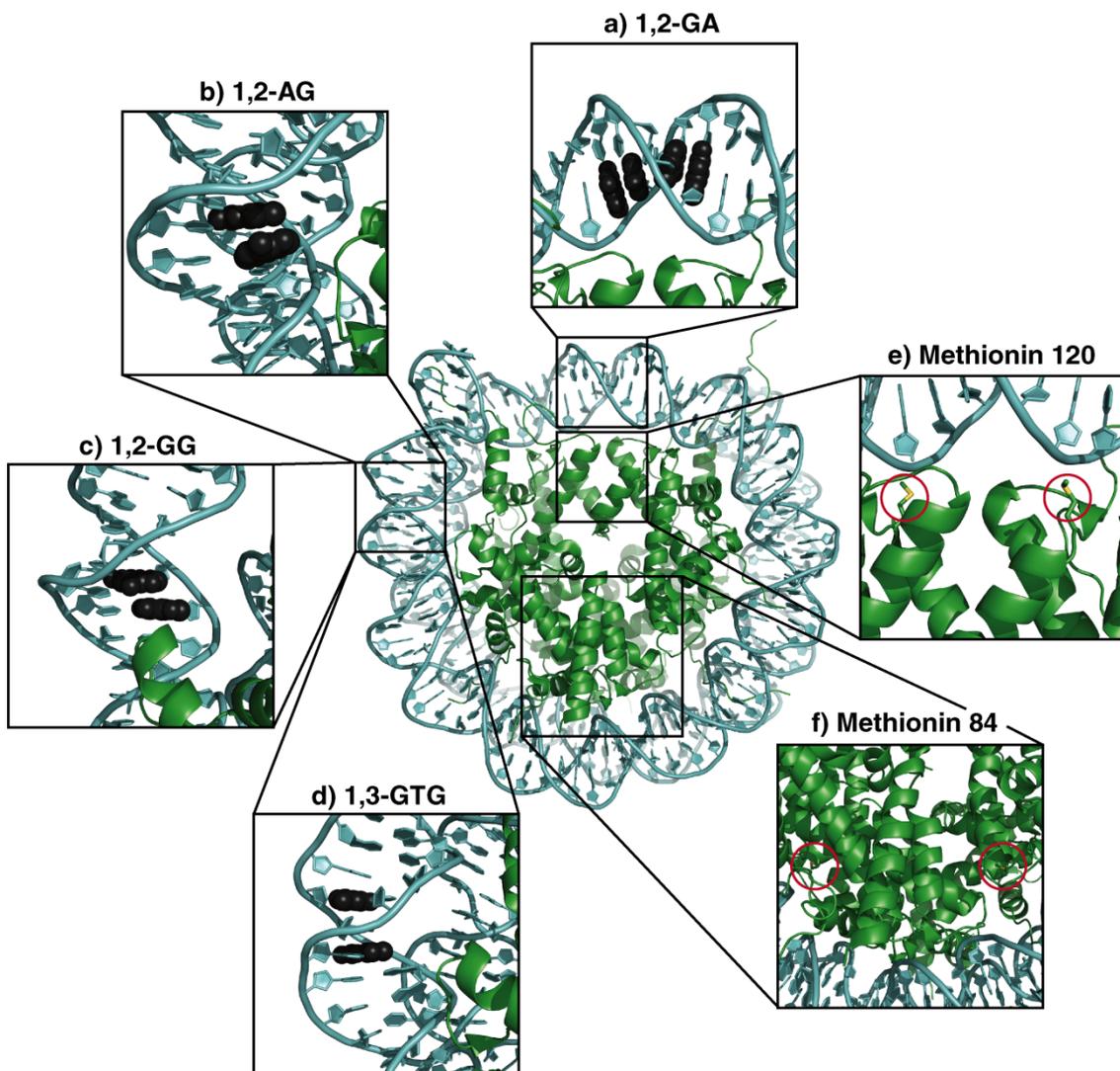


Abbildung 10. Schematische Darstellung der experimentellen Lokalisierung von Cisplatin-Addukten im Nukleosom (grün: Histon; cyan: DNA; schwarz: Basen mit Cisplatin-Addukten; rot: Protein-Addukte).

Obwohl die in diesen Versuchen verwendete palindromische DNA eine gleichmäßige Verteilung von GG und AG Stellen besaß, erfolgte erstaunlicherweise keine statistische Verteilung der Platin-Addukte. Bevorzugte Stellen für die Platinkoordination waren das Partikelzentrum sowie die Methionine 84 und 120 des Histons. Die Koordination der DNA an das Histon-Oktamer beeinflusst somit nachhaltig die Platinierung. Zudem könnten die Cisplatin-Addukte an den spezifischen Histon-Methioninen als Platin-Reservoir dienen und den Addukt-Transfer an die DNA beeinflussen.

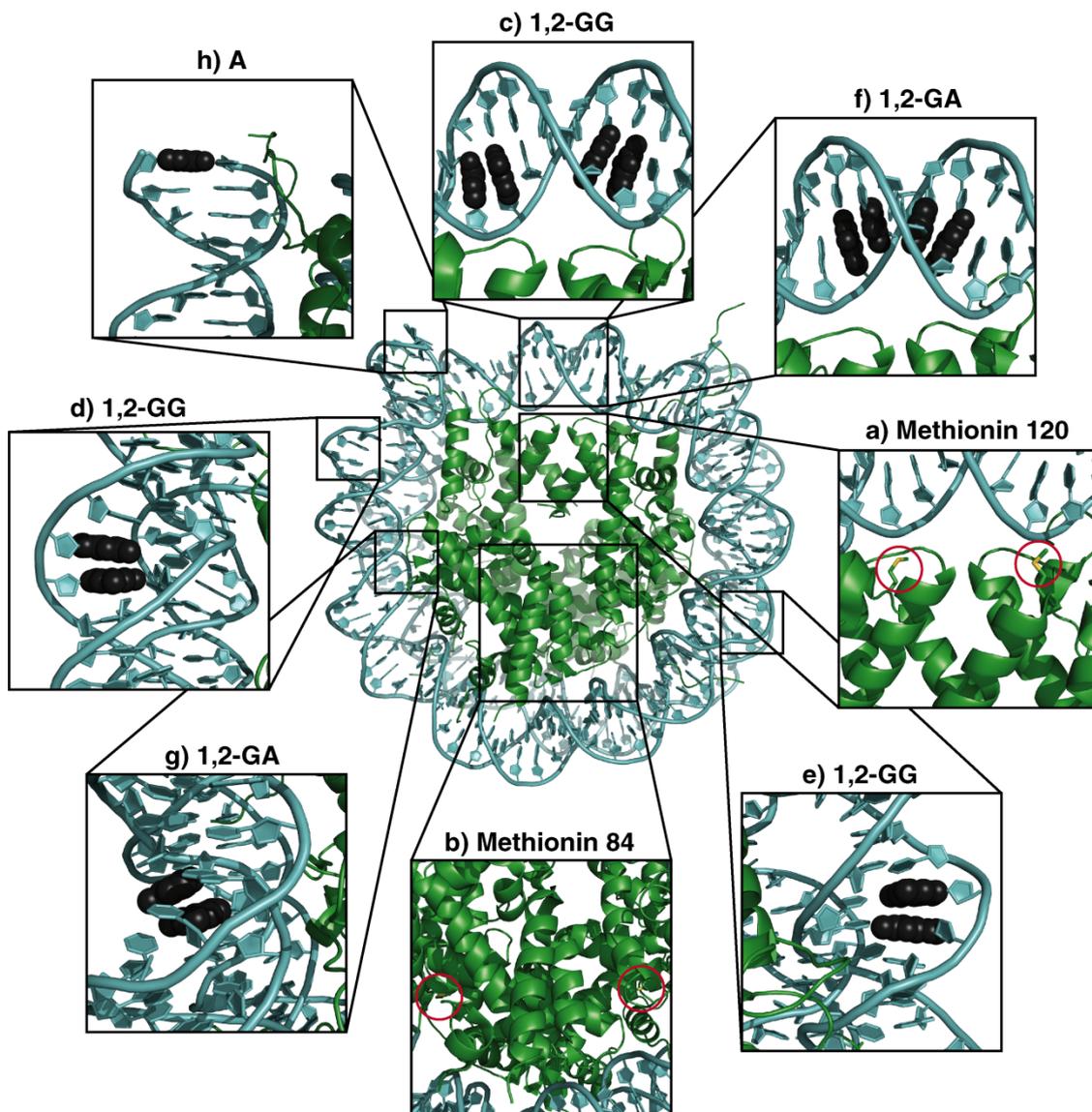


Abbildung 11. Schematische Darstellung der experimentellen Lokalisierung von Oxaliplatin-Addukten im Nukleosom (grün: Histon; blau: DNA; schwarz: Basen mit Oxaliplatin-Addukten; rot: Protein-Addukte).

Zelluläre Aufnahme und Ausscheidung von Cisplatin

Der Mechanismus der zellulären Aufnahme und Ausscheidung von Cisplatin ist noch nicht

vollkommen verstanden. Frühe Studien legten nahe, dass Cisplatin hauptsächlich durch passive Diffusion in die Zellen eindringt.^[64-66] Inzwischen geht man auch von einem aktiven Transport des Therapeutikums in die Zelle aus. Dabei ist der direkte Zusammenhang zwischen der Regulation von Kupferkonzentration und CisplatinKonzentration von Bedeutung. Es wurde festgestellt, dass Kupfer und Cisplatin die Aufnahme des jeweils anderen herabsetzen und den Abbau und die Delokalisierung des Kupfertransportproteins Ctr1 beeinflussen.^[67] Ebenso erhöht die Expression von ATP7B (Morbus Wilson assoziiertes, kupfertransportierendes Protein) in menschlichen Krebszellen die Sensitivität gegenüber Cisplatin durch eine erhöhte Ausscheidung des Therapeutikums.^[68] Es häufen sich somit Hinweise für einen direkten Zusammenhang zwischen Cisplatin-Resistenz und den humanen Kupfer-Homeostase Proteinen Atox1 und ATP7A bzw. ATP7B.^[69-72]

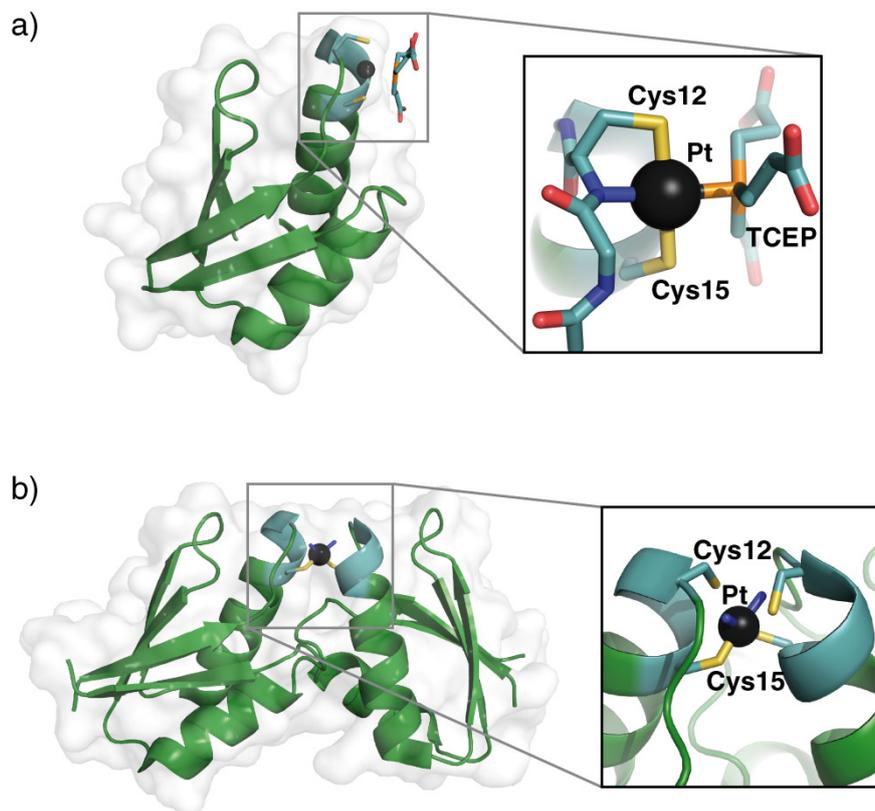


Abbildung 12. a) Kristallstruktur von Cisplatin gebunden an ein Atox1-Monomer (3IWL). Das CXXC-Motiv ist in Cyan dargestellt. Das Cisplatin koordiniert unter Verlust aller seiner Liganden an das Protein. Der externe Ligand TCEP verhindert die Dimer-Bildung. b) Kristallstruktur von Cisplatin gebunden an ein Atox1-Dimer (3IWX). Hier koordinieren nur die beiden Cysteine 15 beider Atox1-Moleküle an das Platin-Atom. Die beiden Ammoniak-Liganden sind nach wie vor vorhanden. In Klammern sind die PDB-Zugangscodes angegeben.

Rosenzweig und Mitarbeiter kristallisierten Atox1 in Komplex mit Cisplatin.^[73] Die Kristallstrukturen zeigen, dass Cisplatin spezifisch an die Kupfer-bindende Stelle von Atox1 bindet (Abbildung 12). Das stöchiometrische Cisplatin-Atox1 Addukt enthält ein Monomer

des Proteins (Abbildung 12a). Cystein 12 und Cystein 15 des CXXC-Motives koordinieren das Platin-Atom. Die Koordinationsgeometrie ist quadratisch-planar und die beiden Cysteine sind *trans* zueinander angeordnet. Als weitere Liganden fungieren der Amid-Sauerstoff von Cystein 12 und ein externer Ligand (TCEP). Der externe Ligand stammt aus den Kristallisationsbedingungen und verhindert eine Dimer-Bildung. Erstaunlicherweise sind in der Kristallstruktur, die das Monomer enthält, beide ursprünglichen Liganden des Cisplatin (Chlorid und Ammoniak) ausgetauscht.

In der Kristallstruktur des dimeren Adduktes CP(Atox1)₂ verbindet das Platin-Atom zwei Proteine (Abbildung 12b). Die beiden Cysteine 15 der Atox1 Moleküle koordinieren das Platin-Atom. Anscheinend sind die Cysteine 12 von Atox1 zu weit für eine Koordination entfernt. Dadurch bleiben die Ammoniak-Liganden am Platin.

Beide Strukturen zeigen, dass das Cisplatin an das CXXC-Motiv von Atox1 bindet. In der Monomer-Struktur verliert aber das Cisplatin all seine Liganden. Ein externer Ligand verhindert eine Interaktion mit einem weiteren Protein. In der Dimer-Struktur sind die Chlorid-Liganden des Cisplatin durch die Sulfide von Cystein 15 ersetzt. Diese Struktur könnte den Autoren nach eine Zwischenstufe auf dem Weg zu einem vierfach Schwefel-koordinierten Platin-Atom sein (man vergleiche mit der Monomer-Struktur).

1.5. Proteine gebunden an Cisplatin-modifizierte DNA

Die nachfolgenden Unterpunkte geben einen Überblick über die strukturelle Aufklärung der Wechselwirkung von Proteinen mit Cisplatin-geschädigter DNA.

1.5.1. Erkennung von Cisplatin-Schäden durch HMG box Proteine

Die Koordination von Cisplatin an DNA (siehe Kapitel 1.3) führt zu einer starken Verzerrung der DNA, welche von einer Reihe verschiedener Proteine erkannt wird. Die molekulare Erkennung erfolgt unter anderem durch High-mobility-group (HMG) box Proteine, DNA Reparaturproteine oder Transkriptionsfaktoren.^[12, 22, 34, 74]

Die Interaktion von HMG box Proteinen (vor allem HMGB1) mit Cisplatin geschädigter DNA ist seit Langem bekannt.^[75-76] Proteine mit einer HMG-Domäne biegen die DNA nach Bindung oder binden an bereits deformierte DNA Strukturen. Diese DNA-bindende Domäne wird in zwei Klassen unterteilt: Die sequenzspezifische Domäne, die auch in Transkriptionsfaktoren gefunden wird und die nicht-sequenzspezifische Domäne, die in

chromosomalen Proteinen gefunden wird. Die letzte Klasse wird wiederum in A und B Domäne unterteilt.^[77]

Ohndorf et al. erforschten die Erkennung von Cisplatin-geschädigter DNA durch diese Proteine mittels Röntgenstrukturanalyse (Abbildung 13a).^[78] Dazu kristallisierten sie die Domäne A von HMG1 aus Ratte mit einem DNA-Duplex (16 Basenpaare), der ein Cisplatin 1,2-d(GpG) Addukt enthielt. Die HMG Domäne bindet mit der konkaven Seite (L-Form des Proteins)^[79-84] an die kleine Furche der DNA. Normalerweise verursacht die Bindung von HMG1A an die DNA einen Knick in der DNA. Die Bindungsstelle des Proteins sitzt direkt am Knick der DNA. Da die DNA aber schon durch das Cisplatin gekrümmt ist, befinden sich die Bindungsstellen des Proteins – um 2 Basenpaare verschoben – in Richtung 3' des Cisplatin-Knicks. Das auffälligste Merkmal der Struktur ist das Phenylalanin 37. Es interkaliert zwischen die beiden Guanine des 1,2-d(GpG) Cisplatin-Schadens. Das Phenylalanin 37 ist dabei essenziell für die Bindung. Eine Mutante (Phe→Ala) zeigte keine Bindung. Hydroxyl-Radikal-*Footprinting* bestätigt den Bindungsmodus der Kristallstruktur: Es findet keine Spaltung der DNA an den Basen statt, an denen das Protein gebunden ist.

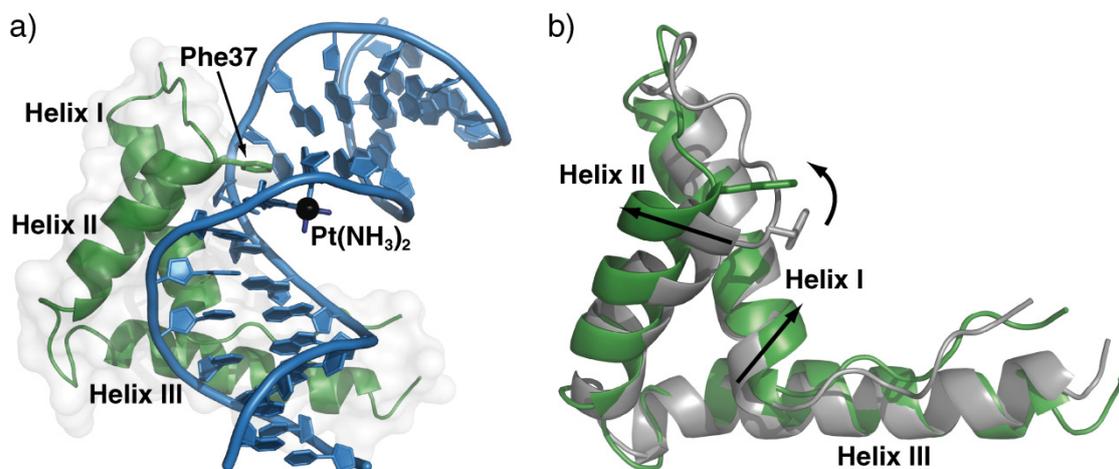


Abbildung 13. a) Struktur der nicht-sequenzspezifischen Domäne A von HMG1 (grün) in Komplex mit Cisplatin-geschädigter DNA (blau) (1CKT).^[78] b) Überlagerung der Röntgenstruktur des gebundenen Proteins (grün) mit der NMR-Struktur des ungebundenen Proteins (1AAB).^[82] Die Pfeile verdeutlichen die Bewegung des Proteins nach Bindung an Cisplatin geschädigte DNA. In Klammern sind die PDB-Zugangscodes angegeben.

Die DNA wird durch die drei Helices des Proteins gebunden. Helix I interagiert mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat des ungeschädigten Stranges, während Helix II mit dem Rückgrat des geschädigten Stranges interagiert. Helix III wird vor allem von Lösungsmittel umgeben. Der Vergleich der NMR-Struktur des ungebundenen Proteins mit der beschriebenen Röntgenstruktur (Abbildung 13b) zeigt eine signifikante Konformationsänderung des Proteins

nach Bindung an die DNA. Damit das Phenylalanin 37 zwischen die beiden Guanine des Cisplatin-Schadens interkalieren kann, bewegen sich der C-Terminus von Helix I, sowie der N-Terminus von Helix II und der verbindende Loop.

Obwohl die Bindung von HMG Proteinen an Cisplatin-geschädigte DNA gut untersucht ist, wird die biochemische Bedeutung kontrovers diskutiert. *In vitro* Studien belegen, dass HMGB1 die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) von Cisplatin-Addukten inhibiert. Dies geschieht wahrscheinlich durch Bindung des Proteins an den Schaden und Abschirmen desselben vor den Reparaturproteinen.^[85-87] Des Weiteren wird die Konzentration an HMG Protein mit Cisplatin-Sensitivität in Verbindung gebracht. Brustkrebszellen mit einem erhöhten Spiegel an HMGB1 sind um den Faktor 2 sensitiver gegenüber Cisplatin.^[88] Eine zusätzliche Expression von HMGB2 erhöht die Sensitivität sogar um Faktor 3.^[89] Dagegen spricht ein oft erhöhter HMGB1 Level in Cisplatin-resistenten Zelllinien.^[90] In Mausembryofibroblasten konnten keine Unterschiede in der Cisplatin Sensitivität zwischen der Wildtyp-Zelllinie und der Hmgb1-Knockout-Zelllinie beobachtet werden.^[91] Eine *S. pombe* Mutante, die das HMG Box Protein Cmb1 nicht produzieren konnte, war sogar sensitiver gegenüber Cisplatin.^[92] Eine allgemeine Aussage über den Einfluss von HMG box Proteinen auf die Sensitivität oder sogar Resistenz gegen Cisplatin lässt sich somit aus den vorhandenen Daten schwer treffen.

1.5.2. Inhibierung von RNA Polymerase II durch Cisplatin-DNA Addukte

In einer relativ unbeachteten Publikation aus dem Jahre 1974 wird das erste Mal die Inhibierung der Transkription durch eine Platin-enthaltende Verbindung beschrieben.^[93] Die dabei verwendete Verbindung Ethylendiammindichloroplatin(II) inhibierte in *in vitro* Studien die Elongation durch die RNA Polymerase aus *E. coli*. Anfang der 90er Jahre wurden die Untersuchungen wieder aufgegriffen und intensiviert.^[94-96] Diese Studien verwendeten spezifische Cisplatin-Addukte und aufgereinigte RNA Polymerase II aus Weizenkeimlingen und *E. coli* RNA Polymerasen (T7 und SP6). Die Polymerasen werden fast komplett inhibiert, wenn sich 1,2-d(GpG) und 1,2-d(ApG)-Addukte im Templatstrang befinden. Eine teilweise Blockade findet statt, wenn sich die Cisplatin-Schäden im Nicht-Templat-Strang befinden. Eine starke Inhibierung der Transkription wird im Falle des 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Schadens beobachtet, sogar wenn sich der Schaden im Nicht-Templat-Strang befindet.^[97]

Eukaryotische RNA Polymerase II (RNAP II), die die meisten Gene transkribiert, ist mit ~300000 Kopien pro Zelle ein häufig vorkommendes Protein.^[98] Davon ist ungefähr ein

Viertel ständig mit der Transkription beschäftigt.^[99-100] Sowohl 1,2-d(GpG) als auch 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Addukte hindern die RNAP II an der Transkription^[12, 101] und führen zu einem stabilen Komplex mit dem Addukt.^[102] Der so entstandene Cisplatin-enthaltenden RNAP II Elongations-Komplex wird durch den Elongationsfaktor TFIIIS gebunden, der ein Zurücksetzen der Polymerase bewirkt und anschließende 3'RNA Spaltung einleitet.^[103-104] Transkriptionsgekoppelte Nukleotid-Exzisions-Reparatur kann nun in Gegenwart der Polymerase erfolgen.^[105-106] Nach erfolgter Reparatur verlängert RNAP II weiter. Ein geringer Anteil von Polymerasen kann sogar über den Schaden hinweglesen.^[97] Eine durch ein Cisplatin Addukt gestoppte RNAP II kann nicht nur als Schadenserkennungseinheit fungieren, um transkriptionsgekoppelte Reparatur (TCR) auszulösen,^[107] sondern kann auch den programmierten Zelltod einleiten.^[108]

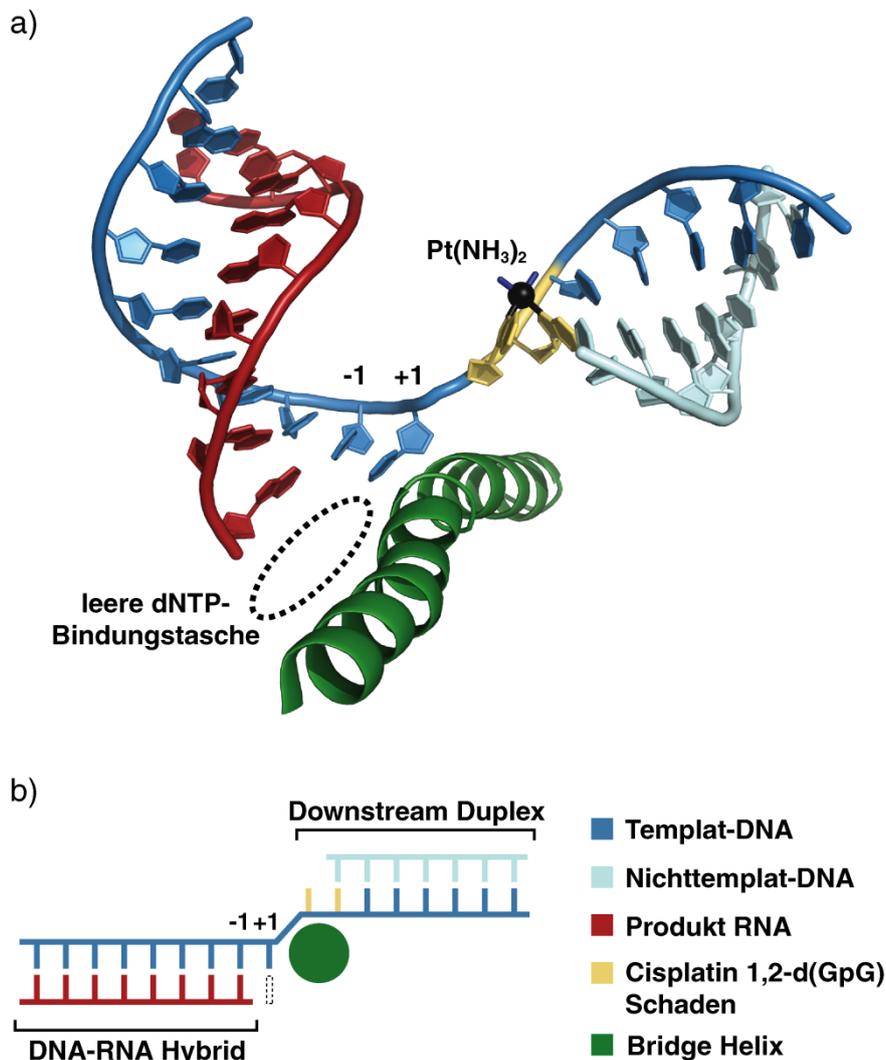


Abbildung 14. a) Ausschnitt aus der Kristallstruktur der RNA Polymerase II aus Hefe in Komplex mit Cisplatin geschädigter DNA (PDB-Zugangscode: 2R7Z). b) Schematische Darstellung der Transkriptionsblockade an einem 1,2-d(GpG) Cisplatin Schaden.

Den zuvor beschriebenen Daten zu Folge scheint ein Cisplatin-Addukt eine physikalische Barriere für die Verlängerung während der Transkription darzustellen. Die Kristallstruktur von RNAP II in Komplex mit Cisplatin-geschädigter DNA beschreibt, wie der DNA-Schaden eine Verlängerung durch das Enzym verhindert.^[109] In dieser Struktur liegt das Addukt *Downstream* zur aktiven Tasche der RNAP II (Abbildung 14) in der +2/+3 Position des Templat-Stranges. An der +1 Position des Templates erfolgt die Ribonukleotid-Addition. Die Forscher versuchten das Addukt durch entsprechende Wahl der *Primer* in die aktive Tasche der Polymerase zu platzieren. Das Addukt konnte aber nicht in der aktiven Tasche der Polymerase stabilisiert werden. Beobachtet wurde ein Zurücksetzen der Polymerase, so dass der Schaden wieder *Downstream* lag. Daraus folgt, dass das Addukt nicht in den Positionen +1/+2 und -1/+1 stabilisiert werden kann. Für die Positionierung einer Templat-Base in der aktiven Tasche muss diese von Position +2 in Position +1 um 90° gedreht werden,^[110-111] da die *Bridge Helix* (Abbildung 14) überwunden werden muss. Da es sich bei einem 1,2-d(GpG) Cisplatin Addukt aber um eine Quervernetzung von zwei Basen handelt, ist diese Rotation nicht möglich. Eine Positionierung der Templat-Base in der aktiven Tasche erfolgt nicht. Des Weiteren zeigten *Cramer und Mitarbeiter*, dass die RNAP II der „A-Regel“^[112-113] für eine Nicht-Templat gesteuerte Addition von Nukleotiden folgt: biochemische Daten zeigen den bevorzugten Fehleinbau von AMP gegenüber dem 3'dG des Cisplatin-Schadens. Diese Beobachtung unterstützt die Behauptung, dass der Cisplatin-Schaden nicht in der aktiven Tasche des Enzyms platziert werden kann. Die Forscher überprüften die Hypothese, ob diese A-G Fehlpaarung des 3'dGs die Polymerase blockiert. Sie beobachteten den korrekten Einbau von Cytosin gegenüber dem 5'dG des Schadens. Somit blockiert die Misinkorporation nicht die RNAP II. Wenn der RNAP II ein Basenpaar gegenüber dem 3'dG des Schadens angeboten wird, ist sogar ein Überlesen des Schadens möglich. Sind beide Basen des Schadens gepaart, ist sogar bei Fehlpaarungen eine artifizielle Translesion-Synthese möglich. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Blockade der RNAP II vor allem durch die erschwerte Translokation und Positionierung des Cisplatin-Schadens in der aktiven Tasche hervorgerufen wird.

1.5.3. Translesion-Synthese von Cisplatin 1,2-d(GpG) Addukten durch DNA Polymerase η

Schon Anfang der 70er Jahre wurde die Inhibierung der DNA-Synthese durch Cisplatin entdeckt.^[114] Weitere Studien zeigten, dass eine Vielzahl von DNA Polymerasen an ihrer

Tätigkeit durch diese Addukte gehindert werden,^[115-116] darunter die replikativen Polymerasen α , δ und ϵ .^[117] Zellen besitzen allerdings auch die Möglichkeit DNA durch Überlesen von verschiedenen DNA-Schäden zu synthetisieren. Dieser Prozess – Translesion-DNA-Synthese (TLS) genannt – benötigt spezialisierte DNA Polymerasen, die im Vergleich zu replikativen Polymerasen weniger stringent arbeiten und DNA-Schäden tolerieren.^[118] In Eukaryoten gehören Polymerasen, die TLS ausführen, der B, X und Y Familie der DNA-Polymerasen an.^[119-120] Die DNA Polymerasen β , μ und η überlesen *in vitro* Cisplatin-Addukte, wogegen DNA Polymerase ι , κ und λ unfähig sind über diese Schäden zu replizieren.^[121-124]

Translesion-DNA Synthese von Cisplatin-Addukten ist ein interessanter Aspekt in Hinsicht auf Zellen, die mit Cisplatin behandelt wurden. Verschiedenste Krebszellen exprimieren spezialisierte Polymerasen^[125] und steigern so die Toleranz gegenüber Cisplatin-DNA Schäden.^[126] TLS korreliert zudem mit der Sensitivität von Zellen gegenüber dem Therapeutikum.^[127] Cisplatin-resistente Zellen besitzen außerdem eine erhöhte TLS-Aktivität im Vergleich zu Cisplatin-sensitiven Zellen.^[128-131]

TLS erklärt ebenfalls die Mutagenität, die durch Cisplatin hervorgerufen wird, da TLS-Polymerasen sowohl fehlerbehaftete als auch fehlerfreie DNA-Synthese durchführen.^[120, 132]

Die Mutagenität von Cisplatin steht in engem Zusammenhang mit der Entstehung von Resistenzen in Zelllinien gegenüber dem Therapeutikum. Im Besonderen treten weniger schnell Resistenzen auf je geringer die TLS-Fähigkeit von Zellen ist. Zum Beispiel führt die Unterdrückung der humanen TLS-Polymerasen Rev1^[133] und Pol ζ ^[134-135] zur Erhöhung der Sensitivität von Zellen gegenüber Cisplatin und zu einem verringerten Auftreten von Cisplatin-Resistenzen.

DNA Polymerase η ist im Überlesen von Cisplatin-geschädigter DNA das effektivste Enzym.^[124, 131, 136-137] *In vitro* Primerverlängerungsstudien haben gezeigt, dass Pol η allein über den 1,2-d(GpG) Cisplatin Schaden hinweglesen kann. Pol η baut gegenüber dem 3'dG bevorzugt ein dC ein. Dieser Schritt wird fehlerfrei ausgeführt. Dagegen erfolgt eine bevorzugte Inkorporation von dA gegenüber dem 5'dG. Der zweite Verlängerungsschritt über den Dinukleotid Schaden durch Pol η ist somit mutagen.^[136, 138-139]

Wie Pol η über einen 1,2-d(GpG) Cisplatin Schaden repliziert, konnten *Carell und Mitarbeiter* mittels Röntgenstrukturanalyse aufklären.^[139] Dazu wurde eine verkürzte Version von Pol η aus *S. cerevisiae* zusammen mit Cisplatin-geschädigter DNA und einem dNTP in der aktiven Tasche kristallisiert. Die Wahl der Primerenden bestimmte dabei in welchem

Schritt die Replikation kristallisiert wurde (Abbildung 15).

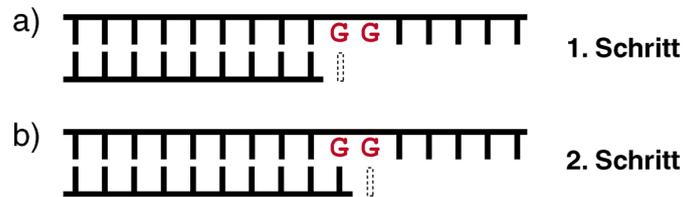


Abbildung 15. Mit Hilfe verschieden langer Primer konnte das Überlesen eines Cisplatin 1,2-d(GpG) Schadens kristallographisch aufgeklärt werden.

Die Röntgenstruktur des 3'dG Verlängerungsschrittes (1. Schritt) ist mit 3.1 Å aufgelöst. Sie zeigt den Aufbau der Polymerase mit der typischen „Rechten-Hand-Struktur“, die durch Finger, Daumen und Handfläche gekennzeichnet ist (Abbildung 16). Zudem erkannte man eine zusätzliche Polymerase-assoziierte Domäne (PAD).^[140] Diese vergrößert die potentielle DNA-Duplex bindende Oberfläche. Die beiden Guanine des 1,2-d(GpG) Cisplatin Schadens sind um $\sim 90^\circ$ zueinander verdreht.

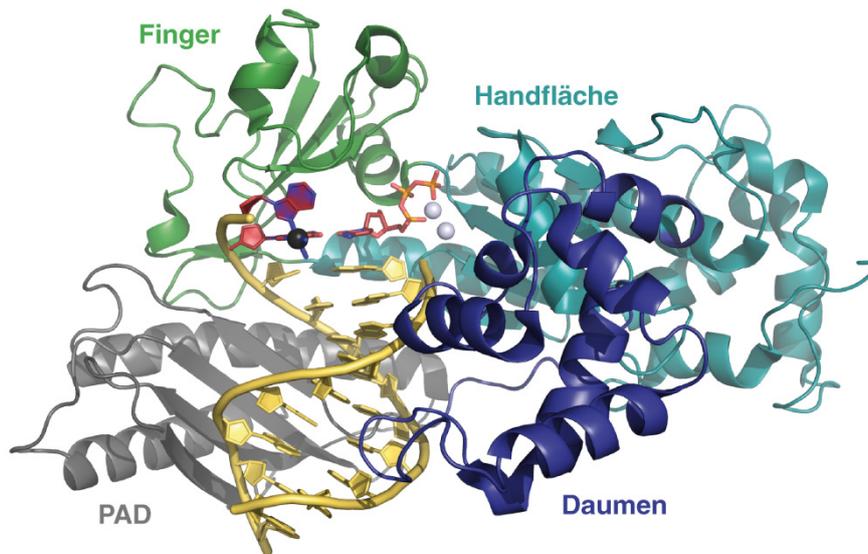


Abbildung 16. Struktur von DNA Polymerase η in Komplex mit Cisplatin geschädigter DNA und dCTP. Der Primer- und Templat-DNA Strang (gelb) und das Watson-Crick gepaarte dCTP sind im Stabmodell dargestellt. Die zwei Ca-Atome sind als graue Sphären dargestellt. Die Struktur zeigt den Aufbau der Polymerase ähnlich einer rechten Hand (Finger: grün; Handfläche: cyan; Daumen: blau). Die zusätzliche Polymerase-assoziierte Domäne (PAD) ist in grau dargestellt (PDB-Zugangscode: 2R8J).

Im Protein-DNA Komplex des 3'dG Verlängerungsschrittes ist die Pt-d(GpG) Quervernetzung nur teilweise in der aktiven Tasche des Enzyms platziert. Das 3'dG bildet dabei eine Watson-Crick Basenpaarung aus. Die perfekte Basenpaarung erklärt das effiziente Überlesen des 3'dG des Schadens (Abbildung 17a).

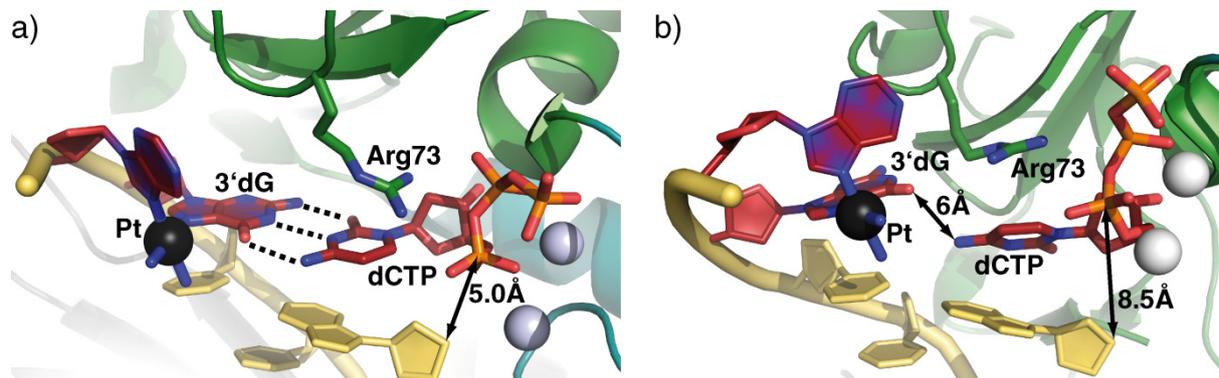


Abbildung 17. a) Detaillierte Ansicht der aktiven Tasche des 3'dG Verlängerungsschrittes. Arginin 73 orientiert das dCTP für eine optimale Basenpaarung mit dem 3'dG des Cisplatin 1,2-d(GpG) Schadens. Der nukleophile Angriff der 3'OH Gruppe des Primers am α -Phosphat des dCTP kann optimal erfolgen. b) Detaillierte Ansicht der aktiven Tasche der Vorstufe zum eigentlichen Verlängerungsschritt. Das dCTP wartet in der aktiven Tasche auf die Primerverlängerung. Erst die Rotation der DNA in die aktive Tasche verringert den Abstand der 3'OH Gruppe des Primers zum α -Phosphat des dCTP.

In der asymmetrischen Einheit des Kristalls befindet sich noch ein weiterer, konformell unterschiedlicher Komplex. Hier sitzt der Schaden außerhalb der aktiven Tasche. Die Autoren bezeichnen diesen Komplex als Vorstufe zum eigentlichen Verlängerungsschritt (Abbildung 17b). Man erkennt, dass der Abstand zwischen dem O6 des 3'dG und der NH₂(4)-Gruppe des hereinkommenden dCTP bei 6 Å liegt. Eine Rotation der DNA in die aktive Tasche des Enzyms führt zur Ausbildung der zuvor beschriebenen Watson-Crick Basenpaarung (Abbildung 18).

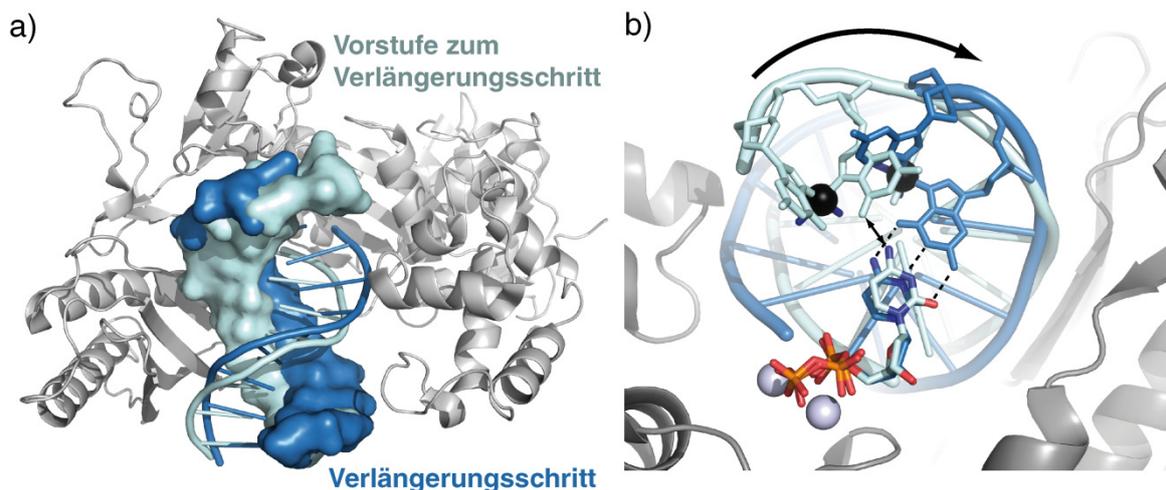


Abbildung 18. a) Die DNA rotiert von der Vorstufe zum Verlängerungsschritt (hellblau) in den ersten Verlängerungsschritt (blau). Das Protein des Vorverlängerungsschrittes wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen. b) Detaillierte Ansicht des Schadens in der Vorstufe zum Verlängerungsschritt (hellblau). Der Schaden im 3'dG Verlängerungsschritt ist in blauer Farbe darübergerlegt. Durch die Rotation der DNA wird das Watson-Crick Basenpaar ausgebildet. Dadurch ist die 3'OH Gruppe des Primers bereit für den nukleophilen Angriff am α -Phosphat des dNTP.

Dabei verringert sich der Abstand des dCTP zur Primer-OH Gruppe von 8.5 Å (Vorstufe des

Verlängerungsschrittes) auf 5.0 Å im ersten Verlängerungsschritt. Dies ermöglicht einen effizienten Nukleotidyltransfer. Das hereinkommende dCTP wartet dafür bereits in der aktiven Tasche und wird durch Arg73 in Position gehalten. Die Autoren konnten durch Mutation des Arg73 in ein Leucin feststellen, dass diese Aminosäure essentiell für die Translesion-Synthese von Pol η ist.

Der zweite Verlängerungsschritt (5'dG Verlängerung) konnte mit einer Auflösung von 3.3 Å bestimmt werden. Diese Struktur erklärt, warum der zweite Verlängerungsschritt langsamer und mutagen ist. Der 5'dG des Schadens befindet sich innerhalb der aktiven Tasche der Polymerase. Durch die Quervernetzung über das Platin-Atom an das 3'dG steht das 5'dG gezwungenermaßen senkrecht zum hereinkommenden dATP (Abbildung 19). Nur eine Wasserstoffbrücke kann zwischen der exozyklischen C(6)-NH₂-Aminogruppe des dATP und dem C(6)=O Carbonylsauerstoff des 5'dG ausgebildet werden. Der Abstand der Primer-OH-Gruppe ist dabei 7.5 Å vom dATP entfernt. Diese Distanz ist deutlich zu groß für einen effektiven Nukleotidyltransfer im Vergleich zu 5.0 Å des ersten Verlängerungsschrittes.

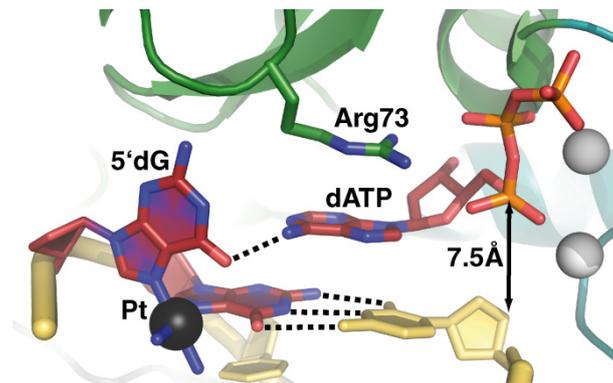


Abbildung 19. Detaillierte Ansicht der aktiven Tasche des 5'dG Verlängerungskomplexes (PDB-Zugangscode: 2R8K). Das Nukleotid (dATP) bildet eine Wasserstoffbrücke mit dem 5'-Desoxyguanin des Schadens aus. Arginin 73 hält das dATP für den nukleophilen Angriff bereit. Dieser erfolgt allerdings sehr ineffizient, da die 3'OH Gruppe des Primers 7.5 Å von dem α -Phosphat des dNTP entfernt ist.

Der beschriebene Mechanismus unterscheidet sich deutlich von dem Mechanismus der dNTP induzierten Passform, welcher in *high-fidelity* Polymerasen gefunden wird.^[141] Hier wird das korrekte dNTP von Pol η nicht durch seine Form selektiert, sondern durch die Ausbildung der entsprechenden Wasserstoffbrücken. Dies ermöglicht eine gewisse Toleranz und Akzeptanz von DNA, die quervernetzende Schäden enthält.

1.6. Der quantitative TLS Assay nach Livneh

Livneh und Mitarbeiter (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) entwickelten 2002 einen TLS Assay,^[142] der quantitative Aussagen über TLS-Prozesse ermöglicht. Dieser Assay wurde 2004 weiter entwickelt^[143] und in einer Vielzahl von DNA Replikationsstudien angewandt.

1.6.1. Der TLS-Assay

Der TLS-Assay dient dazu, die unterschiedliche Fähigkeit von DNA-Polymerasen bestimmte DNA-Schäden zu überlesen, zu untersuchen. Hierbei werden Zellen mit einem *gapped* Plasmid, das einen DNA-Schaden im einzelsträngigen Bereich des Plasmids enthält, transfiziert. Ein solches Konstrukt kann auf Grund des Fehlens einer homologen DNA Kopie nicht durch rekombinante Reparaturmechanismen repliziert werden. Da die DNA-Synthese in NER defizienten Zellen erfolgt, ist die einzige Möglichkeit zur Schließung der Lücke die Translesion-Synthese.

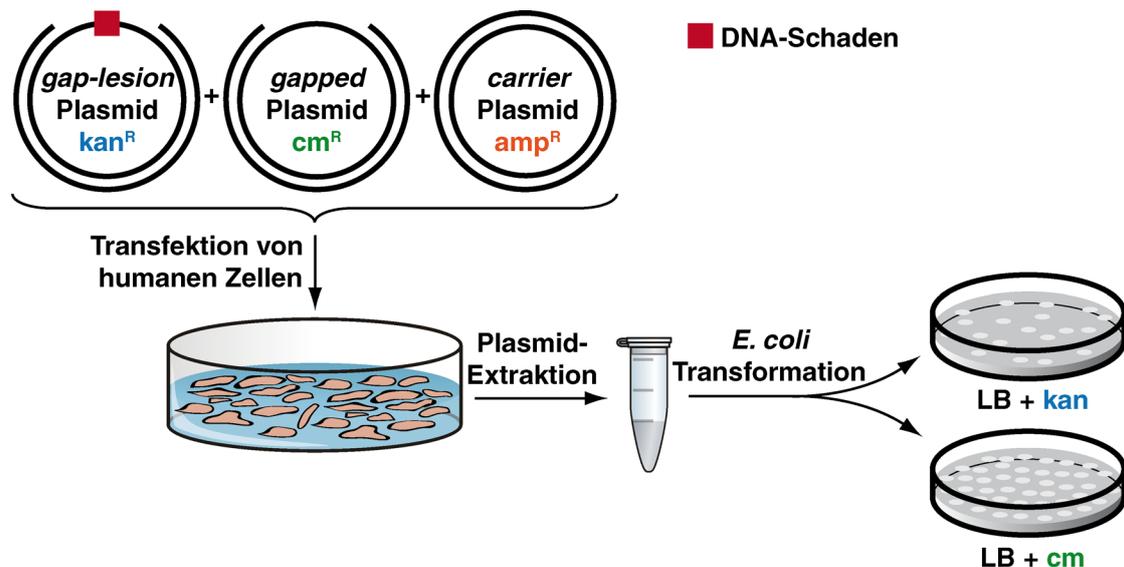


Abbildung 20. Kurzdarstellung des quantitativen TLS-Assays nach *Livneh und Mitarbeitern* (kan^R : Kanamycin-Resistenz; cm^R : chloramphenicol-Resistenz; amp^R : Ampicillin-Resistenz).

Zum Vergleich verschiedener Schäden werden kurze Oligonukleotide mit einem spezifischen Schaden generiert. Diese kurzen, geschädigten DNA-Segmente werden in ein längeres DNA-Segment ligiert und anschließend in Plasmide integriert.^[144-145] Der Assay benötigt drei verschiedene Plasmid-Konstrukte (Abbildung 20):

- Ein Plasmid mit einer ssDNA-Region, die den Schaden enthält (*gap-lesion* Plasmid). Dieses Plasmid enthält ein Kanamycin-Resistenzgen.

- Ein Plasmid mit einer ssDNA-Region ohne Schaden (*gapped* Plasmid). Dieses Plasmid enthält ein Chloramphenicol-Resistenzgen.
- Ein intaktes Plasmid mit einem Ampizillin-Resistenzgen (*carrier* Plasmid), um die Aufnahme der Plasmide zu erleichtern.

Diese Plasmid-Konstrukte werden in humane Zellen transfiziert. Nach Inkubation der Zellen – um Schadensüberlesung zu ermöglichen – werden die Plasmide alkalisch extrahiert. Dieser Schritt denaturiert nicht komplett gefüllte oder ligierte Plasmide. Die Plasmid-Mischung wird anschließend in einen Indikatorbakterienstamm (*E. coli recA*) transformiert und zu gleichen Teilen auf ein Kanamycin- bzw. Chloramphenicol-Selektivmedium ausplattiert. Dabei selektieren die LB-kan Platten Plasmide mit TLS-Vorgängen und die LB-cm Platten Plasmide ohne TLS-Vorgänge (Kontrollplasmide). Der Prozentsatz der TLS-Prozesse wird folgendermaßen berechnet:

$$\% \text{ der TLS-Prozesse} = \frac{\text{Anzahl der Kolonien auf den LB-kan Platten}}{\text{Anzahl der Kolonien auf den LB-cm Platten}} = \frac{\text{Anzahl der gap-lesion plasmid Transformanten}}{\text{Anzahl der gapped plasmid Transformanten}}$$

1.6.2. Bisher erzielte Ergebnisse

Mit Hilfe des beschriebenen Assays konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

1.6.2.1. Replikative Polymerasen sind für das Überlesen von abasischen Schäden verantwortlich^[142]

In Lungenkrebszellen (H1299) wurde ein erstaunlich hoher TLS-Anteil (92%) von abasischen Stellen nachgewiesen. Dabei wurde bevorzugt dAMP eingebaut (85%). In XP-V Zelllinien (Pol η defizient) konnte ein hoher TLS-Anteil nachgewiesen werden (89%). Zugabe von Aphidicolin führte dagegen zu einer Inhibierung der Replikation. Daraus lässt sich schließen, dass Pol η nicht essentiell am TLS-Prozess von abasischen Schäden beteiligt ist. Vielmehr sind hier replikative Polymerasen (wie α , δ oder ϵ) verantwortlich.

1.6.2.2. Pol κ ist hauptverantwortlich für das Überlesen von Benzo[a]pyren-Guanin-Addukten^[143]

In PolK^{+/+} Mausembryofibroblasten (MEFs) liegt die TLS-Effizienz bei 48%. Dagegen sank in PolK^{-/-} MEFs die TLS-Effizienz auf 16% und der TLS-Prozess ist hoch mutagen. Das heißt, dass Pol κ für mindestens 2/3 der TLS-Prozesse verantwortlich ist. Eine Beteiligung von Pol η konnte nicht nachgewiesen werden.

1.6.2.3. *p53 & p21 reduzieren die Effizienz der TLS, aber erhöhen die Genauigkeit*^[146]

In humanen Zelllinien konnte der Effekt des Tumorsuppressors p53 und des Zellzyklusinhibitors p21 auf die TLS beobachtet werden: TLS über abasische, Benzo[a]pyren-Guanin-Addukte oder Cisplatin 1,2-d(GpG) Addukte wurde bei aktiven p53 & p21 stark unterdrückt, und dadurch die Mutagenität um das bis zu 10fache vermindert. Ausfall der beiden Gene führt somit zu einer unkontrollierten TLS-Aktivität und einer starken Erhöhung von Misinkorporation.

1.6.2.4. *Pol η ist spezifisch für die TLS von CPD-Photoschäden*^[147]

Dieser Assay konnte ebenfalls die prominente Rolle von Pol η in der TLS von CPD-Photoschäden bestätigen. In XP-V-Zelllinien (Pol η defizient) ist die TLS-Aktivität 2.6–4.4fach niedriger und die Anzahl an Mutationen 6–17 fach erhöht. In der TLS des (6-4)-Photoproduktes spielt Pol η nur eine untergeordnete Rolle.

1.6.2.5. *Bestimmte Zwei-Polymerasen Kombinationen mit Pol ζ bestimmen fehlerhafte und fehlerfreie TLS über den selben DNA-Schaden*^[148]

Die Autoren fanden drei Kombinationen von TLS-Prozessen, welche von der Art des DNA-Schadens abhängen. Ein Thymin-Thymin Cyclobutan Pyrimidin Dimer (TT CPD) wurde unabhängig von Pol η alleinig von Pol η schnell und akkurat überlesen. Ein zweiter Mechanismus konnte bei der TLS über ein 1,2-d(GpG) Cisplatin Addukt definiert werden. Hier erfolgt der TLS Prozess durch Pol η und Pol ζ (Abbildung 21). Im Fall eines (+)-*trans*-Benzopyrendiolepid-N²-G Adduktes erfolgte TLS durch Pol κ und Pol ζ. Der Vorgang war dabei akkurat und mäßig schnell.

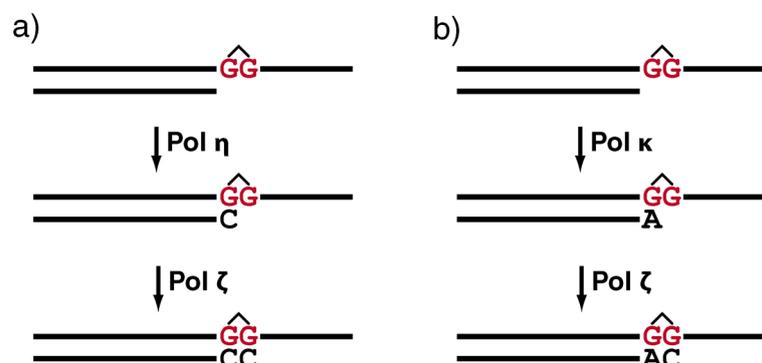


Abbildung 21. Zwei-Polymerasen Reaktion bei der a) fehlerfreien und b) fehlerhaften Replikation über einen 1,2-d(GpG) Cisplatin Schaden.

Ein dritter Mechanismus konnte bei der TLS von einer abasischen Stelle, einem

4-Hydroxyequilenin-C Addukt und einem (6-4) Thymin-Thymin Photoprodukt beobachtet werden. Dieser langsame und äußerst mutagene Vorgang war stark abhängig von $\text{Pol } \delta$ und anderen Polymerasen, die noch nicht identifiziert werden konnten. Diese Ergebnisse beweisen, dass mehrere spezialisierte Polymerasen am TLS-Prozess in humanen Zellen beteiligt sind (Multi-Polymerasen Modell).

1.6.2.6. Pol ζ und Pol κ schützen XP-V-Zellen vor UV-Zytotoxizität^[149]

Humane Zellen tolerieren UV-induzierte CPD-Schäden durch fehlerfreie TLS. Zellen von XP-V Patienten sind geringfügig UV-sensitiver, aber zeigen eine dramatische UV-Hypermotabilität,^[150] welche das 1000fach erhöhte Hautkrebsrisiko von XP-V Patienten erklärt. Da Zellen von XP-V Patienten Pol η nicht exprimieren, wird der TLS-Prozess durch Pol ζ und Pol κ übernommen. Diese Polymerasen führen einen hoch mutagenen Replikationsprozess durch, welcher das stark erhöhte Krebsrisiko der Patienten erklärt.

2. Aufgabenstellung

Ein gemeinsamer Mechanismus vieler Krebsmedikamente ist die Blockade der Replikation in den sich teilenden Tumorzellen. Im Jahr 1965 wurde während des Studiums der Wirkung von elektrischem Strom auf *Escherichia coli* der Wirkstoff Cisplatin zufällig entdeckt. Bis heute gehören Cisplatin und seine Analoga zu den am häufigsten verwendeten Krebsmedikamenten. Ihre Zytotoxizität entsteht durch die Schädigung von DNA und der daraus folgenden, gestörten Replikation. DNA-Reparatur-Enzyme wirken diesem Mechanismus entgegen. Während DNA-Reparatur und Translesion-Synthese (TLS) für einen gesunden Organismus unverzichtbar sind, schwächen diese Prozesse die Wirkung von Krebsmedikamenten während einer Antitumor-Therapie.

DNA Polymerase η ist ein wichtiger Akteur in der TLS und ermöglicht die Toleranz von Cisplatin DNA-Schäden während der Replikation. So ist die Translesion-Synthese von Cisplatin DNA-Addukten durch Pol η zum Beispiel ein wichtiger Faktor in der Entwicklung von Resistenzen gegenüber bestimmten Tumoren, die mit Cisplatin behandelt wurden.

Für das Hauptaddukt von Cisplatin, den 1,2-d(GpG) Schaden, wurde die Beteiligung von Pol η mittels Zellstudien bereits nachgewiesen. Ist Pol η aber auch am TLS-Prozess von 1,3-d(GpNpG) Trinukleotid-Schäden beteiligt? Dazu sollte Cisplatin-geschädigte DNA hergestellt werden, die einen spezifischen 1,3-d(GpTpG) Schaden enthält. Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe *Zvi Livneh* sollte in einem TLS-Assay die Rolle von Pol η am Überlesen des Schadens festgestellt werden. Des Weiteren sollten *in vitro* Primerverlängerungsstudien mittels Pol η aus *S. cerevisiae* durchgeführt werden. Daraus sollten Aussagen über den Elogationsprozess und die Mutagenität des Schadens erlangt werden.

Eine weitere Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Kristallisation von Pol η in Komplex mit der Cisplatin-geschädigten DNA und einem reaktiven Triphosphat in der aktiven Tasche. Durch eine solche Struktur würde man wichtige Informationen über den TLS-Prozess und somit die Entwicklung von Resistenzen erhalten, die mit dem Überlesen von DNA-Schäden in Verbindung stehen.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Aufreinigung und Charakterisierung von Cisplatin-geschädigter DNA

In den nachfolgenden Kapiteln wird die Herstellung und Charakterisierung von Cisplatin-geschädigter DNA beschrieben. Dabei galt das Augenmerk den zwei am häufigsten vorkommenden Schäden, dem 1,2-d(GpG) und dem 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Schaden (siehe Kapitel 1.3.1).

3.1.1. Reaktion von Cisplatin mit Oligonukleotiden

Die Darstellung Cisplatin-geschädigter DNA geschieht nicht direkt mit Cisplatin, sondern mit der Diaqua-Spezies von Cisplatin. Dazu wurde *cis*-Diammindichloroplatin(II) (Cisplatin, [*cis*-Pt(NH₃)₂Cl₂]) in die Spezies *cis*-Diammindiaquaplatin(II) [*cis*-Pt(NH₃)₂(OH₂)₂]²⁺ mit Hilfe von AgNO₃ überführt (Abbildung 22). Diese Aktivierung dauerte 14 Stunden. Wichtig war dabei das Einhalten der Reaktionstemperatur von 18 °C, da die entstehende Aquaspezies bei höheren Temperaturen zerfällt. Anschließend wurde der entstandene weiße Silberchlorid-Niederschlag mittels Zentrifugation entfernt.

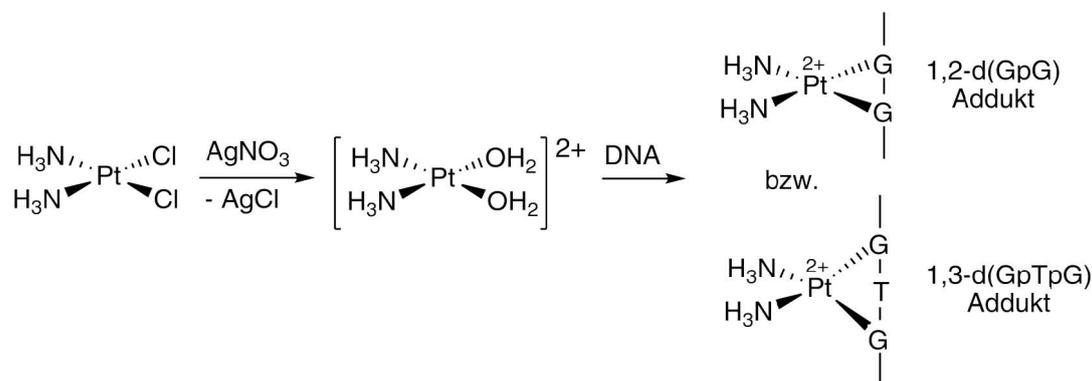


Abbildung 22. Umsetzung von DNA mittels aktiviertem Cisplatin.

Bei der experimentellen Durchführung zeigte sich, dass das Ergebnis der Platinierungsreaktion von der quantitativen Abtrennung des Silberchloridniederschlages abhing. Eine effiziente Abtrennung gelang bei einer Serie von zwei Zentrifugationsschritten (20 min, 13400 rpm) und einer Abnahme von ca. 9/10 des Überstandes nach dem ersten Zentrifugationsschritt. Nach Abtrennung des Silberchloridniederschlages wurde das aktivierte Cisplatin mit dem gewünschten DNA-Strang umgesetzt. Für die Platinierung wurden Reaktionsansätze im 1 mL-Maßstab gewählt mit je 100 nmol DNA und 0.1 M

3. Ergebnisse und Diskussion

Natriumperchlorat als Lösungsmittel. Bei größeren DNA-Mengen wurde zum einen die präparative Anionenaustauschsäule überladen und somit die Auftrennung verschlechtert, zum anderen wurden bei konzentrierteren Lösungen mehr Nebenprodukte erhalten. Bei der Platinierungsreaktion wurden 3 Äquivalente Platinreagenz $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{OH}_2)_2](\text{NO}_3)_2$ eingesetzt. Ein höherer Anteil an aktiviertem Cisplatin erhöhte den Anteil an Nebenprodukten deutlich. Ein Überschuss ist jedoch essentiell, da die Aktivierung nicht quantitativ verläuft und die Aqua-Spezies instabil ist.

Empirisch lassen sich folgende Regeln für die Gestaltung eines Oligonukleotides für eine optimale Platinierung aufstellen:

- Die zu platinierenden Basen (in diesen Fällen GG und GTG) sollten von Basen umgeben sein, die nur eine geringe Platinierung eingehen. Im besten Falle sind dies Thymidin und Cytosin.
- Je kürzer das Oligonukleotid, desto leichter ist die anschließende Auftrennung durch HPL-Chromatographie.
- Vorhandene Adenosine stören die effektive Platinierung des Guanosins. Je weniger Adenosine in der Sequenz enthalten sind, desto leichter ist die anschließende Auftrennung durch HPL-Chromatographie.
- GG enthaltende Sequenzen lassen sich leichter auftrennen als GTG enthaltende Sequenzen.

Eine Auswahl an möglichen DNA-Sequenzen für eine optimale Umsetzung mit Cisplatin zeigt Tabelle 3.

Name	Sequenz (5' → 3')	Basenanzahl
DNA_1	TCTAGGCCTTCT	12
DNA_2	TCTAGTGCCTTCT	13
DNA_3	TCTCTGGCTCATCCAC	16
DNA_4	CTCTGTGCTCATCCAC	16
DNA_5	AACTCTCTCTCTGGCTCTCTCCTCTT	26
DNA_6	AACTCTCTCTCTGTGCTCTCTCTCTT	26

Tabelle 3. Auswahl an DNA-Sequenzen für eine Umsetzung mit Cisplatin.

Die nachfolgenden Kapitel 3.1.2 und 3.1.3 beschreiben die Darstellung und Charakterisierung von 1,2-d(GpG) und 1,3-d(GpTpG) Cisplatin geschädigter DNA anhand der Beispielsequenzen von DNA_3 und DNA_4 (Tabelle 3).

3.1.2. Isolierung und Charakterisierung von 1,2-d(GpG) Cisplatin geschädigter DNA

Die Umsetzung von aktiviertem Cisplatin mit einem Oligonukleotid, das ein 1,2-(GpG) Motiv trägt, wird exemplarisch an Oligonukleotid **DNA_3** diskutiert. Abbildung 23a zeigt das HPL-Chromatogramm der Umsetzung. Die Ausgangssubstanz (rot) ist nach 4 Stunden verschwunden und ein neuer Hauptpeak erscheint bei 30.9 Minuten. Nach präparativer Auftrennung wurde die Reinheit des isolierten Peaks mittels Kapillarelektrophorese bestimmt. Abbildung 23b zeigt, dass das Oligonukleotid mit einer Reinheit größer 98% isoliert wurde.

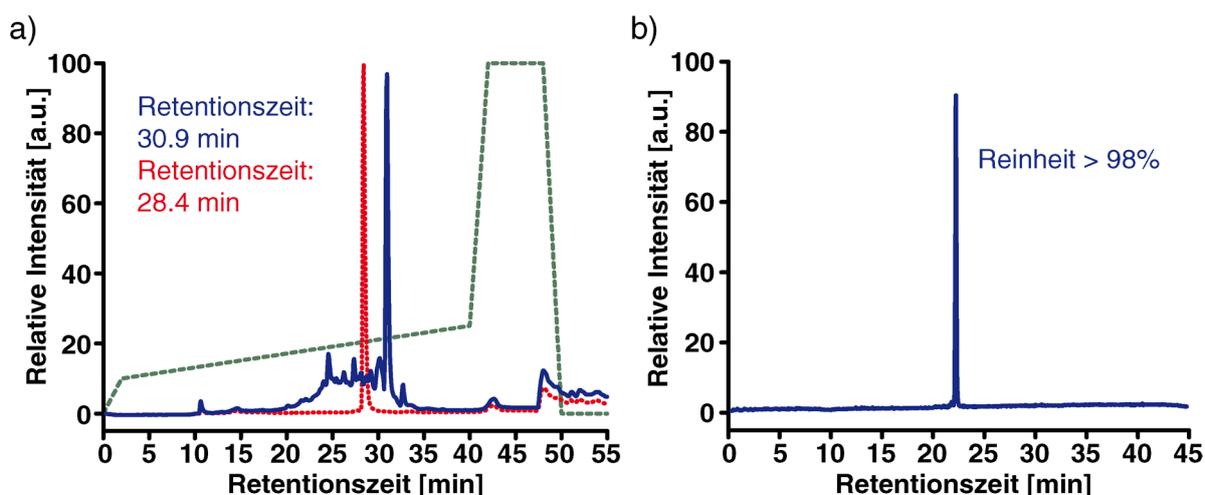


Abbildung 23. a) Umkehrphasen HPL-Chromatogramm der Platinierung von **DNA_3** (blau). Das rote gepunktete Signal zeigt das Ausgangsprodukt **DNA_3**. Der verwendete Gradient ist in grüner Farbe dargestellt. b) Kapillargelelektrophorese zeigt die Reinheit des Produktes.

Die Identität des platinieren Stranges wurde mittels MALDI-ToF massenspektrometrisch bestätigt (Abbildung 24).

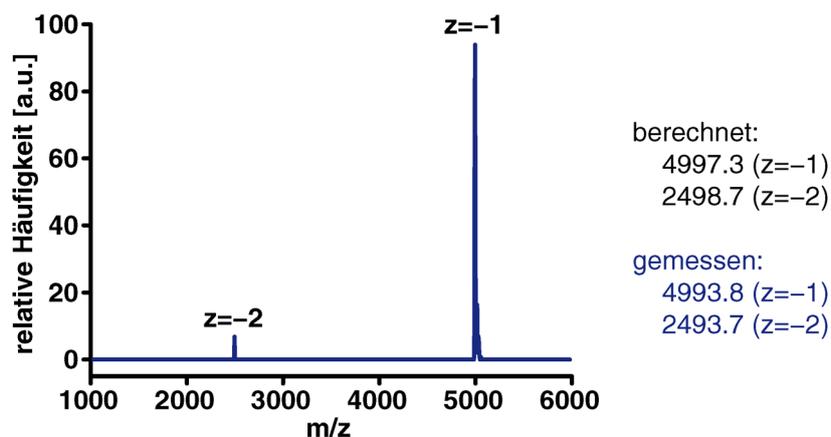


Abbildung 24. MALDI-ToF Spektrum der platinieren **DNA_3**.

Eine hochauflösende Masse wurde mittels ESI erhalten. Dabei muss bei der Berechnung der Masse die zweifach positive Ladung des Platin-Atoms berücksichtigt werden (Abbildung 25).

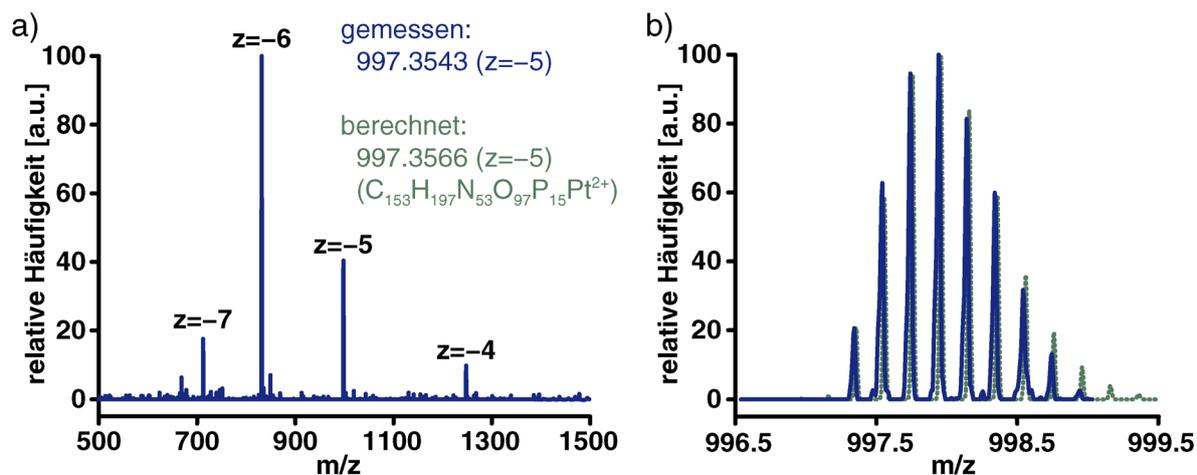


Abbildung 25. a) ESI-MS Spektrum des platinieren DNA-Strangs **DNA_3** im Bereich von 500 bis 1500 Da mit den geladenen Strängen $z=-7$, $z=-6$, $z=-5$ und $z=-4$. b) Isotopenverteilung der platinieren DNA mit Ladung $z=-5$ (blau). In grüner Farbe ist das berechnete Spektrum für $C_{153}H_{197}N_{53}O_{97}P_{15}Pt^{2+}$ abgebildet.

Um die Bildung von monofunktionellen Addukten oder AG-Addukten (man vergleiche die Sequenz von **DNA_1**) auszuschließen, wurde der aufgereinigte platinieren DNA Strang enzymatisch verdaut. Für 1,2-d(GpG)-Schäden hat sich ein modifiziertes Protokoll nach *Pillaire et al.* als geeignet erwiesen.^[151] Hierbei wurde 1 nmol DNA mit Nuclease P1 und anschließend mit *Antarctic Phosphatase* für jeweils 1 h verdaut. Neben den kanonischen Basen dC, dT und dA erschien ein weiterer Peak, der massenspektrometrisch dem Cisplatin-d(GpG) Addukt zugeordnet wurde (Abbildung 26).

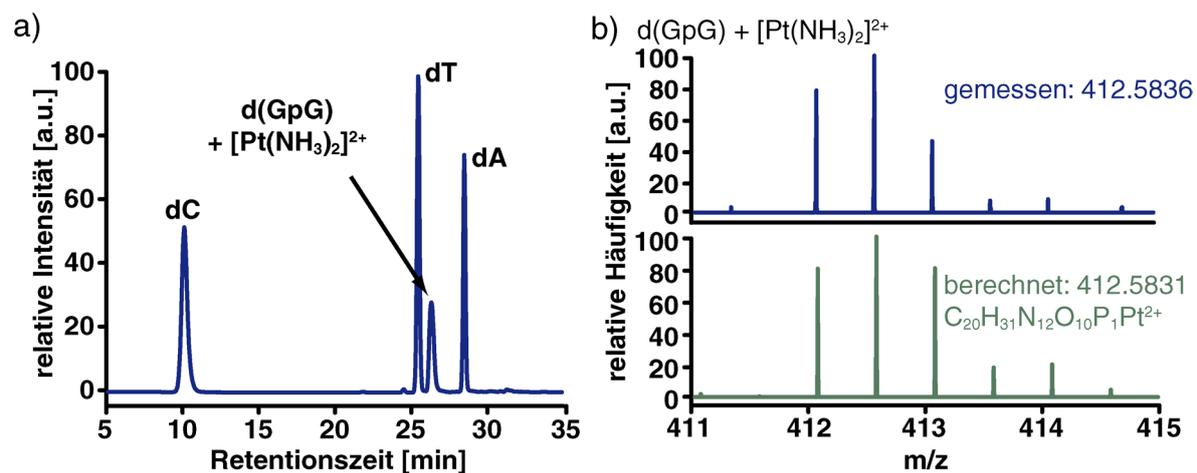


Abbildung 26. a) HPL-Chromatogramm des enzymatischen Totalverdaus von platinieren **DNA_3** bei 260 nm. b) MS-Spektrum von $d(GpG) + [Pt(NH_3)_2]^{2+}$. Das grüne Spektrum zeigt die berechnete Masse. Die molekularen Gewichte wurden im positiven Modus des Massenspektrometers aufgenommen.

3.1.3. Isolierung und Charakterisierung von 1,3-d(GpTpG) Cisplatin-geschädigter DNA

Abbildung 27a zeigt das Umkehrphasen HPL-Chromatogramm der Umsetzung von

aktiviertem Cisplatin mit **DNA_4**. In diesem Chromatogramm erscheinen deutlich mehr Nebenprodukte als bei der Platinierung des sequenzähnlichen DNA-Strangs **DNA_3**. Zudem eluieren der Eduktpeak (rot) und das entstehende Hauptprodukt (blau) zur selben Zeit.

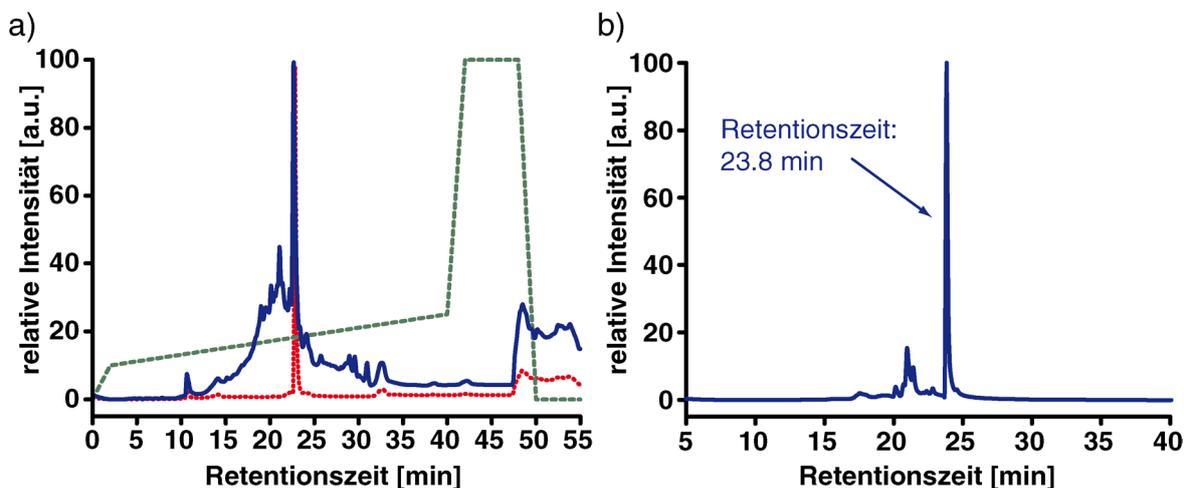


Abbildung 27. a) Umkehrphasen HPL-Chromatogramm der Platinierung von **DNA_4** (blau). Der rote gepunktete Peak zeigt das Ausgangsprodukt **DNA_4**. Der verwendete Gradient ist in grüner Farbe dargestellt. b) Anionenaustauscher-Chromatogramm nach der Auftrennung mittels Reversphasenchromatographie.

Dies schloss eine Überwachung des Verlaufs der Reaktion mittels Umkehrphasen-Chromatographie aus. Erst eine Optimierung ermöglichte die vollständige Umsetzung der DNA mit Cisplatin und somit eine Trennung von Edukt und Produkt. Massenspektrometrisch (MALDI-ToF) konnten Bis-Cisplatin-Addukte als Nebenprodukte der Platinierung von GpTpG enthaltenden Sequenzen nachgewiesen werden.

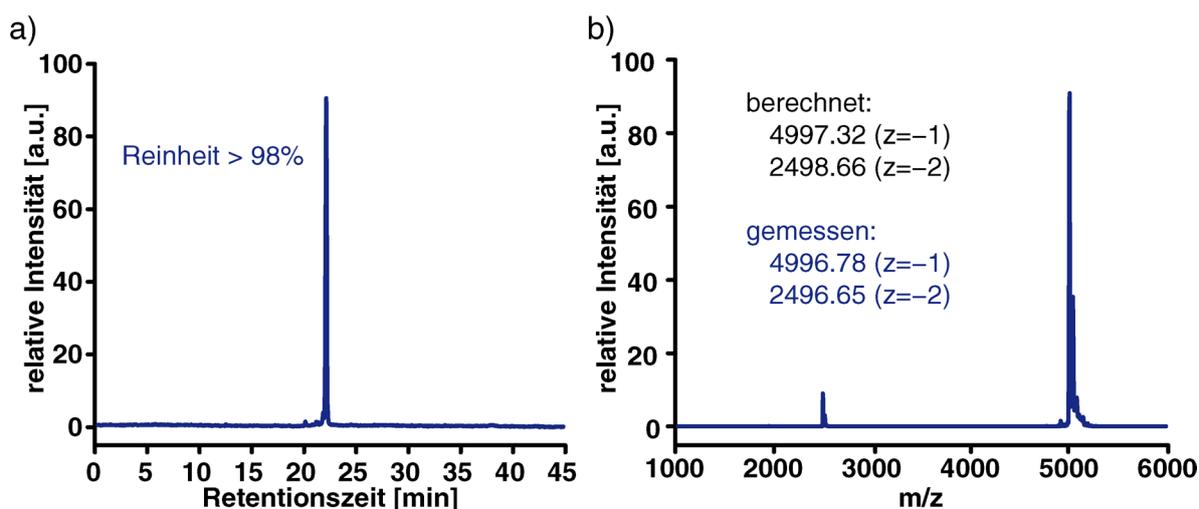


Abbildung 28. a) Kapillargelelektrophorese zeigt die Reinheit des Produktes von über 98%. b) MALDI-ToF Spektrum der platinieren **DNA_4**.

Sowohl Kapillargelelektrophorese als auch Anionenaustauscher-Chromatographie zeigten, dass die Auftrennung allein durch Umkehrphasen-Chromatographie das gewünschte Produkt nicht

3. Ergebnisse und Diskussion

in hoher Reinheit lieferte (Abbildung 27b). Erst die erneute Auftrennung mittels Anionentausch-Chromatographie lieferte den platinieren Strang **DNA_4** in einer Reinheit von größer 98% (Abbildung 28a). Das Produkt wurde massenspektrometrisch mittels MALDI-ToF (Abbildung 28b) und ESI-MS (Abbildung 29) identifiziert.

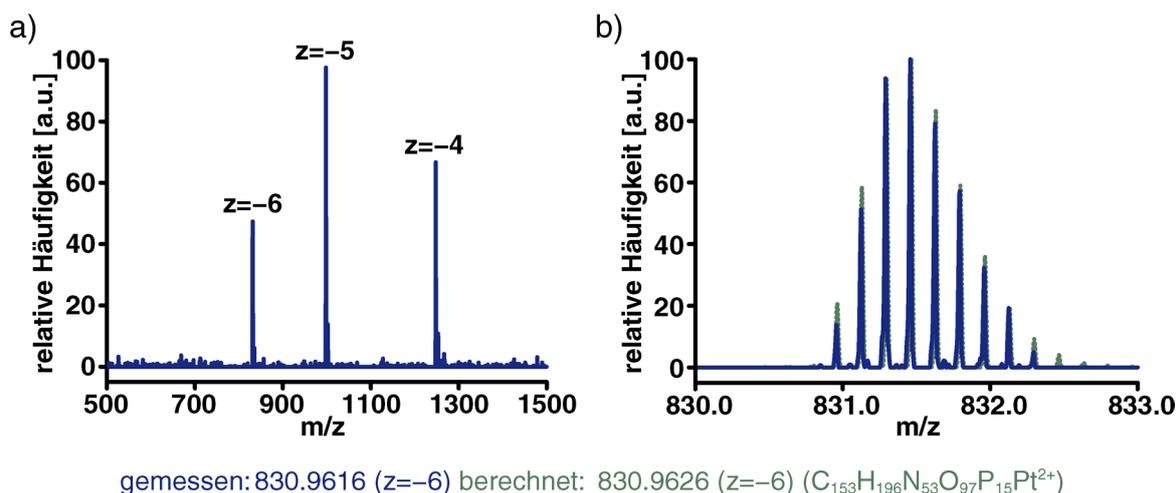


Abbildung 29. a) ESI-MS Spektrum des platinieren DNA-Strangs **DNA_4** im Bereich von 500 bis 1500 Da mit den geladenen Strängen $z=-6$, $z=-5$ und $z=-4$. b) Isotopenverteilung der platinieren DNA mit Ladung $z=-6$ (blau). In grüner Farbe ist das berechnete Spektrum für $C_{153}H_{196}N_{53}O_{97}P_{15}Pt^{2+}$ abgebildet.

Um wiederum die Anwesenheit von monofunktionellen und dA-Addukten auszuschließen, wurde die DNA enzymatisch bis auf die Nukleosidebene verdaut. Für 1,3-d(GpTpG)-Schäden hat sich ein modifiziertes Protokoll nach *Burley et al.* als geeignet erwiesen.^[152] Hierbei wurde 1 nmol DNA zunächst mit Nuclease S1 für 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mit *Antarctic Phosphatase* und *Snake venom Phosphodiesterase I* für weitere 3 h verdaut. Der Verdau wurde mittels hochauflösender HPLC-MS analysiert (Abbildung 30 und Abbildung 31).

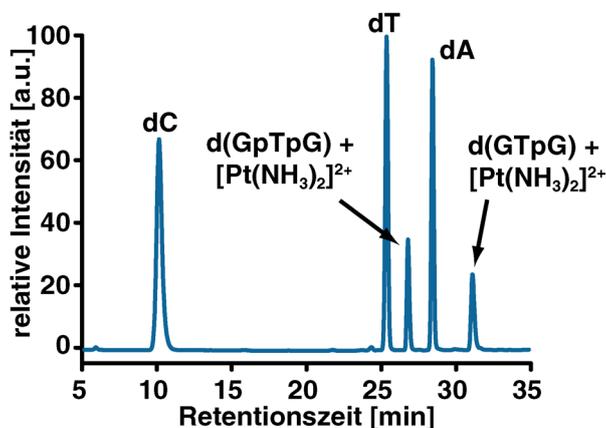


Abbildung 30. HPL-Chromatogramm des enzymatischen Totalverdaus von platinierter **DNA_4** bei 260 nm.

Neben den kanonischen Basen dC, dT und dA wurden zwei weitere Peaks detektiert

(Abbildung 30). Der erste Peak (Retentionszeit 27 min) konnte dem Trinukleotid-Cisplatin Addukt $d(\text{GpTpG}) + [\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ zugeordnet werden (Abbildung 31a). Dies bestätigt die Entstehung des korrekten 1,3- $d(\text{GpTpG})$ Cisplatin Adduktes. Der zweite Peak (Retentionszeit 29 min) wird durch dasselbe Addukt hervorgerufen, resultiert aber aus dem Verdauprodukt $d(\text{GTPg}) + [\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ (Abbildung 31b). Hier fehlt eine der zentralen Phosphatgruppen. Diese kann vermutlich durch die herausgedrehte Anordnung des zentralen Thymins^[50] von der Phosphatase zum Teil angegriffen werden.

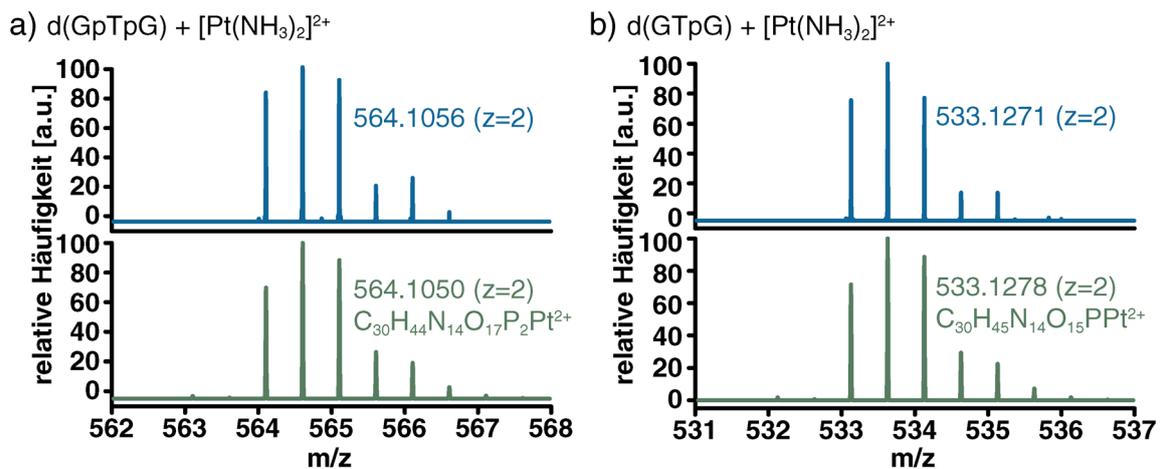


Abbildung 31. a) MS-Spektrum von $d(\text{GpTpG}) + [\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$. b) MS-Spektrum von $d(\text{GTPg}) + [\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$. Das grüne Spektrum zeigt die berechnete Masse. Die molekularen Gewichte wurden im positiven Modus des Massenspektrometers aufgenommen.

Als Nachweis, dass die Addukte $d(\text{GpTpG}) + [\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ und $d(\text{GTPg}) + [\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ entstanden sind, wurde die Reaktionsmischung nach dem enzymatischen Totalverdau mit Natriumcyanid behandelt, um das Platin-Atom zu entfernen.^[153] Nach anschließender Entsalzung wurde die Reaktionsmischung erneut mittels HPLC-MS analysiert (Abbildung 32).

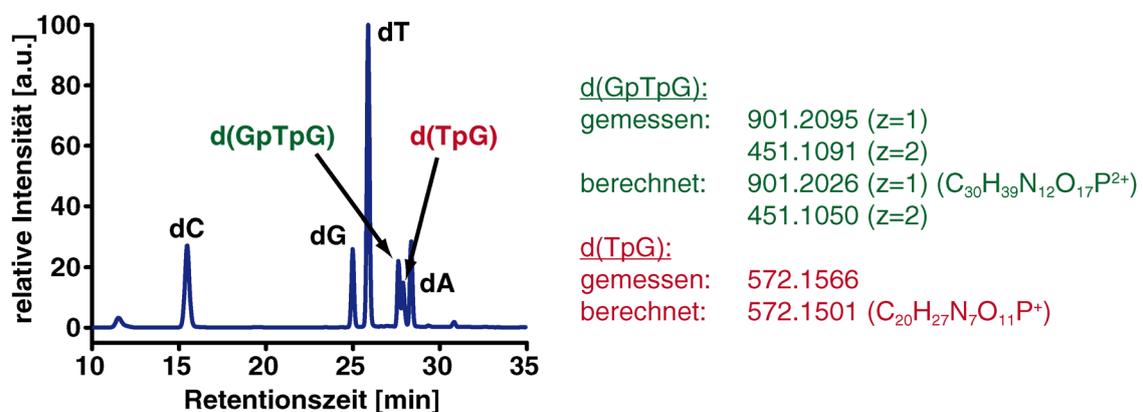


Abbildung 32. HPL-Chromatogramm des enzymatischen Totalverdaus nach der Behandlung mit Natriumcyanid.^[153]

Im Vergleich zu Abbildung 31a sind die Peaks für $d(\text{GpTpG}) + [\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ und $d(\text{GTPG}) + [\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ verschwunden. Es erschienen drei neue Peaks: Peak 1 bei 25 min für Guanosin, Peak 2 bei 27 min für $d(\text{GpTpG})$ und Peak 3 bei 28 min für $d(\text{TpG})$. Die Entstehung der neuen Peaks dient als wichtige Kontrolle für die entstandenen Verdauprodukte aus Abbildung 31a. $d(\text{GTPG}) + [\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ zerfällt durch die Entfernung des Platin-Atoms in Guanin und $d(\text{TpG})$.

3.2. Herstellung und Aufreinigung der 2',3'-Dideoxyprimer

Die reverse DNA-Festphasensynthese ($5' \rightarrow 3'$) wurde mit dem Zweck durchgeführt, am 3'-Ende des zu synthetisierenden Primers ein Dideoxy-Nukleotid zu positionieren. Es wurde ein 9mer-Primer (**dd9mer**) mit der Sequenz $5'\text{-GTG GAT GAX-}3'$ (mit $X = \text{ddG}$) synthetisiert, welcher komplementär zum Cisplatin-geschädigten DNA-Templat **DNA_4** ist. Das Hybrid aus beiden Strängen sollte später für Kristallisationsversuche mit DNA Polymerase η (Pol η) eingesetzt werden. Dabei verhindert das Dideoxy-Ende des Primers die Polynukleotidsynthese, so dass Kristalle von Pol η mit dem DNA-Schaden und dem angelagerten NTP im aktiven Zentrum erhalten werden können.

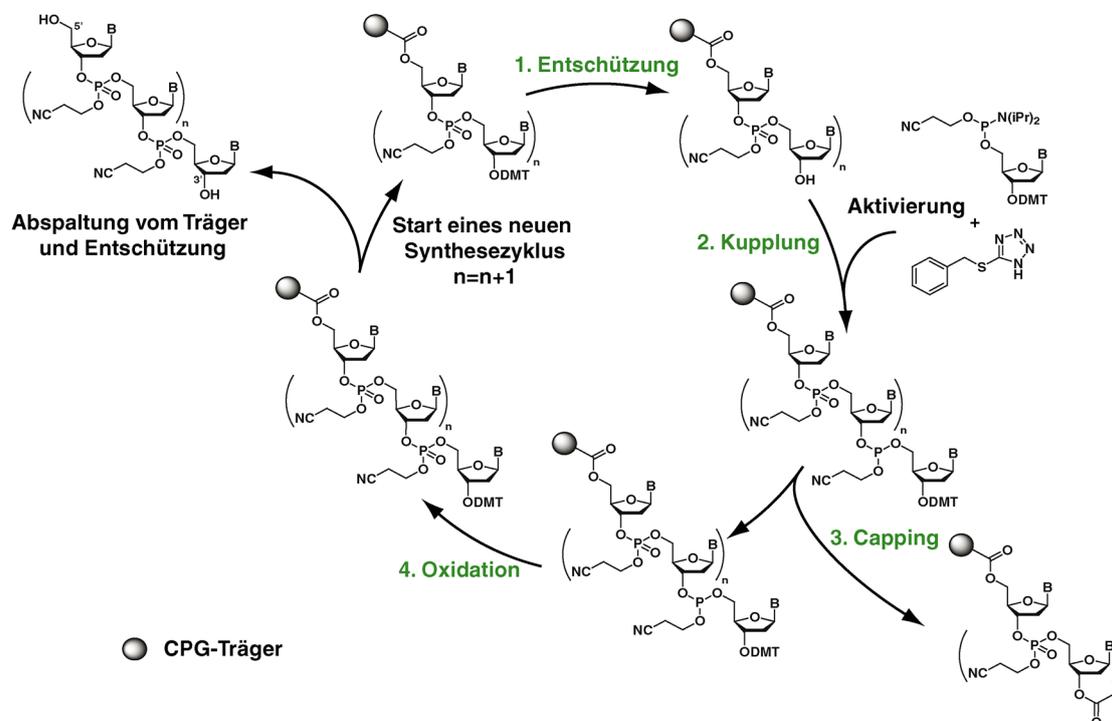


Abbildung 33. Syntheszyklus der reversen DNA-Synthese.

Die reverse Synthese des **dd9mers** war nach analogen Bedingungen des Standardprotokolls des *Synthesizer*-Herstellers möglich (siehe Anhang 5.3). Lediglich die Kupplungszeiten für

die reversen Phosphoramidite wurden von 96 s auf 192 s erhöht. Der Einbau des Didesoxy-Guanosins am 3'-Ende wurde mit einer verlängerten Kupplungszeit von 10 min durchgeführt, um eine höchstmögliche Ausbeute bei diesem Schritt zu gewährleisten. Abbildung 33. zeigt schematisch den Syntheszyklus während der Kupplung eines reversen Amidites.

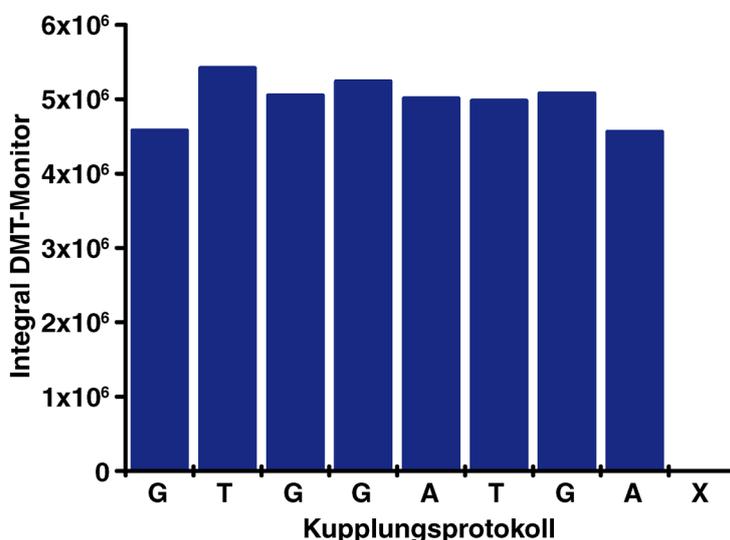


Abbildung 34. DMT-Signale des *Expedite 8900*-Synthesizers bei der Synthese des **dd9mers**. 5'-G ist das Signal des 5'-Guanosin-CPG-Trägers. Bei X (ddG) ist kein Signal zu sehen, da es sich um das Didesoxy-Phosphoramidit ohne DMT-Schutzgruppe handelt.

Abbildung 34 zeigt die DMT-Signale des Syntheseverlaufs des **dd9mers**. Die ersten acht Nukleotide des 9mers ließen sich mit annähernd gleich guter Effizienz kuppeln. Der Einbau des Didesoxy-Guanosins (X) kann über den DMT-Monitor nicht verfolgt werden, da das Phosphoramidit in 3'-Position wegen fehlender Hydroxyl-Funktion keine DMT-Schutzgruppe tragen kann.

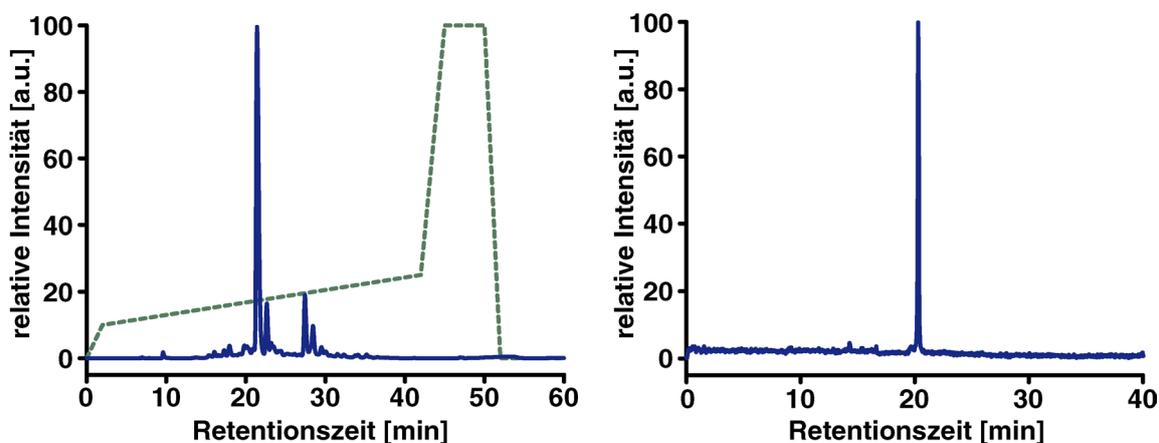


Abbildung 35. a) HPL-Chromatogramm der präparativen Umkehrphasentrennung des **dd9mers** nach der Synthese, aufgenommen bei 260 nm. Gestrichelte Linie: verwendeter Gradient. b) Diagramm der Kapillaronengelelektrophorese des **dd9mers** nach chromatographischer Reinigung.

Nach basischer Entschützung über Nacht und anschließender Lyophilisierung wurde das

Oligonukleotid mit Hilfe von präparativer Umkehrphasen-HPLC gereinigt.

Abbildung 35a zeigt das HPL-Chromatogramm des Rohproduktes direkt nach der Synthese. Der Anteil des Hauptproduktes mit einer Retentionszeit von 21.3 min betrug über 65%. Abbildung 35b zeigt die Reinheit des erhaltenen Produktes mittels Kapillarzonen-gelelektrophorese. Wie man dem Diagramm entnehmen kann, wurde eine vollständige Abtrennung aller Nebenprodukte erreicht.

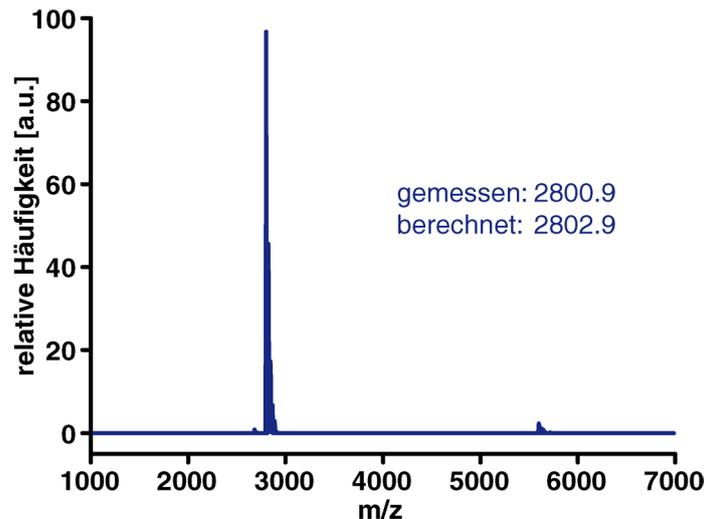


Abbildung 36. MALDI-TOF-Massenspektrum von **dd9mer** nach chromatographischer Reinigung.

Die erfolgreiche Kupplung konnte durch MALDI-ToF verifiziert werden (Abbildung 36).

3.3. Translesion-Synthese des 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Schadens

Für den 1,2-d(GpG) Cisplatin Schaden konnte gezeigt werden, dass dieses Addukt mit Hilfe von Pol η und Pol ζ überlesen werden kann (Abbildung 21a).^[148] Es stellte sich natürlich die Frage, ob auch der 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Schaden, der die DNA-Helix stärker stört, in Zellen toleriert werden kann (Abbildung 37). Dieser Schaden besitzt wie in Kapitel 3.7 beschrieben eine extrahelikale Base dT zwischen den beiden dG-Einheiten. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Schaden Pol η blockiert.^[154-155] Informationen über diesen Prozess ermöglichen der medizinisch-chemischen Forschung die Entwicklung von neuen Zytostatika mit einer erhöhten Fähigkeit TLS zu verhindern. Neu entwickelte Chemotherapeutika, die auf diesen Erkenntnissen basieren, könnten eine Therapie von resistenten Krebszellen ermöglichen.

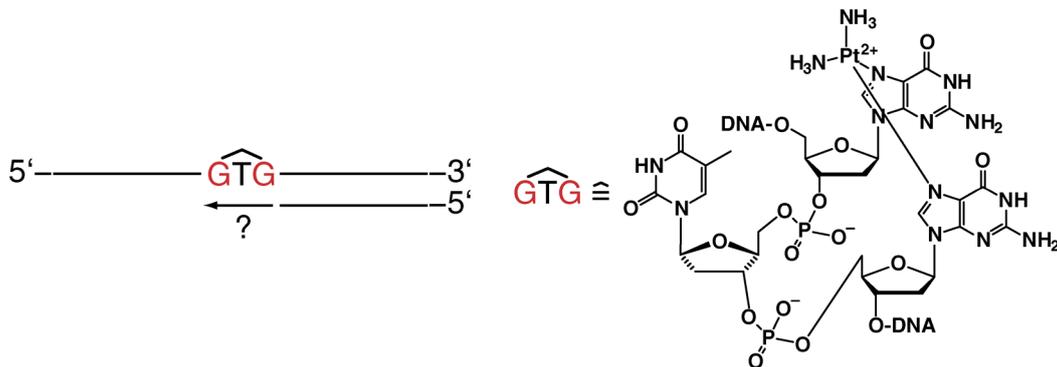


Abbildung 37. Für das Überlesen eines 1,2-d(GpG) Cisplatin-Schadens sind Pol η und Pol ζ zuständig. Welche Polymerasen sind aber für die TLS des 1,3-(GpTpG) Cisplatin-Schadens nötig? Die rechte Abbildung zeigt schematisch die Struktur des 1,3-(GpTpG) Cisplatin-Schadens.

Für die TLS-Analyse wurde der *gapped* Plasmid TLS-Assay nach *Livneh* verwendet (siehe Kapitel 1.6). Eine Beeinflussung durch die Reparatur mittels Nucleotid-Exzision ist hierbei ausgeschlossen, da das Substrat für NER doppelsträngige DNA ist. Zudem würde eine Entfernung des Schadens aus der Einzelstrangregion eine Linearisierung des Plasmids verursachen und während des Experiments verloren gehen. Des Weiteren können die Plasmide nicht in eukaryotischen Zellen repliziert werden. Der für die Amplifikation verwendete *E. coli* Stamm ist außerdem defizient in NER und homologer Rekombination. Für die Durchführung des Assays wurde das platinerte Oligonucleotid **DNA_2** (siehe Tabelle 3) in ein *gapped* Plasmid, das ein Kanamycinresistenzgen (kan^R) enthielt, inkorporiert. Dabei befand sich der Schaden in dem einzelsträngigen Bereich (Abbildung 20). Dieses Plasmid wurde zusammen mit einem *gapped* Plasmid cotransfiziert, das in dem einzelsträngigen Bereich keinen Schaden trug und mit einem Chloramphenicolresistenzgen (cm^R) ausgestattet war. Das erste Experiment wurde in Pol η exprimierenden und Pol η defizienten (XP-V Zellen) humanen Fibroblasten durchgeführt. Nach der Transfektion wurden die Zellen unterschiedlich lange inkubiert, damit eine TLS im einzelsträngigen Bereich des Plasmids erfolgen kann. Die Zellen wurden unter alkalischen Bedingungen lysiert. Unter diesen Bedingungen degradieren alle Plasmide, die nicht vollständig geschlossen wurden. Die vollständig replizierten Plasmide wurden extrahiert und in einen reparatur-defizienten *E. coli* Indikatorstamm transfiziert. Die *E. coli* Zellen wurden auf zwei verschiedenen Agarplatten gezüchtet. Die eine Platte enthielt Kanamycin, die andere Chloramphenicol. Somit konnten nur die Zellen überleben, die das entsprechende Resistenzgen trugen. Durch das Zählen der Kolonien konnte das Verhältnis kan^R/cm^R bestimmt und somit das Überlesen des Schadens quantifiziert werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

Abbildung 38 zeigt die experimentell bestimmte TLS-Effizienz in den Fibroblasten. Trotz des herausgedrehten zentralen Thymins und der somit sperrigen Natur wird der 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Schaden überraschender Weise in Zellen überlesen. Der Überlesensprozess ist zwar im Vergleich zu anderen DNA-Schäden verhältnismäßig ineffizient, aber möglich. Nach 7.5 Stunden wurde ein TLS Ausmaß von 7–10% beobachtet, während nach 20 Stunden die TLS Effizienz bei 20–40% lag. Zum Vergleich: ~60% des 1,2-d(GpG) Cisplatin Schadens wurden nach 20 Stunden überlesen.^[148] Auffällig ist zudem, dass die TLS-Rate in den Pol η defizienten Zellen herabgesetzt ist. Dies zeigt, dass Pol η tatsächlich an der TLS über den 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Schaden beteiligt ist. In der Abwesenheit von Pol η sind Zellen nachwievor in der Lage, TLS komplexer Schäden durch ein Zusammenspiel verschiedenster Polymerasen zu bewerkstelligen („Mehr-Polymerasen Modell“ der TLS). Dies erklärt, dass auch in Pol η defizienten Fibroblasten TLS beobachtet wird. Die Ergebnisse zeigen wie flexibel Zellen sind, wenn sie ihr Genom in der Gegenwart von Schäden replizieren. Selbst solche stark Helix-verzerrende Schäden wie der 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Schaden stellen kein unüberwindbares Hindernis dar.

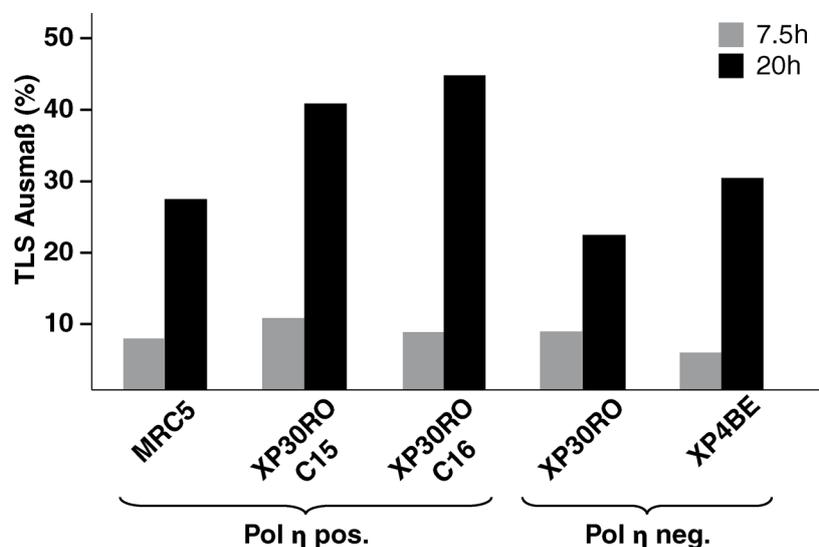


Abbildung 38. TLS über das Cisplatin 1,3-d(GpTpG) Addukt in verschiedenen Pol η exprimierenden (Pol η pos.) und Pol η defizienten (Pol η neg.) humanen Fibroblasten. Zum Vergleich sind die TLS Raten nach 7.5 Stunden und 20 Stunden angegeben.

Diese Ergebnisse wurden durch Sequenzanalyse der Region gegenüber dem Schaden bestätigt. Die erhaltenen Sequenzinformationen geben dabei direkten Einblick in die Mutagenität des Schadens. Die Daten zeigen, dass sich die mutagene Signatur signifikant (Pearson χ^2 Test p-Wert < 0.0001) zwischen Pol η exprimierenden und Pol η defizienten Zellen unterscheidet (Abbildung 39). Wenn Pol η nicht am TLS-Prozess teilnehmen kann,

steigt die Mutationsrate gegenüber dem 3'dG (Pt-GTG) von 13% auf 48% (Durchschnittswerte). Zudem wird eine starke Präferenz für den Einbau von dA beobachtet. Die Fehlerrate für den TLS-Prozess des 5'dG (Pt-GTG) ist in den Pol η defizienten Zellen von 33% auf 13% herabgesetzt. Erstaunlicherweise wird das zentrale Thymin des Schadens (Pt-GTG) sowohl in den Pol η exprimierenden als auch in den Pol η defizienten Zellen fehlerfrei repliziert. Pol η scheint an diesem Teil des TLS-Prozesses nicht beteiligt zu sein.

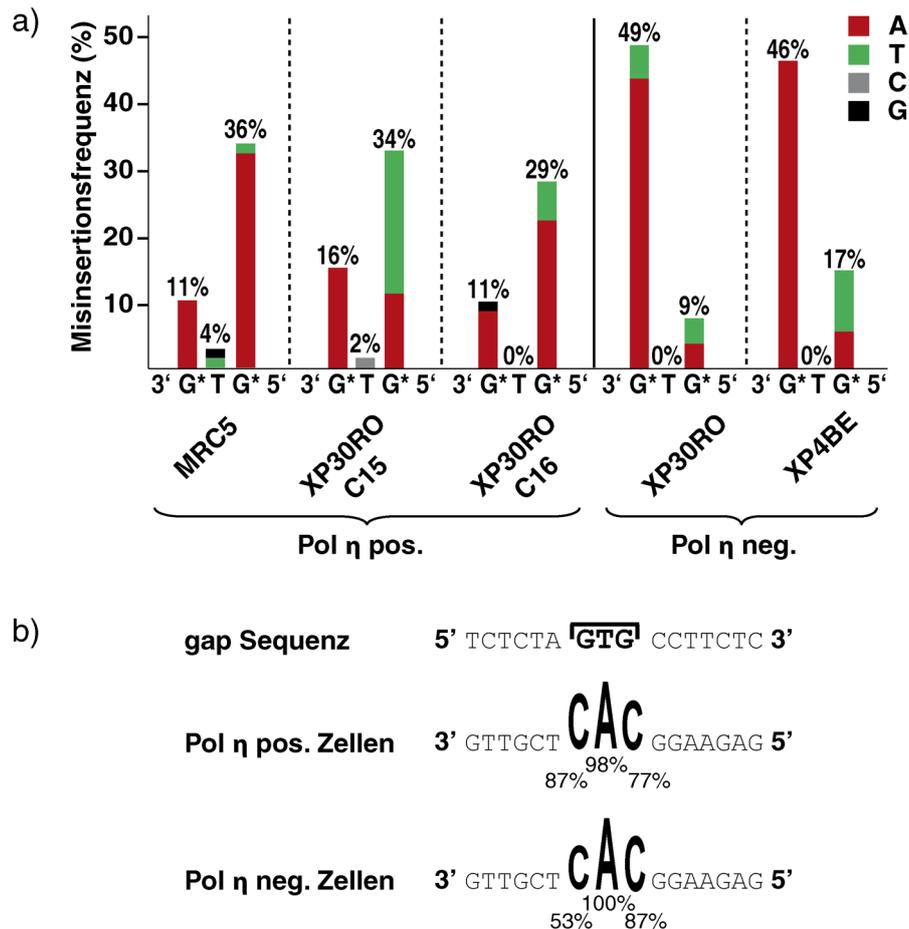


Abbildung 39. a) Mutagene Signatur der TLS über den 1,3-d(GpTpG) Cisplatin-Schaden in verschiedenen Pol η exprimierenden (Pol η pos.) und Pol η defizienten (Pol η neg.) humanen Fibroblasten. Zu beachten ist, dass XP-V Zellen, die mit Wildtyp Pol η komplementiert sind (XP30RO C15/C16), ein höheres Expressionslevel an Pol η besitzen als normale Zellen. b) Prozentsatz des korrekten Überlesens des 1,3-d(GpTpG) Cisplatin-Schadens in Pol η exprimierenden (Pol η pos.) und Pol η defizienten (Pol η neg.) Zellen.

Die Ergebnisse stimmen mit den *in vitro* Studien überein, in denen Pol η allein nicht über den 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Schaden hinweglesen kann.^[154-155] Die Untersuchungen zeigen aber, dass der erste Überlesensschritt größtenteils von Pol η durchgeführt wird. Das Enzym baut dabei äußerst effektiv ein dC gegenüber dem 3'dG des Trinukleotid-Schadens ein (Abbildung 39b).

Der gesamte TLS-Prozess über den Schaden ist ein fehlerhafter Prozess, der durch eine

Vielzahl an Polymerasen durchgeführt wird. Im Fall der TLS über den 1,2-d(GpG) Cisplatin Schaden konnte mittels RNAi Experimenten gezeigt werden, dass in der Abwesenheit von Pol η der Einbau gegenüber dem ersten Nukleotid des Schadens von Pol κ übernommen wird. Da Pol κ bevorzugt dA gegenüber Templatbasen einbaut, spricht eine erhöhte Misinkorporation von dA für eine Beteiligung von Pol κ im TLS -Prozess. Nach dem Einbau der ersten Base durch Pol η oder Pol κ , verhängert Pol ζ das Konstrukt über den kompletten Schaden. Im Fall des 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Schaden wird ebenfalls ein erhöhter dA Fehleinbau gegenüber dem 3'dG des Schadens in Abwesenheit von Pol η beobachtet. Diese Analogie lässt darauf schließen, dass wiederum Pol κ den Verlust an Pol η auf Kosten einer erhöhten Mutagenität ausgleicht. Es ist somit möglich, dass zumindest teilweise das Überlesen des Schadens durch Pol κ erfolgt.

3.4. Expression und Aufreinigung von Pol η

Das *S. cerevisiae Rad30* Gen kodiert die 632 Aminosäuren von Pol η .^[156] Für erste Primerverlängerungsstudien klonierte und reinigte Dr. Carsten Pieck in unserem Laboratorium eine verkürzte Version vom Pol η (632 Aminosäuren).^[157-158] Für die Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurde eine noch weiter verkürzte Version von Pol η (1–513 Aminosäuren) von Dr. Claudia Chiocchini produziert. Die fehlenden C-terminalen Aminosäuren von Pol η aus Hefe besitzen vor allem regulatorische Funktion, beeinträchtigen die katalytische Aktivität sowie die Fähigkeit zur Translesion-Synthese aber nicht. Der entfernte Proteinbestandteil ist Bestandteil der Polymerase-assoziierten Domäne und interagiert *in vivo* mit der Replikationsmaschinerie. So wird Pol η durch die Wechselwirkung zwischen PCNA^[159] und den C-terminalen Aminosäuren 621–628 an die Replikationsgabel rekrutiert.^[160] Ein Strep-TagII wurde N-Terminal an das rekombinante Protein angehängt, um eine anschließende Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie zu ermöglichen.

Pol η wurde in *E. coli* (Rosetta) überproduziert. Nach erfolgter Zelllyse wurde das Enzym mittels einer Strep-Tactin Säule aufgereinigt. Die gesammelten, Protein enthaltenden Fraktionen wurden auf Heparin Puffer A umgepuffert und anschließend anhaftende DNA mittels einer HiTrap Heparin HP Ionenaustauschersäule entfernt. Die entsprechenden Fraktionen wurden gesammelt und bei einer Konzentration von 4–6 mg/mL bei –80 °C gelagert.

3.5. Primerverlängerungsstudien mit 1,3-d(GpTpG) geschädigter DNA und Pol η

Der DNA-Strang mit dem Pt-GTG-Schaden (18mer) und, als Kontrolle, derselbe Strang ohne Pt-GTG-Schaden wurden mit einem 5'-Fluoreszein-markierten DNA-Primer hybridisiert (Abbildung 40). Die beiden DNA-Konstrukte wurden anschließend mit gereinigter Pol η aus *S. cerevisiae* (siehe Kapitel 3.4) inkubiert. Dabei variierte die Konzentration der vier Nukleotidtriphosphate von 1 bis 1000 nM (Abbildung 40). Die Reaktionsprodukte wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und untersucht. Pol η verlängert das ungeschädigte DNA-Templat (Abbildung 40), während eine komplette Verlängerung des geschädigten 1,3-d(GpTpG)-Templats nicht möglich ist. Dies wurde durch kürzlich veröffentlichte Daten von humaner Pol η bestätigt.^[155] Pol η aus *S. cerevisiae* baut gegenüber vom Schaden die erste Base effizient ein, während eine Verlängerung um eine zweite Base nur gezwungenermaßen mit erhöhten Enzymkonzentrationen erfolgt.

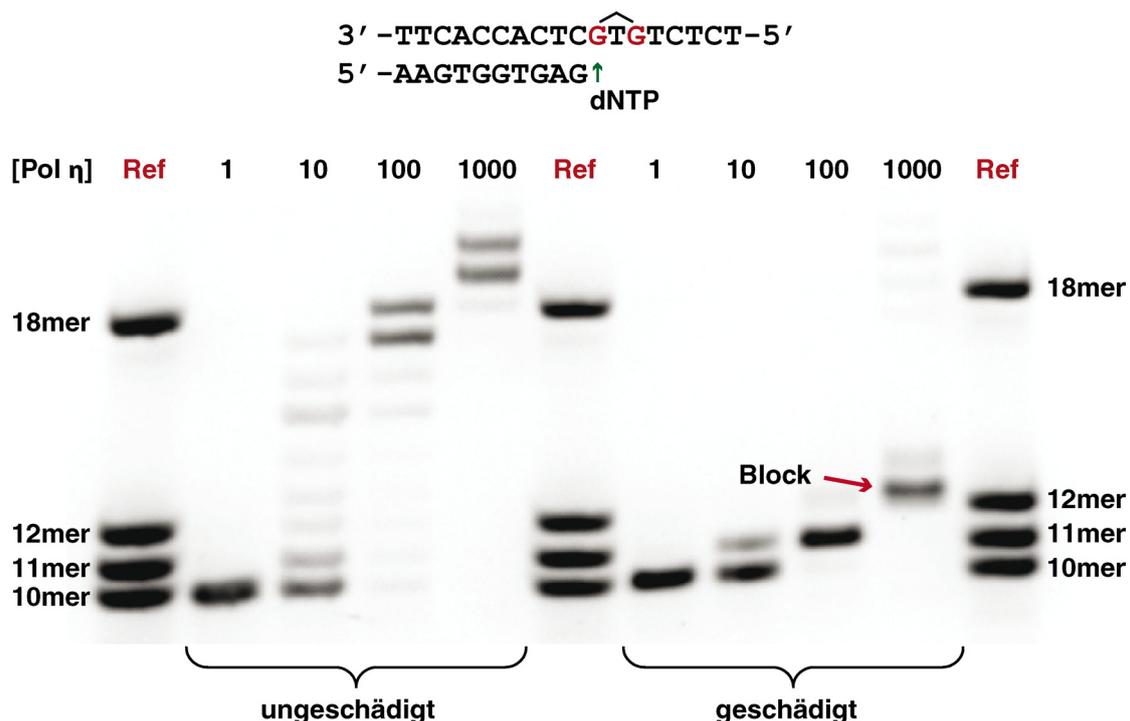


Abbildung 40. Primerverlängerungsstudie mit Pol η und 5'-Fluoreszein-markierten Primern in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration; Endkonzentrationen von 1–1000 nM Pol η mit einem Überschuss an Substrat (10 μ M Templat-DNA und 100 μ M Nukleotidtriphosphat) in 10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol (DTT), pH 7.9; Ref: Referenz.

Um zu zeigen, welche Base Pol η während des partiellen Überlesens einbaut, wurden während der Primerverlängerungsstudie nur die einzelnen Triphosphate hinzugefügt (Abbildung 41). Die Daten zeigen, dass das Enzym gegenüberliegend zu 3'dG des Pt-GTG-

3. Ergebnisse und Diskussion

Schadens korrekt ein dC einbaut (Abbildung 41a). Der zweite Nukleotidyltransfer dagegen ist viel langsamer (Abbildung 41b), erfolgt bei höheren Enzymkonzentrationen aber dennoch (350 nM). Während dieses Schrittes baut das Enzym entweder dA oder dG ein, wobei dG bevorzugt wird. Für eine abasische Stelle ist dieser Effekt bekannt: Das Hefe-Enzym bevorzugt den Einbau von dG gegenüber dA, da dG eine bessere Basenstapelung eingeht.^[161] Nach diesem zweiten Verlängerungsschritt wird das Enzym blockiert (Abbildung 40).

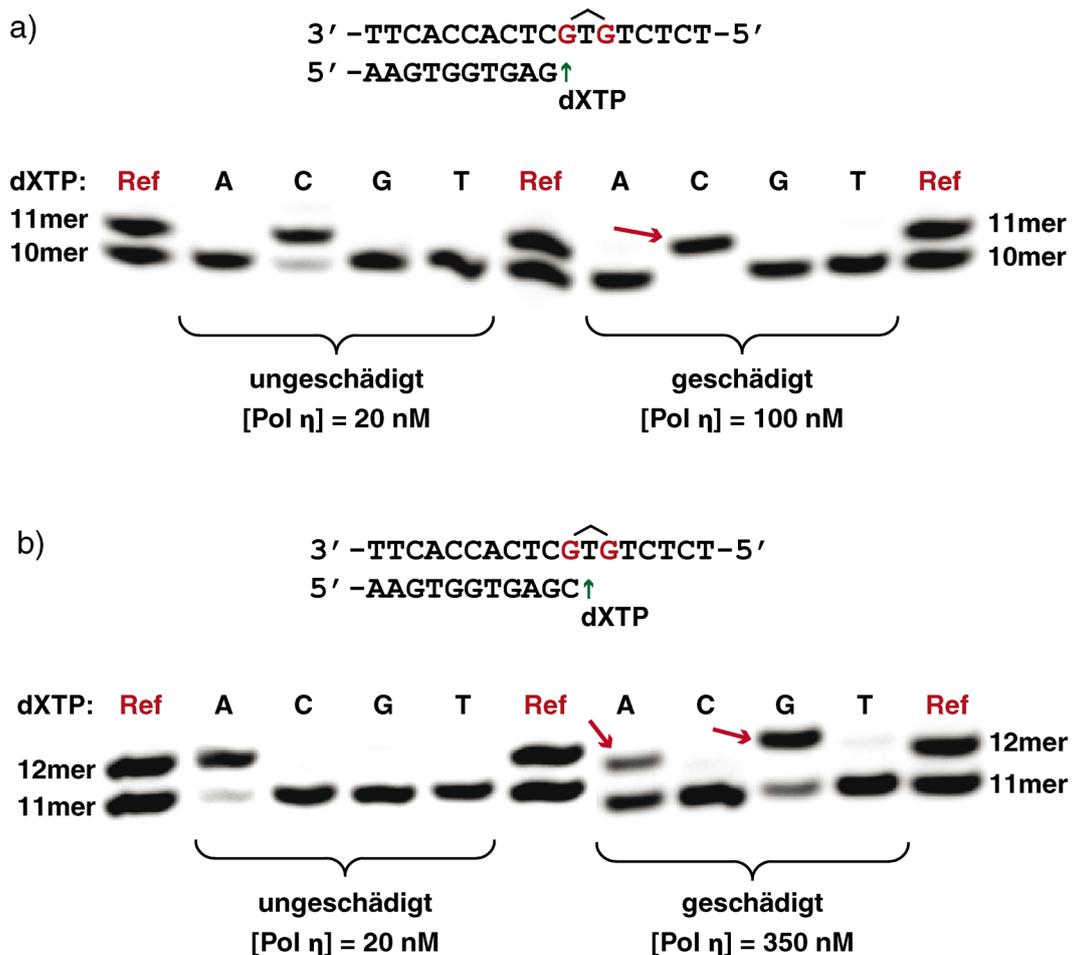


Abbildung 41. Primerverlängerungsstudien mit Pol η und 5'-Fluoreszein-markierten Primern mit einzelnen Nucleotidtriphosphaten. a) Korrekter Einbau von dC gegenüberliegend zu 3'dG des Pt-GTG-Schadens. b) Selektivität des Nucleotideinbaus gegenüberliegend zum zentralen dT des Schadens (entweder Einbau von dA oder dG); Ref: Referenz.

In den hier beschriebenen Primerverlängerungsstudien war Pol η unfähig nach dem zentralen Thymin des 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Schadens weitere Nucleotide einzufügen. Somit kam es zu einem Replikationsstopp selbst bei erhöhter Enzymkonzentration. Dies ist erstaunlich, da für den 1,2-d(GpG) Cisplatin Schaden *in vitro* gezeigt werden konnte, dass Pol η alleine fähig ist den Schaden zu überlesen. Diese Primerverlängerungsstudien unterstützen die Hypothese des Mehr-Polymerasen Modells für komplexe Schäden. Pol η baut zunächst korrekt und

schnell ein dCTP gegenüber dem 3'dG. Eine weitere Verlängerung nach dem zentralen Thymin wird aber nicht beobachtet. Dieser Prozess wird wahrscheinlich durch noch nicht identifizierte Polymerasen übernommen.

3.6. Kristallisation des 1,3-d(GpTpG) Cisplatin-Schadens in Komplex mit Pol η

Um den Mechanismus der Inkorporation von zwei Basen durch Pol η gegenüberliegend zum drei Nukleobasen umfassenden 1,3-d(GpTpG) Cisplatin-Schaden zu untersuchen, wurde Pol η aus *S. cerevisiae* zusammen mit einem Templat-Primer-Komplex, der ein Cisplatin 1,3-d(GpTpG) Addukt im zweiten Verlängerungsschritt enthält, kristallisiert.

Die Struktur des Apoenzyms von Pol η wurde bereits 2001 gelöst^[140] und die des ternären Komplex von Pol η mit 1,2-(GpG) Cisplatin-geschädigter DNA wurde 2007 von *Carell und Mitarbeitern* veröffentlicht (siehe Kapitel 1.5.3).^[139] In einem anfänglichen Selektionsverfahren mit ungeschädigter DNA konnten die Autoren eine optimale Länge der DNA von 16 Basenpaaren feststellen.^[162] Der Duplex-Strang **eta Ep1** kristallisierte erfolgreich den 3'dG Verlängerungsschritt und **eta Ep2** den 5'dG Verlängerungsschritt des Dinukleotid-Schadens (Tabelle 4). Analog zu diesen Sequenzen wurden die DNA-Duplexe **GTG_1** und **GTG_2** für die Kristallisation des Pt-GTG Schadens gewählt. Dabei sollte **GTG_1** den 3'dG Verlängerungsschritt kristallisieren und **GTG_2** die Verlängerung gegenüber dem zentralen Thymin.

Name	Sequenz
eta Ep1	3' \ CACCTACTC GG TCTCT 5' \ GTGGATGAG _{dd}
eta Ep2	3' \ CACCACTC GG TCTTCT 5' \ GTGGTGAGC _{dd}
GTG_1	3' \ CACCTACTC GTGT CTC 5' \ GTGGATGAG _{dd}
GTG_2	3' \ CACCACTC GTGT TCTCT 5' \ GTGGTGAGC _{dd}

Tabelle 4. DNA-Konstrukte für die Co-Kristallisation von Pol η im 3'dG Verlängerungsschritt und im 5'dG Verlängerungsschritt. In rot sind die Bindungsstellen von Cisplatin markiert.

Um Kristalle der einzelnen Verlängerungsschritte zu erhalten, wurde vor der Kristallisation Protein, DNA, Magnesiumsulfat und das entsprechende dNTP präinkubiert. Der 3'dG Verlängerungsschritt wurde mit dCTP inkubiert, der Verlängerungsschritt gegenüber dem

3. Ergebnisse und Diskussion

zentralen Thymin mit dATP bzw. dGTP (siehe Primerverlängerungsstudien Abbildung 41). Das Templat mit dem 1,3-d(GpTpG) Cisplatin-Schaden wurde mit dem entsprechenden Primer mit einer 2',3'-Dideoxybase am 3' Ende (um eine Verlängerung zu verhindern) im Proteinaufbewahrungspuffer hybridisiert. Protein und DNA-Duplex wurden im molaren Verhältnis von 1 zu 4 zusammengegeben. Des Weiteren wurden Magnesiumsulfat und das entsprechende dNTP hinzugegeben. Nach zehnminütiger Inkubation wurde die Reaktionsmischung mittels der *hanging-drop vapour-diffusion* Methode kristallisiert. Erste Treffer wurden weiter optimiert und die Bedingungen verfeinert, um größere Kristalle zu erhalten. Die Kristallisationsplatten wurden bei 4 °C inkubiert und die Kristalle erschienen nach 3–6 Tagen.

Das Ergebnis der Kristallisation des 3'dG Verlängerungsschrittes zeigt Abbildung 42 (links). Eine Optimierung der Bedingungen führte nicht zu verbessertem Kristallwachstum bzw. größeren Kristallen. Auch durch Animpfen (*Seeding*) konnten keine größeren Kristalle erhalten werden. Abbildung 42 zeigt rechts das Ergebnis der Kristallisation der Verlängerung gegenüber dem zentralen Thymin. Die Kristalle konnten nur mittels Inkubation von dATP erhalten werden.

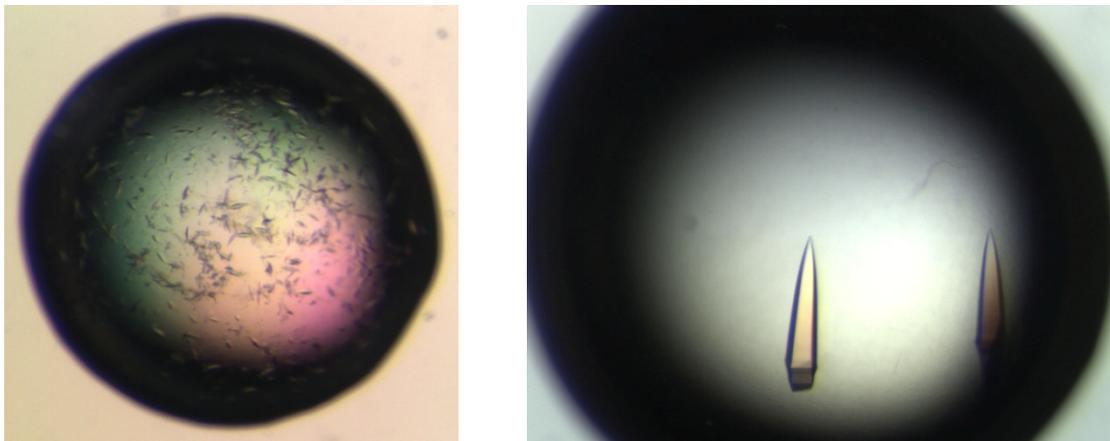


Abbildung 42. Links: Photographie der Kristallisation des ersten Verlängerungsschrittes. Rechts: Photographie der Kristallisation des zweiten Verlängerungsschrittes.

Zur Lagerung wurden die Kristalle für 5–10 Sekunden in die Reservoirlösung, die zusätzlich 14% D(-)-2,3-Butandiol enthielt, getaucht und sofort mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Mit dieser Methode weggefrorene Kristalle des Enzyms im Komplex mit Pt-GTG und dATP in der aktiven Tasche beugten die Röntgenstrahlung bis 2.5 Å (detaillierte Informationen über Datensammlung, Auswertung und Strukturverfeinerung sind in Kapitel 4.14 und 5.4 zu finden). Die Struktur wurde durch Kombination der experimentellen Pt-SAD-Phasen (SAD=single-wavelength anomalous dispersion) mit den Phasen, die durch den

molekularen Ersatz mit dem Apoenzym erhalten wurden, gelöst. Die Kristalle gehörten zur Raumgruppe $P4_12_12$ mit zwei Protein-DNA Komplexen in der Elementarzelle.

3.7. Kristallstruktur eines Cisplatin 1,3-d(GpTpG) Schadens in Komplex mit Pol η

Durch die Kristallisation von Pol η mit dem DNA-Konstrukt **GTG_2** und dATP in der aktiven Tasche konnte eine Struktur des Replikationsblockes erhalten werden. Die tertiäre Struktur des Proteins ähnelt dabei einer rechten Hand (Abbildung 43a), wie es auch von anderen Polymerasen wie dem großen (Klenow) Fragment der DNA Polymerase I^[163] oder der RNA Polymerase aus dem Poliovirus^[164] bekannt ist. Die Struktur zeigt ein weiteres Strukturelement, die Polymerase-assoziierte Domäne (PAD).^[140] Diese besteht aus vier β -Faltblättern und zwei α -Helices. Handfläche, Daumen und PAD bilden die DNA-bindende Region aus, wobei sich die aktive Tasche in der Handflächen-Domäne befindet. Das Templat-Primer Konstrukt liegt so in der Polymerase, dass das 3'-Ende des Primers direkt gegenüber dem dATP sitzt. Ein Beispiel für die Elektronendichte des Pt-GTG Schadens ist in Abbildung 43 zu sehen.

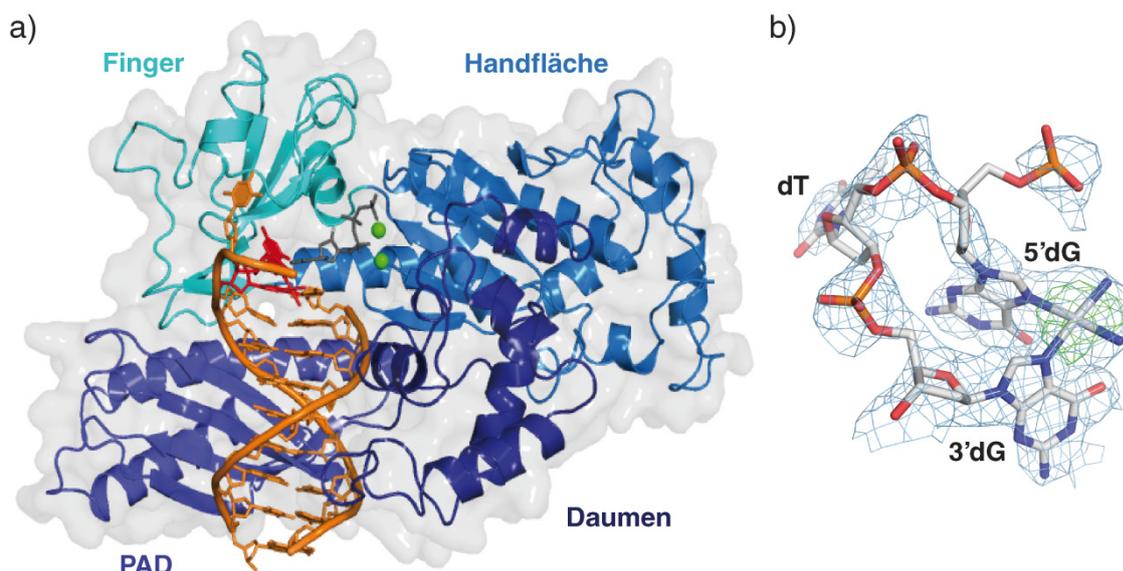


Abbildung 43. Kristallstruktur des DNA Templat-Primer Duplexes mit dem Cisplatin 1,3-d(GpTpG) Schaden in Komplex mit Pol η . a) Schematische Repräsentation der gesamten Struktur mit Protein (Komplex B) dargestellt als Bändermodell. Der Schaden ist als rotes und das dATP als graues Stabmodell gezeigt. Die zwei für die Katalyse notwendigen Ca^{2+} -Ionen sind als grüne Sphären dargestellt. b) Elektronendichtekarte ($F_{\text{obs}} - DF_{\text{calcd}}$) für den Pt-GTG Schaden (Komplex B), konturiert mit 2σ (blau) nach „simulated annealing“-Verfeinerung (ohne Koordinaten des Cisplatin-Schadens); überlagert (grün) ist die anomale Differenz-Fourier-Elektronendichtekarte des Platin-Atoms (3σ).

In der Elementarzelle des Kristalls befinden sich zwei Komplexe A und B, die den DNA-

3. Ergebnisse und Diskussion

Primer-Komplex in unterschiedlichen Konformationen zeigen (Abbildung 44). In Komplex A befindet sich Methionin 74 zwischen den Nukleotiden –2 (dC; Templat-Strang) und –1 (dT) des Pt-GTG-Schadens. In Komplex B ist der Primer-Templat Komplex um eine Nukleotid in die aktive Tasche der Polymerase gedreht. Dadurch ist dieses Methionin zwischen dem 5'dG des Pt-GTG Schadens und der –1-Base (dT) positioniert (Abbildung 45b). Solche Schwefel-Aren-Wechselwirkungen stellen einen beträchtlichen Anteil an stabilisierender Dispersionsenergie bereit.^[165] Die konservierte Aminosäure Arg73, die durch die Stabilisierung des hereinkommenden dNTPs für das Überlesen eines DNA-Schadens essenziell ist,^[139] stapelt in Abwesenheit einer Templatbase über dem hereinkommenden dATP. Dadurch wird das dATP für den nukleophilen Angriff durch die 3'OH-Gruppe des Primers fixiert (Abbildung 45b).

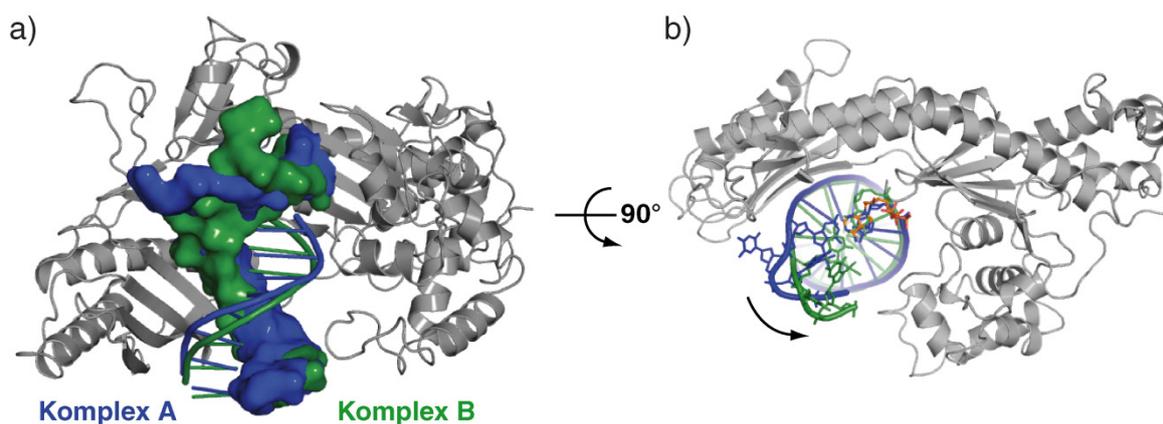


Abbildung 44. Überlagerung von Komplex A und B. a) Drehung der DNA um etwa ein Nukleotid in die aktive Tasche; Komplex A blau, Komplex B grün. b) Ansicht um 90° gedreht. Zur Veranschaulichung wurde die Finger-Domäne in der Bänderdarstellung entfernt.

In beiden Komplexen A und B bildet das ddC-3'-Primerende mit dem 3'dG des Pt-GTG-Schadens ein ideales Watson-Crick-Basenpaar (Abbildung 45b). Die perfekte Watson-Crick-Basenpaarung erklärt den effektiven und korrekten Einbau von dCTP gegenüberliegend zum 3'dG-Teil von Pt-GTG während des ersten Replikationsschrittes (Abbildung 41a). Die Pt-GTG-Verknüpfung verursacht eine starke Verformung der DNA, da das Platinatom die zwei Guanine mit einem internen Winkel von ca. 70° fixiert (Abbildung 43b). Das Hauptmerkmal der hier beschriebenen Struktur ist das zentrale Thymin des Trinukleotid-Schadens. Es befindet sich nicht zwischen den beiden Guaninen, sondern ist komplett aus dem DNA-Doppelstrang herausgedreht (Abbildung 43b).^[50] Dies stimmt mit der von *Reedijk* beschriebenen DNA-Struktur, die mittels NMR-Spektroskopie gelöst wurde, überein (siehe

Kapitel 1.3.3).^[50] In Komplex A konnte der Base des zentralen Thymins keine Elektronendichte zugewiesen werden. Eine hohe Flexibilität der Base ist somit anzunehmen. In Komplex B dagegen wird das zentrale Thymin durch Wasserstoffbrückenbindungen zu Glutaminsäure 79 stabilisiert (Abbildung 45 und Abbildung 46). Durch den herausgedrehten Zustand des Thymins kann Pol η folglich nur gegenüber dem 5'dG des Schadens replizieren. Tatsächlich beobachten wir in der Kristallstruktur eine Wechselwirkung zwischen dem hereinkommenden dATP mit dem 5'dG-Teil des Schadens.

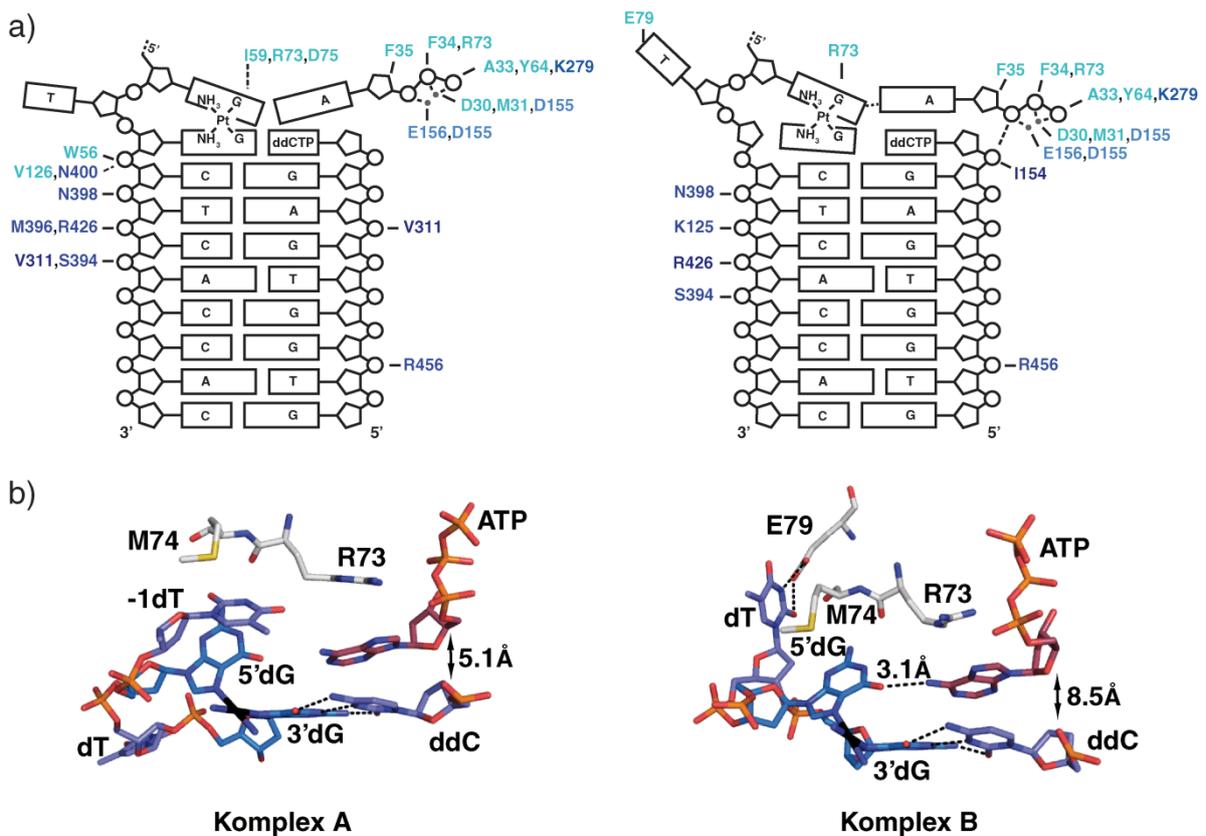


Abbildung 45. Detaillierte Repräsentation der Komplexe A und B. a) Schematische Darstellung von direkten (durchgezogene Linien) und Wasser-verbundenen (gepunktete Linien) Kontakten. In Komplex A werden Wasser-verbundene Kontakte zwischen den Hauptkettenatomen von Arg73, Asp75 und Ile59 und dem N2 des 5'dG des Schadens ausgebildet. In Komplex B werden diese Kontakte durch direkte Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Carbonylsauerstoff von R73 und dem N2 des 5'dGs ersetzt. Es wurde das selbe Farbschema wie in Abbildung 43 benutzt. b) Detaillierte Ansicht der aktiven Taschen. Das 3'dG des Schadens bildet ein Watson-Crick-Basenpaar mit dem ddC des Primers aus, wobei Arg73 über dem dATP stackt. In Komplex B ist die DNA weiter in die aktive Tasche des Enzyms rotiert, wobei Glu79 Wasserstoffbrücken zum zentralen Thymin des Schadens ausbildet. Das 5'dG bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem dATP aus. Dadurch wird die Entfernung zwischen der fiktiven Primer-Hydroxylgruppe und dem Nukleotid-Triphosphat in der aktiven Tasche von 5.1 Å auf 8.5 Å vergrößert.

In Kapitel 3.5 wurde mittels Primerverlängerungsstudien gezeigt, dass Pol η alleine nicht fähig ist *in vitro* über den 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Schaden zu verlängern. Tatsächlich erkennt man in Komplex B der Struktur, dass das herausgedrehte zentrale dT des Pt-GTG Schadens eine weitere Bewegung des Enzyms entlang des Templat-Primer-Doppelstrangs verhindert.

3. Ergebnisse und Diskussion

Dies erklärt, warum Pol η nach dem zweiten Verlängerungsschritt stoppt. Abbildung 46a zeigt die Blockade im Detail mit dem Protein des Komplexes als graue Oberfläche. Das zentrale dT des Pt-GTG-Schadens ist direkt vor dem Protein positioniert, tritt in sterische Wechselwirkung mit Methionin 74 und verhindert somit jegliche weitere Bewegung der Polymerase entlang des DNA-Strangs.

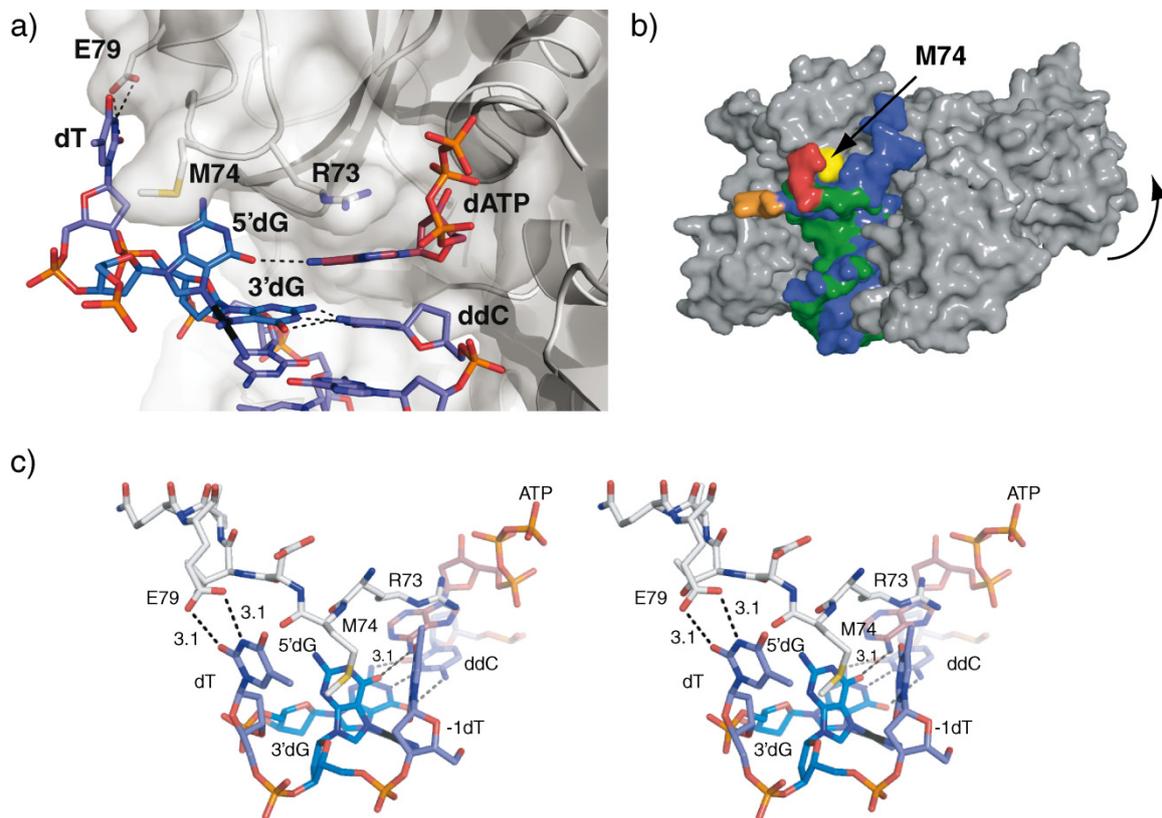


Abbildung 46. Inhibition der Translesion-Synthese des Cisplatin 1,3-d(GpTpG) Adduktes durch sterische Hinderung. a) Großansicht der aktiven Tasche in Komplex B, überlagert mit der semitransparenten Oberfläche des Proteins. Met74, das sich zwischen dem zentralen dT und dem 5'dG des Schadens befindet, verhindert eine weitere Bewegung der Polymerase entlang des DNA-Templatstrangs. b) Oberflächenansicht der Überlagerung der beiden Komplexe in der asymmetrischen Einheit des Kristalls. Die DNA von Komplex A ist in grün, die DNA von Komplex B in blau dargestellt. Das zentrale Thymin des Schadens ist in orange (Komplex A) und rot (Komplex B) dargestellt. Die Bewegung von Pol η entlang der DNA während der Verlängerung ist durch den Pfeil gekennzeichnet. Methionin 74 ist in gelb hervorgehoben. c) Stereoansicht der unmittelbaren Umgebung des Schadens in Komplex B.

Die Kristallstruktur erklärt ebenfalls die Ineffizienz des zweiten Verlängerungsschrittes (siehe Abbildung 41b). Für eine effiziente Katalyse dreht Pol η den Templat-Primer-Komplex in die aktive Tasche. In dieser Konformation ist der Primerstrang für den Angriff am Triphosphat korrekt positioniert. Die Triebkraft für die Drehung ist die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen dem hereinkommenden Triphosphat und der Templatbase. Die Drehbewegung in die aktive Tasche ist zudem nötig, weil dadurch der Abstand zwischen der 3'OH-Gruppe am Primer-Ende und dem α -Phosphat des dNTP verringert wird.^[139] In der hier beschriebenen

Struktur wird die Drehung des Primer-Templat Komplexes in die aktive Tasche durch den Übergang von Komplex A in Komplex B verdeutlicht. Tatsächlich ist in Komplex A im Vergleich zu Komplex B eine Wasserstoffbrücke (3.1 Å) zwischen dem NH₂(6) des hereinkommenden dATP und dem O(6) des 5'dG des Schadens vorhanden (Abbildung 45b). Jedoch ist der Abstand zwischen der modellierten 3'OH-Gruppe am Primer-Ende und dem α -Phosphat des dNTP nicht verringert, sondern von 5.1 Å (Komplex A) auf 8.5 Å (Komplex B) vergrößert. Der vergrößerte Abstand lässt sich durch die starke Verzerrung der DNA durch den Cisplatin-Schaden erklären. Ein Abstand von 8.5 Å ist definitiv zu weit für einen effizienten Nukleotidyltransfer. Zum Vergleich: In den „High-Fidelity“-Polymerasen des T7-Phagen^[166] und der Polymerase I von *Bacillus stearotherophilus*^[167] beträgt der Abstand zwischen dem α -Phosphat und dem modellierten 3'OH des Primers ungefähr 3.5 Å.

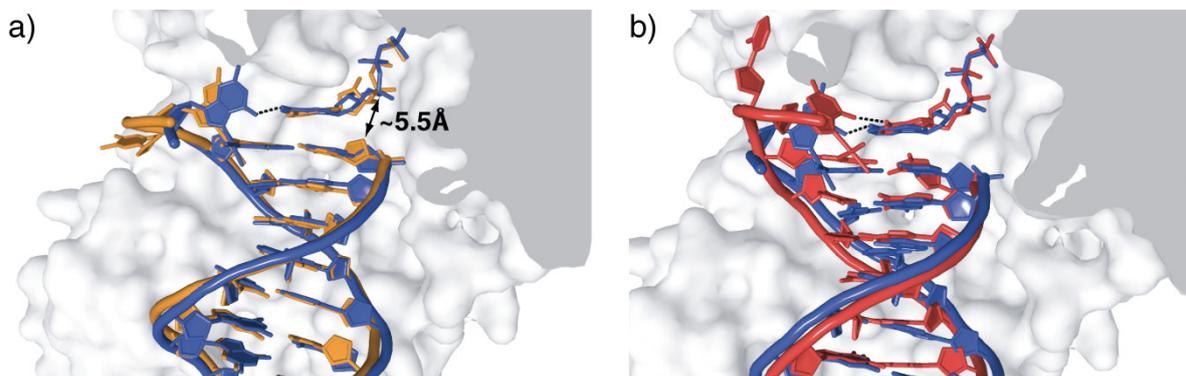


Abbildung 47. Vergleich der Strukturen von Pol η mit 1,2-d(GpG) und 1,3-d(GpTpG) Cisplatin geschädigter DNA. a) Überlagerung von Komplex A aus der Struktur von Pol η mit 1,3-d(GpTpG) Cisplatin-Schaden (orange) mit dem 5'dG Verlängerungskomplex aus der Struktur von Pol η mit 1,2-d(GpG) Cisplatin-Schaden (blau; PDB-Zugangscode: 2R8K). b) Überlagerung von Komplex B aus der Struktur von Pol η mit 1,3-d(GpTpG) Cisplatin-Schaden (rot) mit dem 5'dG Verlängerungskomplex aus der Struktur von Pol η mit 1,2-d(GpG) Cisplatin-Schaden (blau).

Ein Vergleich der Strukturen von Pol η in Komplex mit 1,2-d(GpG) Cisplatin geschädigter DNA und der vorliegenden Struktur verdeutlicht die konformellen Unterschiede während der Primer-Templat Komplex in die aktive Tasche gedreht wird (Abbildung 47). In Komplex A der Pol η Struktur mit 1,3-d(GpTpG) Cisplatin geschädigter DNA wird auf Grund der stärker Helix-verzerrenden Natur des Schadens keine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem 5'dG des Schadens und dem dATP in der aktiven Tasche ausgebildet. Im Gegensatz dazu wird in der Pol η Struktur mit 1,2-d(GpG) Cisplatin Schaden eine Wasserstoffbrückenbindung ausgebildet. Die Distanz zwischen der modellieren 3'OH Primer Gruppe und dem α -Phosphat des dATP beträgt in beiden Strukturen ~5.5 Å (Abbildung 47a). In Komplex B bildet sich durch die Rotation des DNA-Duplexes in die aktive Tasche des Enzyms eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem 5'dG des Schadens und dem dATP aus. Dadurch

3. Ergebnisse und Diskussion

bewegt sich aber die 3'OH Gruppe des Primers vom dATP in der aktiven Tasche weg (Abstand $\sim 8.5 \text{ \AA}$). Genau das Gegenteil ist in der Struktur von Pol η mit 1,2-d(GpG) Cisplatin Schaden zu sehen: dort verringert sich bei der Rotation des DNA-Duplexes in die aktive Tasche der Abstand zwischen Primer OH-Gruppe und dATP.

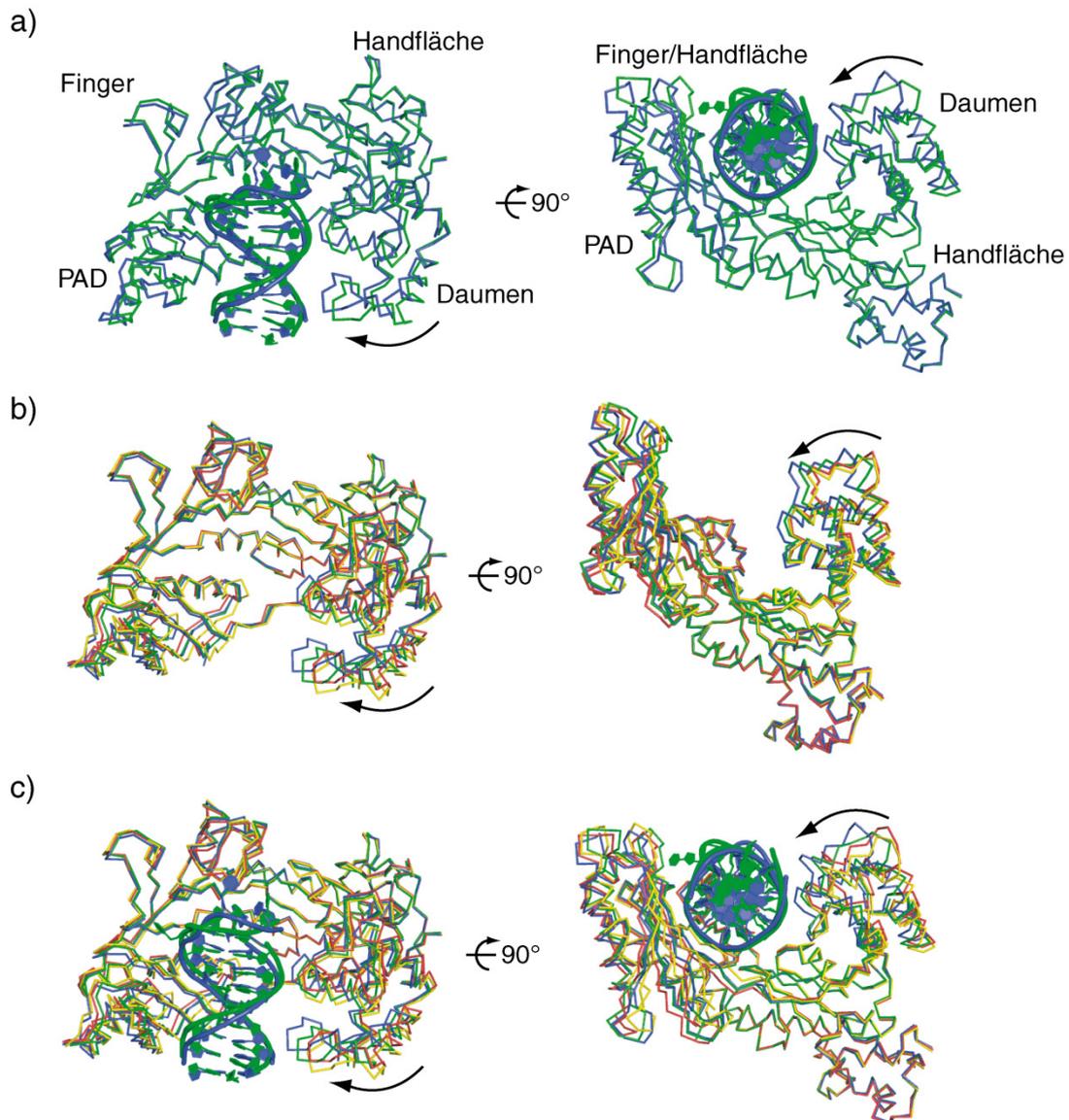


Abbildung 48. Änderungen der Konformation von Pol η nach der Bindung an die geschädigte DNA. a) Bänderdarstellung der Überlagerung von Komplex A (grün) und Komplex B (blau). Die Darstellung zeigt geringfügige strukturelle Änderungen in der Daumen- und PAD-Domäne. b,c) Überlagerung der Strukturen von Pol η als Apo-Enzym (Chain A in gelb, Chain B in rot; PDB-Zugangscode: 1JIH) und gebunden an Cisplatin 1,3-d(GpTpG) modifizierte DNA (Komplex A in grün, Komplex B in blau). Abbildung 48b zeigt die Überlagerung ohne DNA, während Abbildung 48c die DNA als *Cartoon* darstellt. Die Aminosäuren 1–295 wurden als Referenzrahmen für alle strukturellen Überlagerungen verwendet.

Bei der Überlagerung von Komplex A mit Komplex B erkennt man – neben der Rotation des Primer-Templat Konstruktes in die aktive Tasche – eine strukturelle Änderung in der

Daumen- und PAD-Domäne des Enzyms. Abbildung 48 zeigt, dass sich diese Domänen während der Konformationsänderung von Komplex A zu Komplex B geringfügig schließen (siehe auch Abbildung 51, Abschnitt 5.5). Strukturelle Änderungen in der Finger- und Handflächen-Domäne werden dabei nicht beobachtet. Ein komplettes Schließen der Polymerase wurde nicht beobachtet, ähnlich zum Komplex von Pol η mit dem 1,2-d(GpG) Cisplatin Schaden.^[139, 162] Auch wenn Kristallgitterkontakte ein Schließen des Enzyms verhindern sollten, wird dadurch die strukturelle Umgebung in der Nähe des 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Schaden nicht grundlegend beeinflusst. Die vorliegende Struktur lässt also eine Aussage über den katalytischen Prozesses zu, da die aktive Tasche in einer konstitutiv aktiven Konformation vorliegt. Wurde Pol η mit kürzeren DNA-Templat-Primer Konstrukten kristallisiert, erhielt man eine andere Kristallform. In dieser zeigte das Enzym eine vergleichbare offene Struktur, die DNA war aber ungeordnet. Dies unterstützt die Möglichkeit, dass Pol η ihre aktive Konformation auch ohne DNA und Nukleotid aufrecht erhalten kann.

Die vorliegende Struktur konnte auf molekularer Ebene den Replikationsstopp von Pol η durch den 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Schaden aufklären. Es konnte die von *Reedijk* beschriebene, herausgedrehte Natur des zentralen Thymins des Schadens kristallographisch bestätigt werden. Der herausgedrehte Zustand des Thymins ist zugleich auch die Erklärung für das Unterbrechen der Replikation, da dies zu einer Kollision mit der Polymerase führt. In den zuvor beschriebenen *in vivo* Zellstudien konnte gezeigt werden, dass dieser stark Helix-verzerrende Schaden dennoch überlesen werden kann. Dies geschieht vor allem im Zusammenspiel mit mehreren *low-fidelity* Polymerasen, darunter Pol η . Die Daten unterstützen das Konzept, dass Pol η eine wichtige Rolle in TLS-basierter Cisplatin-Resistenz spielt. Die Ergebnisse zeigen zudem, dass neue Cisplatin-basierte Therapeutika, welche einen höheren Prozentsatz an 1,3-d(GpNpG) Schäden hervorrufen, die Entstehung von auf TLS basierenden Resistenzen nicht umgehen können. Ein interessanter Ansatz dieses Problem zu minimieren ist die Entwicklung von selektiven TLS-Polymerase Inhibitoren, die die strukturellen Ähnlichkeiten unter den Y-Familie Polymerasen ausnutzen.^[168]

4. Material und Methoden

4.1. Chemikalien und Lösungsmittel

Lösungsmittel und Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, in den kommerziell erhältlichen Qualitäten puriss., p. a. oder purum eingesetzt und von den Firmen *Fluka*, *Sigma-Aldrich*, *Acros* oder *Merck* bezogen.

4.2. Enzyme

Enzym	Organismus	Firma	Eigenschaften
Nuclease P1	<i>Penicilium citrinum</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>	Spaltet Bindung zwischen 3'-Hydroxy- und der 5'-Phosphatgruppe von ssDNA, wirkt auch als 3'-Phosphomonoesterase und liefert somit 5'-Mononukleotide ^[169]
Nuclease S1	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Roche</i>	Endo- und Exonuklease mit 3'-Phosphomonoesterase-Aktivität, liefert 5'-phosphorylierte Mono- und Oligonukleotide ^[170]
Snake Venom Phosphodiesterase I	<i>Crotalus adamanteus venom</i>	<i>USB</i>	Spaltet 5'-Mononukleotide von 3'-hydroxyterminierter DNA ^[171]
Antarctic Phosphatase	<i>Escherichia coli</i> mit TAB5 AP Gen auf Plasmid pEGTAB7-4	<i>New England Biolabs</i>	Entfernt 5'-Phosphatgruppen von DNA und dNTPs u.a. ^[172]

Tabelle 5. Verwendete Enzyme und ihre relevanten Eigenschaften im kurzen Überblick.

4.3. Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Äkta Basic Chromatographie System	GE, München
Äkta Purifier Chromatographie System	GE, München
Alliance HPLC System	Waters, Eschborn
Autoklav Vakulab S3000	Systec, Gießen
BioPhotometer 6131	Eppendorf, Hamburg
Breeze HPLC System	Waters, Eschborn
CE P/ACE MDQ DNA System	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Einkanal-Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Elektrotransformator, Micropuls	Biorad, München
Expedite 8900 Nucleic Acid Synthesis System	PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA
Feinwaage AT261 Delta Range	Mettler Toledo, Gießen
Geldokumentationsgerät LAS-3000	Raytest, Straubenhardt
Gelkammer Mini Protean 3 Cell	Biorad, München
Gelkammer Protean II xi Cell	Biorad, München
Hochdruckhomogenisator EmulsiFlex-C5	Avestin, Mannheim
Inkubator 44R	New Brunswick, Nürtingen
Inkubator IS	MS Laborgeräte, Wiesloch
LaChrom HPLC System	Merck-Hitachi, Darmstadt
Lyophilie Alpha 2-4 LD plus	Christ, Osterode am Harz
MALDI-TOF Autoflex II-Spektrometer	Bruker Daltonics, Bremen
Mastercycler Personal	Eppendorf, München
NanoDrop UV-Spektrometer ND-1000	Peqlab, Erlangen
pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Gießen
Power Supply	Biorad, München
Sorvall Zentrifuge, Evolution RC	Kendro, Dreieich
Speedvac Cryostat CT 04-50 SR	Christ, Osterode am Harz
Speedvac RVC 2-33 IR	Christ, Osterode am Harz
Speedvac Plus	Thermo Life Sciences, Dreieich

4. Material und Methoden

Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschränke Vip Series –86 °C	Sanyo, Bad Nenndorf
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Transferpette [®] S	Brand, Wertheim
Ultraschallbad Bandelin Sonorex Super RK 510H	Bandelin, Berlin
Vortexer	VWR, Darmstadt
Waters Millipore System	Millipore, Schwalbach
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge EBA 12	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen

Tabelle 6. Verwendete Geräte.

4.4. Verwendete Puffer, Medien, Lösungen, Antibiotika und Induktoren

Puffer, Lösungen, Medien etc. wurden alle, wenn nicht anders angegeben, mit ddH₂O hergestellt, welches über ein *Millipore System* erhalten wurde. Die pH-Wert-Einstellung erfolgte durch Zugabe von NaOH_(aq) oder HCl_(aq).

4.4.1. Puffer

Primerverlängerungs-Puffer für Pol η (NEBuffer II, 10x):

500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT; pH 7.9

TBE-Auftragspuffer (2x):

12% (v/v) Ficoll, 0.01% (w/v) Bromophenol-blau, 0.02% (w/v) Xylencyanol FF, 7 M Harnstoff in *TBE-Puffer*

TBE-Puffer (10x):

89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 20 mM EDTA; pH 8.0

Verdaupuffer 1 (10x):

1 M NH₄OAc, 0.1 M MgCl₂, 0.1 M CaCl₂, 1 mM ZnSO₄; pH 5.5

Verdaupuffer 2:

Puffer A: 300 mM NH₄OAc, 100 mM CaCl₂, 1 mM ZnSO₄; pH 5.7

Puffer B: 500 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0

Ionenaustausch-HPLC Puffer A und B:

Puffer A: 25 mM NH₄OAc, 5% (v/v) MeCN

Puffer B: 25 mM NH₄OAc, 5% (v/v) MeCN, 1 M NaCl

Umkehrphasen-HPLC Puffer A und B:

Puffer A: 0.1 M NH₄OAc

Puffer B: 0.1 M NH₄OAc in 80% MeCN

Verdau-HPLC Puffer A und B:

Puffer A: 2 mM NH₄CHOO

Puffer B: 2 mM NH₄CHOO in 80% MeCN

Heparin Puffer A und B:

50 mM Tris, 1 mM EDTA, 5 mM DTT and 5% (v/v) Glycerin; pH 7.5

Puffer A: 100 mM NaCl

Puffer B: 800 mM NaCl

Strep-tag Elutionspuffer A und B:

Puffer A: 100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA; pH 8.0

Puffer B: 0.5 mg/mL D-Desthiobiotin in Puffer A

SDS-Auftragspuffer:

62.5 mM Tris, 4% (w/v) SDS, 20% (w/v) Glycerin, 5% (w/v) β-Mercaptoethanol; pH 6.8

Trenngel-Puffer:

1.5 M Tris, pH 8.8

Sammelgel-Puffer:

0.5 M Tris, pH 6.8

SDS-Laufpuffer (10x):

250 mM Tris, 1.92 M Glycin, 1% (w/v) SDS

4. Material und Methoden

Kristallisationspuffer Pol η:

20 mM Tris, 50 mM KCl, 10 mM β-Mercaptoethanol, 10% Glycerin; pH 7.6

4.4.2. Medien

LB-Medium:

1% (w/v) Pepton, 0.5% (w/v) Hefe-Extrakt, 1% (w/v) NaCl; pH 7.5

4.4.3. Lösungen

MALDI Matrix:

3-Hydroxypicolinsäure (50 mg), 15-Krone-5 (10 µL), Diammoniumhydrogencitrat (10 mg) in ddH₂O (1 mL)

Rotiphorese Sequenziergel Konzentrat:

25% (w/v) Acrylamid, 1.32% (w/v) Methylenbisacrylamid, 50% (w/v) Harnstoff

Rotiphorese Gel 30:

30% (w/v) Acrylamid, 0.8% (w/v) Methylenbisacrylamid

APS-Lösung (10%):

10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat

SDS-Lösung (10%):

10% (w/v) SDS

Färbelösung:

0.25% (v/v) Coomassie Brilliant Blue R 250, 9.2% (v/v) Essigsäure, 45.4% (v/v) Ethanol

Entfärbelösung:

20% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure

4.4.4. Antibiotika und Induktoren

Anhydrotetracyclin 2 mg/mL in Ethanol

Carbenicillin 100 mg/mL in ddH₂O

Chloramphenicol 34 mg/mL in Ethanol

4.5. Darstellung, Aufreinigung und Charakterisierung von 1,2-d(GpG)- und 1,3-d(GpTpG) Cisplatin-Schäden

Die Darstellung von 1,2-d(GpG) und 1,3-d(GpTpG) Cisplatin-Schäden erfolgte in modifizierter Weise analog zu den Arbeiten von *Lippard und Mitarbeitern*.^[173]

Für die Überführung des Cisplatins (*cis*-Diammindichloroplatin(II)) in die reaktivere Spezies *cis*-Diammindiaquaplatin(II) wurde Cisplatin (1.5 mg, 5.0 μ mol, 1.0 eq.) zusammen mit AgNO_3 (20.0 μ L, 0.5 M, 2.0 eq.) in ddH₂O (980.0 μ L) für 14 h in einem *Eppendorf Thermomixer* bei 18 °C und 1000 rpm im Dunklen inkubiert. Der AgCl-Niederschlag wurde anschließend mit einer *Eppendorf MiniSpin* Zentrifuge quantitativ abgetrennt (20 min, 13400 rpm). In einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde jeweils ca. 9/10 des Überstandes abgenommen und für weitere 20 min bei 13400 rpm zentrifugiert. Danach wurde das entsprechende Volumen für die Platinierungsreaktion direkt vom Überstand abgenommen.

Die zu platinierende Einzelstrang-DNA (100 nmol in 100 μ L ddH₂O, 1.0 eq.) wurde mit einer NaClO_4 -Lösung (840.0 μ L, 0.1 M) versetzt, gevortext und kurz abzentrifugiert. Die aktivierte Cisplatin-Lösung (60.0 μ L, 5.0 mM, 3.0 eq.) wurde zur gelösten DNA gegeben und bei 37 °C und 1000 rpm in einem *Eppendorf Thermomixer* für 4 h inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde bis zu seiner weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert. Der jeweilige DNA-Strang enthielt entweder eine spezifische Stelle benachbarter Guanosine oder eine spezifische GTG-Sequenz für die Platinierungsreaktion.

4.5.1. Auftrennung der platinieren Oligonukleotide

Die spezifisch platinieren DNA-Stränge wurden über eine Auftrennung des Reaktionsansatzes durch HPL-Chromatographie mit Hilfe einer Umkehrphasen-Chromatographiesäule bzw. einer Anionen-Austausch-Säule erhalten. Alle Angaben zur verwendeten Säule, zu den HPLC-Geräten und Gradienten sind in Abschnitt 4.8 aufgeführt. Die Zusammensetzungen der verwendeten Ionenaustausch-HPLC Puffer A und B sind unter Punkt 4.4.1 aufgelistet. Vor der Probeninjektion auf die HPLC-Säule wurden alle Proben durch Spritzenfilteraufsätze (0.2 μ m *GHP Acrodisc 13*) gefiltert.

Die Fraktionen mit den platinieren Oligonukleotiden wurden über eine Speedvac eingengt und anschließend lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 1 mL ddH₂O aufgenommen und über *SepPak-C18 Cartridges* von *Waters* entsalzt. Hierzu wurde die Kartusche mit 10 mL Acetonitril (HPLC grade) konditioniert, mit 20 mL ddH₂O gewaschen und mit ca. 40 mL Luftvolumen getrocknet. Die DNA-Lösung wurde langsam mit einem Fluss von ca. 1 mL/min

auf die Kartusche aufgetragen. Das Salz wurde mit 5 mL ddH₂O von der Säule gewaschen und die DNA zum Schluss mit 5 mL 80%igem Acetonitril/ddH₂O eluiert. Die DNA-Lösung wurde wieder über eine Speedvac eingeengt und anschließend lyophilisiert. Der gereinigte Rückstand des platinieren Oligonukleotides wurde in 200 µL ddH₂O aufgenommen und bis zu seiner Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Konzentrationsbestimmung der Oligonukleotid-Präparation erfolgte durch ein *NanoDrop Spectrophotometer ND-1000* (siehe 4.7). Die Reinheit der Präparation wurde durch analytische Anionen-Austausch-HPLC (siehe 4.8, Ionenaustausch-HPLC Puffer A und B siehe 4.4.1) oder Kapillarzonenelektrophorese (siehe 4.9) überprüft.

Die spezifische Platinierung der DNA-Stränge wurde durch MALDI-TOF, ESI-MS und enzymatischen Verdau (siehe 4.5.2) nachgewiesen.

4.5.2. Charakterisierung durch enzymatischen Verdau

Um sicherzustellen, dass es sich bei den erzeugten DNA-Schäden um die gewünschten Cisplatin-Schäden handelt, wurde die gereinigte DNA enzymatisch verdaut und chromatographisch über HPLC (Angaben zu verwendeter Anlage, Säule und verwendetem Gradienten siehe 4.8, Verdau-HPLC Puffer A und B siehe 4.4.1) und massenspektrometrisch über HPLC-MS/MS (siehe 4.10.2) analysiert.

Für die 1,2-d(GpG) und 1,3-d(GpTpG) Cisplatin-Schäden mussten unterschiedliche Verdau-Protokolle entwickelt werden. Für 1,2-d(GpG)-Schäden hat sich ein modifiziertes Protokoll nach *Pillaire et al.*^[151] als geeignet erwiesen, im Folgenden Verdauprotokoll 1 genannt. Für 1,3-d(GpTpG)-Schäden wurde eine Vorschrift mit der Bezeichnung Verdauprotokoll 2 entwickelt. Die Angaben zu den verwendeten Verdau puffern sind in Abschnitt 4.4.1 aufgelistet. Weitere Informationen zu den verwendeten Enzymen finden sich unter Punkt 4.2.

4.5.2.1. Verdauprotokoll 1 – 1,2-d(GpG)-Cisplatin-Schäden

Oligonukleotide mit 1,2-d(GpG)-Cisplatin-Schäden wurden nach dem Pipettierschema in Tabelle 7 verdaut. Die Reagenzien wurden in der beschriebenen Reihenfolge nacheinander direkt in die Reaktionslösung pipettiert und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren durchmischt. Nach der Zugabe von Nuclease P1 wurde der Ansatz für 1 bzw. 2 h (je nach Länge des DNA-Stranges) bei 37 °C in einem *Eppendorf Thermomixer* inkubiert. Anschließend wurde die Antarctic Phosphatase zum Reaktionsansatz hinzugegeben und für weitere 1 bzw. 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Ansätze zur Entfernung aller Proteine in einer *Eppendorf MiniSpin* Zentrifuge bei 13400 rpm für 10 min abzentrifugiert,

der Überstand für die Analytik abgenommen und bis zu seiner Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

Volumen [μL]	Reagenz	Reaktionsansatz
x	DNA in ddH ₂ O	1 nmol
+10.0	Verdaupuffer 1 (10x)	
+(87.7-x)	ddH ₂ O	
+2.3	Nuclease P1 (2.2 U/ μL)	5 U
+5.0	Antarctic Phosphatase (1 U/ μL)	5 U

Tabelle 7. Pipettierschema Verdauprotokoll 1 – 1,2-d(GpG)-Cisplatin-Schäden.

4.5.2.2. Verdauprotokoll 2 – 1,3-d(GpTpG)-Cisplatin-Schäden

Oligonukleotide mit 1,3-d(GpTpG)-Cisplatin-Schäden wurden nach dem Pipettierschema in Tab. 5.13 verdaut. Nach der Zugabe von Calf Spleen Phosphodiesterase II wurde der Ansatz für 3 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem *Eppendorf Thermomixer* inkubiert. Anschließend wurde Puffer B, *Antarctic Phosphatase* und *Snake Venom Phosphodiesterase I* zum Reaktionsansatz hinzugegeben und für weitere 3 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die generelle Vorgehensweise und die weitere Aufarbeitung entsprechen den Angaben in Verdauprotokoll 1 (siehe 5.2.2.1).

Volumen [μL]	Reagenz	Reaktionsansatz
100	DNA in ddH ₂ O	1 nmol
+10.0	Verdaupuffer 2 A	
+2.0	Nuclease S1 (20 U/ μL)	40 U
+12.0	Verdaupuffer 2 B	
+10.0	Antarctic Phosphatase (1 U/ μL)	10 U
+2.0	Snake Venom Phosphodiesterase I (0.1 U/ μL)	0.2 U

Tabelle 8. Pipettierschema Verdauprotokoll 2 – 1,3-d(GpTpG)-Cisplatin-Schäden.

4.6. Festphasen-DNA-Synthese

Oligonukleotidsynthesen wurde auf einem *Expedite 8900 Nucleic Acid Synthesis System* der Firma *PerSeptive Biosystems* durchgeführt. Für die reverse DNA-Festphasensynthese wurden die reversen Phosphoramidite (5'-Cyanoethyl- und 3'-DMT-Schutzgruppe) sowie die kompatiblen 1 μmol -Kartuschen mit CPG-Trägermaterial von der Firma *Link Technologies*

Ltd. bezogen. Die verwendeten ddNTPs wurden von der Firma *Glen Research* bezogen. Als Lösungsmittel für die Phosphoramidite und den Aktivator wurde Acetonitril der Firma *Sigma-Aldrich* mit einem Wassergehalt von maximal 10 ppm verwendet.

4.6.1. Reverse DNA-Synthese von 2',3'-Dideoxy-Primer-Strängen

Für die Synthese von 2',3'-Dideoxy-Primer-Strängen wurde als Festphase wurde CPG-Granulat in 1 µmol-Polypropylenkartuschen verwendet. Für die Kupplung der reversen Phosphoramidite wurden die vom Gerätehersteller vorgeschlagenen Standardprotokolle in modifizierter Weise verwendet (siehe Kapitel 5.3.1, 5.3.2 und 5.3.3). Die für Kupplung, Deblocking, Capping und Oxidation verwendeten Lösungen waren wie folgt zusammengesetzt:

- Deblocking: 3% Dichloressigsäure (DCA) in Toluol
- Kupplung: 0.25 M Benzylthiotetrazol (BTT) in CH₃CN (<10 ppm Wasser) mit Molsieb (3 Å)
- Capping A: 20% Essigsäureanhydrid (Ac₂O) in 50% CH₃CN (HPLC *grade*) und 30% 2,6-Lutidin
- Capping B: 20% *N*-Methylimidazol in CH₃CN (HPLC *grade*)
- Oxidation: 25 mM Iod in 2,6-Lutidin/Acetonitril (HPLC *grade*)/ddH₂O im Verhältnis 0.6/6.5/3 (v/v)

Die Konzentration der Phosphoramidite betrug 0.1 M in Acetonitril (<10 ppm Wasser). Alle Phosphoramiditlösungen wurden über aktiviertem Molsieb (3 Å) getrocknet. Die Kupplungszeit für die reversen Phosphoramidite wurde auf 192 s (vgl. 96 s bei Standardphosphoramiditen) verlängert. Im Falle des 2',3'-Dideoxy-Phosphoramidits wurde die Kupplungszeit auf 10 min erhöht. Die Kupplung erfolgte in drei Schritten. Die reversen Phosphoramidit-Paare dG und dT sowie dA und dC unterscheiden sich in ihren Kupplungsschritten. Genaue Angaben kann man den in Kapitel 5.3 aufgeführten Syntheseprotokollen entnehmen.

Das CPG-Granulat wurde nach der DNA-Synthese im Vakuum getrocknet, die Oligonukleotide vom Trägermaterial unter basischen Bedingungen abgespalten und unter Verwendung eines Thermomixers bei 24 °C und 800 rpm für 16 h entschützt. Hierzu gab man zum Trägermaterial 1 mL einer 1:3 Mischung aus Ethanol und einer gesättigten wässrigen

NH₃-Lösung.

Das Trägermaterial wurde anschließend kurz abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Danach wurde das Trägermaterial mit zweimal 250 µL ddH₂O gewaschen. Die vereinigten Überstände wurden zur Entfernung von aufgewirbelten Trägerpartikeln nochmals abzentrifugiert und in ein neues *Reaktionsgefäß* überführt.

Die Lösungen wurden im Vakuum (*Speedvac*) bis zur Trockne eingengt und das rohe DNA-Pellet im Anschluss für die Aufreinigung per HPLC in 1 mL ddH₂O resolvatisiert. Die Angaben zur analytischen und präparativen Umkehrphasen-Trennung (RP) per HPLC bzgl. verwendeter Säulen und Gradienten finden sich im Abschnitt 4.8 und die Angaben zu den verwendeten RP-HPLC-Puffern A und B befinden sich in Abschnitt 4.4.1.

Die Fraktion des Hauptproduktes wurde anschließend in einer *Speedvac* eingengt und danach lyophilisiert. Die erhaltene DNA wurde in 0.5 mL ddH₂O resolvatisiert und bis zu ihrer Verwendung bei –20 °C gelagert. Für die Analyse durch MALDI-ToF wurde die DNA mit Hilfe einer 0.2 µm Membran von *Millipore* entsalzt.

4.7. Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Für die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde das *NanoDrop Spectrophotometer ND-1000* verwendet. Die Quantifizierbarkeit von Nukleinsäuren beruht auf folgender Beziehung:

$$1.0 A_{260}\text{-Einheit} = 50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1} \text{ dsDNA} = 33 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1} \text{ ssDNA} = 40 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1} \text{ RNA}$$

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beträgt nach Herstellerangabe ±2% bei Konzentrationen größer 100 ng/µL.

Das 260/280 nm Verhältnis gibt den Reinheitsgrad der DNA an. Bei sauberer DNA sollte der Quotient zwischen 1.8 und 2.0 liegen. Sind die Werte oberhalb oder unterhalb dieses Bereiches, liegen Verunreinigungen durch Proteine oder niedermolekulare Substanzen vor. Bei Messungen am NanoDrop Spectrophotometer wurde die Probe unverdünnt mit 1.5 µL in die Messöffnung überführt.

4.8. HPL-Chromatographie

Die Angaben zu den Pufferzusammensetzungen finden sich unter Punkt 4.4.1. Für die Herstellung der Puffer wurde Acetonitril (*HiPerSolv CHROMANORM for HPLC-GRADIENT GRADE*) von *VWR International* bezogen. Reines ddH₂O wurde über ein *Millipore System* erhalten.

Analytische und präparative Trennungen von platinieren Oligonukleotiden wurden an zwei verschiedenen *Merck-Hitachi*-Anlagen durchgeführt:

- analytisch: *D-7000* Interface Modul, *L-7100* Pumpe, *L-7200* Autosampler, *L-7400* UV-Detektor (260 nm), *L-7612* Lösungsmittel Entgaser.
- präparativ: *D-7000* Interface Modul, *L-7150* Pumpe, *Rheodyne P/N 77 25i* Einspritzventil, *L-7420* UV-Detektor (260 nm), *ERC-3415* Lösungsmittel Entgaser.

Des Weiteren wurden folgende Systeme der Firma *Waters* verwendet:

- analytisch: *Waters Alliance 2695* mit *Waters 2996* Photodiode Array Detector (200–600 nm) und *Waters 2695* Separations Modul
- präparativ: *Waters 1525* Binary HPLC Pump mit *Waters 2487* λ Dual Absorbance Detector.

Für die Auftrennungen wurden folgende Säulen verwendet:

- Für die analytischen Trennungen mittels Umkehrphasenchromatographie wurde die Säule *CC 250/4 Nucleosil 120-3 C18* der Firma *Macherey-Nagel* verwendet. Für die entsprechenden präparativen Umkehrphasen-Trennungen als Säule die *VP 250/10 Nucleosil 100-7 C18* der Firma *Macherey-Nagel* benutzt.
- Für die Anionentauscher-Chromatographie wurde für die analytischen Trennungen die Säule *DNAPac® PA-100 (4 x 250 mm)* der Firma *Dionex* verwendet. Die entsprechenden präparativen Anionentauscher-Trennungen wurden mittels der Säule *DNAPac® PA-100 (22 x 250 mm)* der Firma *Dionex* durchgeführt.

Für die analytische Trennung von enzymatischen Verdaus geschädigter Oligonukleotide wurde die bereits genannte *Waters*-Anlage verwendet. Als Säule wurde die *Uptisphere UP3HDO#15MS (150 x 2.0 mm)* von *Interchim* benutzt.

Die verwendeten Gradienten für die einzelnen Chromatographien sind in den nachfolgenden Tabellen aufgeführt.

Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Flussrate [mL/min]
0	100	0	0.5
2	90	10	
40	75	25	
42	0	100	
48	0	100	
50	100	0	
55	100	0	

Tabelle 9. Gradient zu analytischen Umkehrphasen-Trennungen (RP 0-10-25/40min/0.5).

Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Flussrate [mL/min]
0	100	0	5
2	90	10	
42	75	25	
45	0	100	
50	0	100	
52	100	0	
60	100	0	

Tabelle 10. Gradient zu präparativen Umkehrphasen-Trennungen (RP 0-10-25/40min/5mL).

Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Flussrate [mL/min]
0	100	0	1 bzw. 10
45	20	80	
48	0	100	
52	0	100	
55	100	0	
65	100	0	

Tabelle 11. Gradient zur analytischen und präparativen Trennung mittels Aniontauscher-Chromatographie (DIONEX 0-80/45min/1.0).

Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Flussrate [mL/min]
0	100	0	0.15
12	97	3	
60	70	60	
62	0	100	
80	0	100	
85	100	0	
95	100	0	

Tabelle 12. Gradient zur analytischen Trennung enzymatischer DNA-Verdaus.

4.9. Kapillarzonengelelektrophorese

Die Kapillarzonengelelektrophorese zur Reinheitskontrolle von Cisplatin-geschädigten Oligonukleotiden wurde mit einem *P/ACE MDQ DNA System* mit *UV Detector Module* der Firma *Beckman Coulter* durchgeführt. Die verwendete Glaskapillare mit Polyacrylamid-Innenbeschichtung von *Beckman Coulter* hatte einen Innendurchmesser von 100 µm, eine Gesamtlänge von 30 cm, die Länge vom Einlass bis zum Detektor betrug 21 cm. Es wurde ein lyophilisiertes 6%iges Polyacrylamidgel von *Beckman Coulter* verwendet, welches mit einem denaturierenden Gelpuffer (0.1 M Tris/Borat, 2mM EDTA, 7 M Harnstoff) rehydratisiert wurde. Als Elektrodenpuffer wurde derselbe Puffer verwendet. Der Elektrodenpuffer und benötigtes ddH₂O wurden vorher durch Spritzenfilteraufsätze (0.2 µm *GHP Acrodisc 13*) gefiltert und im Ultraschallbad entgast.

Die Kapillare wurde mit dem Gel bei 30 psi über einen Zeitraum von 15 min beladen. Die gemessenen DNA-Proben wurden vor der Analyse entsalzt (*SepPak-C18 Cartridges* von *Waters* oder 0.2 µm Membran von *Millipore*) und auf eine Konzentration von 3 µM gebracht. Das Gel und die Proben wurden durch Zentrifugation (2 min, 6000 rpm) vor den Messungen entgast.

Die Probeninjektion erfolgte elektrokinetisch mit einer Injektionsspannung von 10 kV für 2 s. Die Trennung wurde bei 11 kV, 25 °C und einem beidseitigen Druck von 20 psi über einen Zeitraum von 45 min durchgeführt. Oligonukleotide wurden durch Absorption bei 254 nm detektiert.

4.10. Massenspektrometrie

4.10.1. MALDI-ToF

MALDI-ToF-Massenspektrometrie zur Bestimmung der Masse von Oligonukleotiden wurde mit einem *Bruker Daltonics Autoflex II-Spektrometer* unter Verwendung einer Hydroxypicolinsäurematrix (Zusammensetzung siehe 4.4.3) durchgeführt. Als Target wurde das *MTP AnchorChipTM var/384* von *Bruker* verwendet. Die Vorbereitung der Messungen erfolgte immer auf die gleiche Weise. Zuerst wurden pro Probe 0.4 µL Matrix auf das Target aufgetragen. Nach Trocknung der Matrix wurden 0.4 µL der zu messenden salzfreien Oligonukleotid-Lösung unverdünnt auf die Matrix aufgetragen. Nach anschließender Trocknung bzw. Co-Kristallisation wurde die Messung durchgeführt. Alle Messungen erfolgten im negativen Modus.

4.10.2. HPLC-MS/MS

Die hochauflösenden Massen der Verdauprodukte und der DNA-Stränge wurden mit einem *Finnegan LTQ-FT* (Thermo Finnigan, Bremen) mit ESI-Quelle bzw. einer *LTQ Orbitrap XL* (Thermo Scientific) gemessen. Die Auflösung wurde auf 100000 bei $m/z = 400$ eingestellt. Der Massenbereich wurde auf bis zu 2000 Masseneinheiten eingestellt. Die Spannung der Spraykapillare war 3 kV und die Kapillartemperatur wurde auf 300 °C eingestellt. Die HPLC Anlage wurde mit einer Flussrate von 150 µL/min betrieben. Die Angaben zur HPLC-Säule und zum Gradienten, die bei der chromatographischen Trennung enzymatischer DNA-Verdaus verwendet wurden, finden sich unter Punkt 4.8, die Angaben zu Puffer A und B unter Punkt 4.4.1. Die Masse der detektierten Ionen wird in Abhängigkeit zur Ionenladung in der Form m/z und die relativen Signalintensitäten bezogen auf das größte Signal in % angegeben.

4.11. Mikrobiologische und protein-chemische Methoden

4.11.1. Transformation von elektrokompetenten *E. coli*

Zunächst wurde, pro Elektrotransformation, eine Elektroporationsküvette auf Eis vorgekühlt und 1 mL LB-Medium in einem 1.5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß auf 37 °C erwärmt. Die bei -80 °C gelagerten kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und im Anschluss 10 ng bis 100 ng DNA zugegeben, wobei ein Volumen von 2 µL nicht überschritten werden sollte. Der Ansatz wurde 1 min auf Eis inkubiert und in die Elektroporationsküvette überführt. Es wurde ein Spannungsimpuls von 2.5 kV angelegt und gleich darauf die Zellen in das

vorgewärmte Medium überführt und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 1 h bei 450 rpm und 37 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz bei 4000 rpm für 3 min abzentrifugiert, das Sediment auf einer entsprechenden Agarplatte ausgestrichen und über Nacht im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

4.11.2. Stammhaltung

Bakterienkulturen wurden als Glycerin-Stocks bei –80 °C bzw. auf Agarplatten aufbewahrt. Von den Platten wurden alle zwei bis drei Wochen überimpft. Flüssigkulturen für die Fortführung von Glycerin-Stocks wurden im Schüttelinkubator bei 37 °C und 200 rpm angezogen.

4.11.3. Induktion der Proteinexpression von Pol η

Von einer Agarplatte bzw. aus einem Glycerin-Stock wurde ein Klon entnommen und damit 60 mL LB-Medium mit 100 µL/mL Carbenicillin und 5µL/mL Chloramphenicol angeimpft. Die Übernackkultur wurde bis zum nächsten Morgen bei 37 °C und 200 rpm auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Das verwendete LB-Medium wurde im Verhältnis 1/100 mit einer ÜNK überimpft und weiterhin bei 37 °C geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 1.0 bis 1.2 wurde mit 200 ng/mL Anhydrotetracyclin der Promotor induziert; die Proteinexpression fand bei 16 °C. Nach 4–5 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation im SLA-3000 Rotor (10 min, 8000 rpm) sedimentiert und mittels Durchflusshomogenisator (Kapitel 5.2.7) aufgeschlossen oder bei –20 °C gelagert.

4.11.4. Aufschluss im Durchflusshomogenisator

Der Durchflusshomogenisator wurde zum Aufschluss großer Expressionsansätze von 5 L verwendet. Das Bakteriensediment der Proteinexpression wurde in kaltem Strep-Tag Elutions Puffer A mit einer Tablette *Protease Inhibitor Complete (Roche)* resuspendiert. Zum Kühlen des Systems wurde eiskalter Strep-Tag Elutions Puffer A durch den Homogenisator gepumpt. Der Homogenisator wurde aus der N2-Hausleitung gespeist und hatte einen Eingangsdruck von 200 psi, welcher sich in der Homogenisatorkammer während des Aufschlusses auf 10000–15000 psi erhöhte. Die Zellsuspension wurde in die Vorlagenkammer gegeben und durch Betätigung des Durchgangsventils durch den Homogenisator gepumpt. Dieser Vorgang wurde 2 bis 3 mal wiederholt. Der Zellaufschluss wurde in einem Sorvall SS-34 Rotor bei 18000 rpm für 30 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand für die weiteren Reinigungsschritte verwendet.

4.11.5. Proteinaufreinigung

Die hohe Bindungsselektivität des Strep-TagII an Streptavidin ermöglicht, im Vergleich zu anderen *Tags* wie z.B. dem His₆-*Tag*, eine höhere Reinigungseffizienz. Zudem treten bei der Elution des Proteins keine störenden Überlagerungen der Absorption auf, wie im Fall von Imidazol. Das lösliche Protein wurde mittels *Superloop* an das Säulenmaterial gebunden. Die Interaktion erfolgt, wie in Abbildung 49 dargestellt, zwischen Protein-*Strep-TagII* und dem auf dem Säulenmaterial immobilisierte Streptavidin. Ungebundenes Protein wurde im Anschluss mit Puffer A von der Säule gewaschen. Die Elution erfolgte mit Puffer B der zusätzlich freies Desthiobiotin enthält. Dabei kommt es zur kompetitiven Verdrängung des gebundenen Proteins von der Säule. Alle Schritte wurden bei einer Flussrate von 1 mL/min und 4 °C durchgeführt um eine vorzeitige Denaturierung des Proteins zu vermeiden.

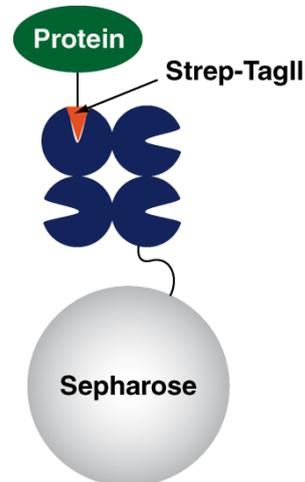


Abbildung 49. Prinzip der Strep-TagII Reinigung.

Die Proteinreinigung wurde mit einem *Äkta Purifier System* von *GE Healthcare* mit den Bauelementen *Box-900*, *pH/C-900*, *UV-900*, *P-900* und *Frac-950* durchgeführt.

Die gefilterte Proteinlösung wurde auf eine *Strep-Tactin Superflow*-Säule der Firma *IBA* (Säulenvolumen: 5 mL) aufgetragen und die nicht gebundenen Proteine mit dem ca. 3.5fachen Säulenvolumen an Strep-Tag Elutionspuffer A mit einem Fluss von 1 mL/min von der Säule gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden anschließend mit Elutionspuffer B mit einem Fluss von 1 mL/min eluiert. Die Pol η enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und mit Hilfe eines *Amicon Ultra Centrifuge Filter Device* (Ausschlussgröße: 10 kDa) von der Firma *Millipore* auf ein Volumen von ca. 0.5 mL bei 4 °C und 4000 rpm in einer *Eppendorf 5810R* Zentrifuge eingeeengt. Die Proteinlösung wurde dabei durch mehrfaches Verdünnen gegen den Heparin Puffer A umgepuffert. Die Proteinlösung wurde daraufhin auf eine *HiTrapTM Heparin HP* Anionenaustausch-Säule der Firma *GE Healthcare* (1 mL Säulenvolumen)

geladen, welche mit dem 5fachen Säulenvolumen an Heparin Puffer A mit einem Fluss von 1 mL/min gewaschen wurde, um vorhandene DNA zu eluieren. Pol η wurde mit einem linearen Gradienten eluiert, der innerhalb eines 10fachen Säulenvolumens eine Konzentration von 100% Heparin Puffer B mit einem Fluss von 1 mL/min annahm. Die Pol η enthaltenden Fraktionen wurden wieder vereinigt und über ein *Amicon Ultra Centrifuge Filter Device* wie oben beschrieben eingengt und gegen den Kristallisationspuffer für Pol η umgepuffert. Die Polymerase-Präparation wurde bis zu einer Konzentration von mindestens 7 mg/mL eingengt, auf 20 μ L Proben aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Der Reinheitsgrad der Polymerase wurde über SDS-Gelelektrophorese bestimmt (siehe Kapitel 4.11.6).

4.11.6. SDS-Gelelektrophorese

Bei der Probenvorbereitung wurden 2–5 μ L der Pol η -Probe (7–11 mg/mL) mit dem gleichen Puffer (Kristallisationspuffer) auf 10 μ L verdünnt und anschließend 5 μ L SDS-Auftragspuffer hinzugegeben. Die Probe wurde mit einer *Eppendorf Minispin* Zentrifuge kurz abzentrifugiert und anschließend für 10 min auf $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt, um Tertiär- und Sekundärstrukturen zu lösen. Disulfidbrücken wurden standardgemäß durch reduzierendes β -Mercaptoethanol gespalten. Die Angaben zur Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels finden sich in Tabelle 13.

	Rotiphorese Gel 30	ddH ₂ O	Tris (1.5 M, pH 8.8)	Tris (0.5 M, pH 6.8)	10% SDS	10% APS	TEMED
Trenngel 12%	8 mL	6.6 mL	5 mL	-	200 μ L	200 μ L	20 μ L
Sammelgel 5%	1.3 mL	5.5 mL	-	1 mL	80 μ L	80 μ L	8 μ L

Tabelle 13. Zusammensetzung des 12%igen Trenngels und des 5%igen Sammelgels der SDS-PAGE.

Das *Rotiphorese Gel 30* wurde von der *Carl Roth GmbH + Co KG* bezogen. Die Gele wurden in einer *Mini Protean 3 Cell* von *Biorad* gegossen. Das Trenngel wurde nach dessen Guss umgehend mit Isopropanol überschichtet, um eine gerade Kante zu erhalten. Für die Polymerisation des Trenn- und Sammelgels wurde eine Zeit von jeweils 1 h abgewartet. Die auspolymerisierten Gele wurden entweder in feuchten Tüchern bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert oder umgehend verwendet. Die Gele wurden mit 10 μ L Probenvolumen und 4 μ L Proteinstandard (*Invitrogen See Blue Plus 2*) beladen. Der Gellauf fand in 1x SDS-Laufpuffer statt. Die Gele wurden mit einer Spannung von 120-125 V laufen gelassen. Im Anschluss wurden die Gele

direkt mit Coomassie-Lösung für etwa 10 min gefärbt und danach mit einem Gemisch aus Essigsäure/Ethanol (Entfärbelösung) entfärbt. Alle Angaben zu den verwendeten Puffern und Lösungen finden sich im Abschnitt 4.4.1.

4.12. Primerverlängerungsassay

4.12.1. DNA-Hybridisierung

Für die im nächsten Abschnitt beschriebenen Primer-Extension-Assays wurden Cisplatin geschädigte und ungeschädigte Template standardgemäß mit 5'-Fluoreszein markierten Primern hybridisiert. Hierzu wurden Ansätze im 50 μ L-Maßstab hergestellt, in denen eine Konzentration von 10 μ M an Primer und 15 μ M an Templat vorlag. Die Hybridisierung erfolgte im jeweiligen 1x Reaktionspuffer der für die jeweilige Polymerase in den Primerverlängerungsassays benötigt wurde (NEBuffer II für Pol η , siehe 4.4.1). Die DNA wurde in einem *Eppendorf Mastercycler Personal* hybridisiert, hierbei wurde der Ansatz von 95 °C auf 4 °C über 2 h langsam abgekühlt und dieser dann bei –20 °C bis zu seiner Verwendung gelagert. Für die Primerverlängerungsassays wurde wegen dem 1.5fachen Überschuss an Templat eine Konzentration von 10 μ M dsDNA angenommen.

4.12.2. Oligonukleotide für den Primerverlängerungsassay

Die für den Primerverlängerungsassay verwendeten Oligonukleotide enthielten dieselbe Sequenz wie für die Kristallisation. Allerdings wurde das Templat für einen ausreichend hohen Schmelzpunkt auf ein 18mer verlängert.

Name	Sequenz (5' → 3')	Basenzahl
DNA_7	CTCT GTG CTCACCACCTT	18
DNA_8	GAGTGGTGAA	10
DNA_9	AGAGTGGTGAA	11

Tabelle 14. Oligonukleotide für die Verwendung in den Primerverlängerungsassays mit Pol η . Die Platinierungsstelle ist in rot markiert. Die Primer sind 5' Fluoreszein markiert.

4.12.3. Primerverlängerungsassay mit Pol η

Für die Untersuchung der Primerverlängerung in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration wurde DNA_7 und DNA_8 analog Kapitel 4.12.1 hybridisiert. Als Kontrolle wurde der gleiche Primer mit ungeschädigtem Templat hybridisiert. Die für den Primerverlängerungsassay benötigte Pol η wurde wie in Abschnitt 3.4 beschrieben eigens exprimiert und aufgereinigt. Die Reaktionen wurden in NEBuffer II durchgeführt. Die Endkonzentration an

Primer betrug 1 μM . Die Verlängerung wurde durch Zugabe einer Mischung aller vier Nukleotidtriphosphate (Endkonzentration 100 μM) gestartet. Alle Ansätze wurden auf Eis pipettiert. Die Ansätze wurden bei 26 °C für 30 min in einem *Eppendorf Thermomixer* inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 100 mM Natrium-EDTA beendet. Die Analyse der Extensionsprodukte erfolgte durch Elektrophorese mit denaturierenden 20%igen Polyacrylamidgelen wie in Abschnitt 4.12.4 beschrieben.

Um die Replikationsaktivität und das Verhalten von Pol η gegenüber dem 1,3-d(GpTpG)-Cisplatin-Schaden näher zu bestimmen, wurden Einzel-Nukleotid-Insertions-Versuche durchgeführt. Hierzu wurden Hybride erzeugt, bei denen die Primer zum einen bis zur 3'-dG-Base des Schadens und zum anderen bis zur 5'-dG-Base des Schadens reichten (siehe Abbildung 41 und Tabelle 14). Als Kontrolle wurden die gleichen Stränge mit ungeschädigtem Templat hybridisiert. Der Start der Reaktion erfolgte mit der Zugabe der jeweiligen dNTP-Lösung (dATP, dGTP, dTTP oder dCTP). Die Reaktionsbedingungen und Auswertung waren analog zur Primerverlängerung in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration.

4.12.4. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde zur analytischen Trennung von kurzen DNA Fragmenten bei Primerverlängerungsassays verwendet. Dabei ist es möglich, eine Auflösung von nur einer Base zu erhalten. Die Gelelektrophorese wurde mit der Gelkammer *Protean II xi Cell* von *Biorad* durchgeführt. Die Gele wurden bei konstanten 35 mA pro Gel in 1x TBE-Puffer laufen gelassen. Die Gele wurden entsprechend der Tabelle 15 gegossen und nach einer Polymerisationszeit von ca. 1.5 h umgehend verwendet. Das *Rotiphorese Sequenziergel Konzentrat* wurde von der *Carl Roth GmbH + Co KG* bezogen.

Zur Probenvorbereitung wurden die Proben mit gleichem Volumen 2x TBE Auftragspuffer versetzt. Die Gele wurden mit 12.5 μL Probenvolumen und 7 μL DNA-Leiter (0.5 μM in 1x TBE Auftragspuffer) beladen.

Die bereits Fluoreszein-markierte DNA konnte unmittelbar nach dem Lauf im *LAS-3000 Geldokumentationsgerät* analysiert werden.

	Rotiphorese	8.3 M Harnstoff	10x TBE	10% APS	TEMED
Sequenziergel					
Konzentrat					
großes Gel	32 mL	4 mL	4 mL	200 µL	20 µL

Tabelle 15. Zusammensetzung der 20%igen denaturierenden Polyacrylamid-Gele.

4.13. Kristallisation von Pol η in Komplex mit geschädigter DNA und dNTP

Das Templat mit dem 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Schaden wurde mit dem entsprechenden Primer mit einer 2',3'-Dideoxybase am 3'-Ende (um eine Verlängerung zu verhindern) im Proteinaufbewahrungspuffer hybridisiert. Protein und DNA-Duplex wurden im molaren Verhältnis von 1 zu 4 zusammengegeben. Die Endkonzentration an Protein betrug 4 mg/mL, an doppelsträngiger DNA 275 µM, an MgSO₄ 5 mM und an entsprechendem dNTP 1 mM. Nach zehnminütiger Inkubation bei 18 °C wurde 1 µL des Protein-DNA Komplexes mit 1 µL Reservoirlösung, die 11–14% (w/v) Polyethylenglycol 3350 und 150–200 mM CaCl₂ enthielt, vermischt. Zur Kristallisation wurde die *hanging-drop vapor diffusion* Methode verwendet (Abbildung 50). Bei dieser Methode equilibriert ein Tropfen, der das gereinigte Protein, Puffer und Fällungsmittel enthält, mit einem größeren Reservoir mit ähnlichen Puffer und Fällungsmittel in höheren Konzentrationen. Zunächst enthält der Tropfen mit der Proteinlösung eine unzureichende Konzentration von Fällungsmittel für die Kristallisation. Wenn das Wasser aus dem Tropfen verdunstet und zum Reservoir diffundiert, erhöht sich die Konzentration des Präzipitanden bis zu einem Niveau, das optimal für die Kristallisation ist. Da sich das System im Gleichgewicht befindet, werden diese optimalen Bedingungen solange aufrecht erhalten bis die Kristallisation vollständig ist. Die Kristallisationsplatten wurden bei 4 °C gelagert. Die Kristalle erschienen nach 3–6 Tagen.

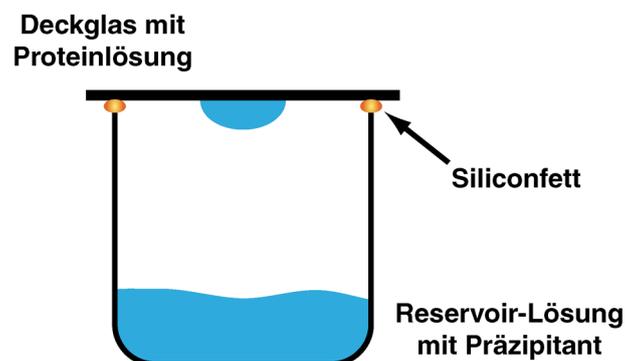


Abbildung 50. Schematische Darstellung der Kristallisation nach der *hanging-drop vapor diffusion* Methode.

4.14. Aufnahme und Prozessierung der Röntgenbeugungsdaten, Phasenbestimmung und Strukturverfeinerung

Die *Single wavelength anomalous dispersion* Daten wurden an den Strahlungsquellen ID23-1 (*European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF), Grenoble, Frankreich) und PXI and PXIII (*Swiss Light Source* (SLS), Villigen, Schweiz) aufgenommen. Die Daten wurden an der Platin-Absorptions-Kante gesammelt, welche mittels eines Röntgenfluoreszenzscans um die Platin LIII Kante bestimmt wurde. Ein Höchstwert-Datensatz (1.0766 Å) wurde mit 13 Grad Oszillation, einer Belichtungszeit von 1 Sekunde, mit einem in seiner Energie geschwächten Synchrotron-Strahl (90%) und 120 Bildern bis zu einer Auflösung von 2.5 Å gesammelt. Die Datenprozessierung erfolgte mit den Programmen XDS^[174] und SCALA^[175-176], mit einer Abgrenzung der Auflösung bei $I/\sigma I = 2$. Die Struktur wurde mittels molekularem Ersatz (PHASER^[177]) gelöst, wobei die Koordinaten der Pol η Apoprotein Struktur (PDB-Zugangscode: 2JIH) mit den zurückgesetzten Temperaturfaktoren (*temperature factors reset*) benutzt wurde. Nach simulierter Optimierung mittels PHENIX^[178] wurden die erhaltenen Phasen verwendet, um die zwei Platin-Atome pro asymmetrischer Einheit in der anomalen Fourier-Differenz Karte zu lokalisieren. Die Kombination des molekularen Ersatzes mit den experimentellen Phasen wurde mit dem Programm SHARP^[179-180] ausgeführt. Das Modell der Struktur wurde manuell mittels COOT^[181] erzeugt. Die Verfeinerung des Modells wurde mit REFMAC5^[182-183] durchgeführt, wobei direkt die SAD (= *single-wavelength anomalous dispersion*) Daten herangezogen wurden, um eine Verfälschung des Modells zu vermeiden. Datenprozessierung und Verfeinerungsstatistiken sind in Anhang 5.4 zusammengefasst. Die Qualität des erhaltenen Modells wurde mittels des *Molprobability Servers*^[184] analysiert und zeigte eine gute Geometrie bei 96.2% in den bevorzugten, 3.6% in den erlaubten und 0.1% (=eine Aminosäure) in den verbotenen Regionen des Ramachandran Plots. Die strukturellen Abgleiche der Atomkoordinaten wurden mittels LSQKAB erstellt.^[175] Der Bezugsrahmen für diese Abgleiche wurde mit DDMP bestimmt.^[185] Protein-DNA Interaktionen wurden mit LIGPLOT^[186] und dem PISA Service am *European Bioinformatics Institute* analysiert^[187]. Alle Strukturbilder wurden mit dem Programm PyMol (Delano Scientific; <http://www.pymol.org>) erstellt. Die Atomkoordinaten und Strukturfaktoren wurden in der *Protein Data Base* über die *EBI Macromolecular Structure Database* (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe>) hinterlegt (PDB-Zugangscode: 2WTF).

5. Anhang

5.1. Abkürzungen

μ	mikro (10^{-6})
A	Adenin, DNA: 2'-Desoxyadenosin
Å	Angström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
Abb.	Abbildung
AP	Antarctic Phosphatase
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaare
C	Cytosin, DNA: 2'-Desoxycytidin
CE	N,N-Diisopropylcyanoethylphosphoramidit
CIP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
CP	Cisplatin
CPG	<i>controlled pore glass</i> , Glasgranulat mit def. Porengröße
CS	Calf Spleen Phosphodiesterase II
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxyadenosine-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidine-5'-triphosphat
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
dGTP	2'-Desoxyguanosine-5'-triphosphat
DMT	4,4'-Dimethoxytrityl
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleoside-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiotreithol
dTTP	2'-Desoxythymidine-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
eq.	Äquivalente
ESI	<i>Electron Spray Ionisation</i> , Elektronensprayionisation
et al.	<i>et alii</i> , und andere

G	Guanin, DNA: 2'-Desoxyguanosin
g	Gramm
h	Stunde
His	Histidin
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , Hochdruckchromatographie
L	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
Lsg.	Lösung
m	milli (10^{-3}) bzw. Meter
mA	Milliamper
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>
min	Minute
Mrd.	Milliarden
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	MS eines mit MS isolierten Ions
n	nano (10^{-9})
NER	Nucleotid-Exzisions-Reparatur
OD	Optische Dichte
P1	Nuclease P1
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
Pol	Polymerase
Pol η	DNA Polymerase η
RP	reversed phase = Umkehrphase
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
S1	Nuclease S1
SDS	Sodiumdodecylsulfat, Natriumdodecylsulfat
ss	einzelsträngig
SV	Snake Venom Phosphodiesterase I
T	Thymin, DNA: 2'-Desoxythymidin
Tab.	Tabelle

TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TLS	Translesion-Synthese
ToF	<i>Time of Flight</i>
Tris	Tri-(Hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil (volume per volume)
w/v	Massenanteil pro Volumen (weight per volume)

5.2. Übersicht über die beobachteten Fragmente der Verdauversuche

Kanonische Nucleoside:

Nucleobase	Retentionszeit [min]	Absorption [nm]	Masse (1x/2x pos.)	Masse (1x neg.)
dC	10	270	228.0979/455.1885	272.0888
dG	24	253 + Schulter	268.1040/535.2008	312.0950
dT	25	267	243.0975/485.1878	287.0885
dA	28	260	252.1091/503.2110	296.1000

Platinierte Nucleoside:

Nucleobase	Retentionszeit [min]	Absorption [nm]	Masse (pos.)	Masse (neg.)	Summenformel
GpG + [Pt(NH ₃) ₂] ²⁺	26	260	412.0820 (z=2)	821.1421 (z=-1)	C ₂₀ H ₃₁ N ₁₂ O ₁₀ PPt ²⁺
GpTpG + [Pt(NH ₃) ₂] ²⁺	27	261	564.1050 (z=2)		C ₃₀ H ₄₄ N ₁₄ O ₁₇ P ₂ Pt ²⁺
GpTpG + [Pt(NH ₃) ₂] ²⁺	31	261	533.1271 (z=2)		C ₃₀ H ₄₅ N ₁₄ O ₁₅ PPt ²⁺

5.3. Syntheseprotokolle zur reversen DNA-Synthese

5.3.1. Einbau des 5'-CE-dA- bzw. des 5'-CE-dC-Phosphoramidits

```

/* ----- */
/*      Function                Mode  Amount  Time(sec)      Description     */
/*                               /Arg1   /Arg2                                     */
/* ----- */
$Deblocking
144 /*Index Fract. Coll.      */ NA          1      0  "Event out ON"
   0 /*Default                */ WAIT         0     1.5 "Wait"
141 /*Trityl Mon. On/Off     */ NA          1      1  "START data collection"
   16 /*Dblk                  */ PULSE       10     0  "Dblk to column"
   16 /*Dblk                  */ PULSE       50    120 "Deblock"
   38 /*Diverted Wsh A       */ PULSE       40     0  "Flush system with Wsh A"
141 /*Trityl Mon. On/Off     */ NA          0      1  "STOP data collection"
   38 /*Diverted Wsh A       */ PULSE       40     0  "Flush system with Wsh A"
144 /*Index Fract. Coll.      */ NA          2      0  "Event out OFF"
$Coupling
   1 /*Wsh                    */ PULSE       5      0  "Flush system with Wsh"
   2 /*Act                    */ PULSE       5      0  "Flush system with Act"
  18 /*A + Act                */ PULSE       5      0  "Monomer + Act to column"
  18 /*A + Act                */ PULSE       2     32  "Couple monomerA 96 sec"
   2 /*Act                    */ PULSE       3     48  "Couple monomerA 96 sec"
   1 /*Wsh                    */ PULSE       7    112  "Couple monomerA 96 sec"
   1 /*Wsh                    */ PULSE       8      0  "Flush system with Wsh"
$Capping
  12 /*Wsh A                  */ PULSE      20     0  "Flush system with Wsh A"
  13 /*Caps                   */ PULSE       8      0  "Caps to column"
  12 /*Wsh A                  */ PULSE       6     30  "Cap"
  12 /*Wsh A                  */ PULSE      14     0  "Flush system with Wsh A"
$Oxidizing
  15 /*Ox                     */ PULSE      15     0  "Ox to column"
  12 /*Wsh A                  */ PULSE      15     0  "Flush system with Wsh A"
$Capping
  13 /*Caps                   */ PULSE       7      0  "Caps to column"
  12 /*Wsh A                  */ PULSE      30     0  "End of cycle wash"

```

5.3.2. Einbau des 5'-CE-dG- bzw. des 5'-CE-dT-Phosphoramidits

```

/* -----
/*      Function                Mode  Amount  Time(sec)      Description
/*                               /Arg1  /Arg2
/* -----
$Deblocking
144 /*Index Fract. Coll.  */ NA          1      0  "Event out ON"
   0 /*Default            */ WAIT         0     1.5 "Wait"
141 /*Trityl Mon. On/Off */ NA          1      1  "START data collection"
   16 /*Dblk              */ PULSE        10     0  "Dblk to column"
   16 /*Dblk              */ PULSE        50    120 "Deblock"
   38 /*Diverted Wsh A    */ PULSE        40     0  "Flush system with Wsh A"
141 /*Trityl Mon. On/Off */ NA          0      1  "STOP data collection"
   38 /*Diverted Wsh A    */ PULSE        40     0  "Flush system with Wsh A"
144 /*Index Fract. Coll. */ NA          2      0  "Event out OFF"
$Coupling
   1 /*Wsh                */ PULSE         5     0  "Flush system with Wsh"
   2 /*Act                */ PULSE         5     0  "Flush system with Act"
  20 /*G + Act           */ PULSE         6     0  "Monomer + Act to column"
  20 /*G + Act           */ PULSE         1    16  "Couple monomerG 96 sec"
   2 /*Act                */ PULSE         4    64  "Couple monomerG 96 sec"
   1 /*Wsh                */ PULSE         7   112  "Couple monomerG 96 sec"
   1 /*Wsh                */ PULSE         8     0  "Flush system with Wsh"
$Capping
  12 /*Wsh A             */ PULSE        20     0  "Flush system with Wsh A"
  13 /*Caps              */ PULSE         8     0  "Caps to column"
  12 /*Wsh A             */ PULSE         6    30  "Cap"
  12 /*Wsh A             */ PULSE        14     0  "Flush system with Wsh A"
$Oxidizing
  15 /*Ox                */ PULSE        15     0  "Ox to column"
  12 /*Wsh A             */ PULSE        15     0  "Flush system with Wsh A"
$Capping
  13 /*Caps              */ PULSE         7     0  "Caps to column"
  12 /*Wsh A             */ PULSE        30     0  "End of cycle wash"

```

5.3.3. Einbau des 2',3'-ddG-CE-Phosphoramidits

```

/* -----
/*      Function                Mode  Amount  Time(sec)      Description
/*                               /Arg1  /Arg2
/* -----
$Deblocking
144 /*Index Fract. Coll.  */ NA          1      0  "Event out ON"
   0 /*Default            */ WAIT         0     1.5 "Wait"
141 /*Trityl Mon. On/Off */ NA          1      1  "START data collection"
   16 /*Dblk              */ PULSE        10     0  "Dblk to column"
   16 /*Dblk              */ PULSE        50    120 "Deblock"
   38 /*Diverted Wsh A    */ PULSE        40     0  "Flush system with Wsh A"
141 /*Trityl Mon. On/Off */ NA          0      1  "STOP data collection"
   38 /*Diverted Wsh A    */ PULSE        40     0  "Flush system with Wsh A"
144 /*Index Fract. Coll. */ NA          2      0  "Event out OFF"
$Coupling
   1 /*Wsh                */ PULSE         5     0  "Flush system with Wsh"
   2 /*Act                */ PULSE         5     0  "Flush system with Act"
  24 /*7 + Act           */ PULSE         7     0  "Monomer + Act to column"
  24 /*7 + Act           */ PULSE         4     50 "Couple monomer"
   2 /*Act                */ PULSE         4    200 "Couple monomer"
   1 /*Wsh                */ PULSE         7    350 "Couple monomer"
   1 /*Wsh                */ PULSE         8     0  "Flush system with Wsh"
$Oxidizing
  15 /*Ox                 */ PULSE        15     0  "Ox to column"
  12 /*Wsh A             */ PULSE        15     0  "Flush system with Wsh A"

```

5.4. Experimentelle Daten, Prozessierungs- und Verfeinerungsstatistik der Co-Kristallstruktur

Data collection	
Space group	P4 ₁ 2 ₁ 2
Cell dimensions	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	103.2, 103.2, 292.7
α , β , γ (°)	90 90 90
Wavelength (Å)	1.0766
Resolution (Å)	48–2.5 (2.64–2.5)
<i>R</i> _{sym}	0.057 (0.35)
Mean <i>I</i> / σ <i>I</i>	25.1 (5.8)
Completeness (%)	99.0 (99.7)
Redundancy	8.9 (8.2)
Anomalous completeness (%)	98.9 (99.5)
Anomalous redundancy	4.6 (4.1)
Refinement	
Resolution (Å)	48–2.5
No. reflections	55827
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	22.7/26.9
No. atoms	18218
Protein complex A/B	4077/4081
DNA complex A/B	361/339
Waters/Ions	120/10
<i>B</i> -factors	
Protein complex A/B	44.0/37.5
DNA complex A/B	52.9/57.0
Pt-GTG complex A/B	69.7/72.5
ATP complex A/B	24.6/27.9
Waters/Ions	33.5/55.0
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.017
Bond angles (°)	0.163

5.5. Abstandsauftragung der Entfernungen

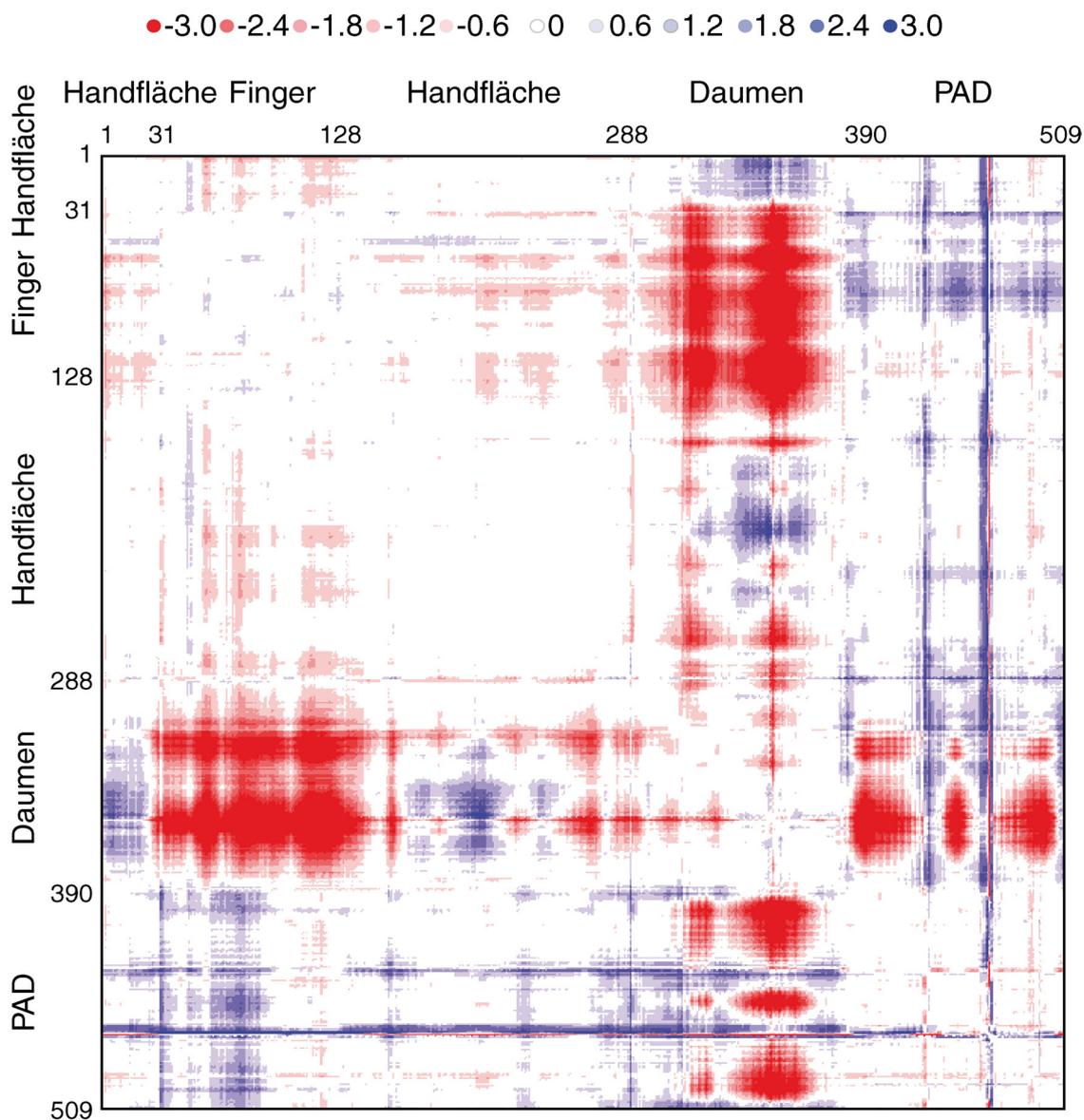


Abbildung 51. Auftragung der Entfernungsabstände. Die Auftragung wurde durch Subtraktion der Abstände der α -Kohlenstoffe aus Apo-Pol η von Komplex B erhalten. Die roten Regionen verdeutlichen kürzere α -Kohlenstoffabstände in der DNA-gebundenen Struktur im Vergleich zum Apo-Enzym und zeigen somit ein Schließen des Enzyms. Unterschiede werden ausschließlich in der Daumen-Domäne des Enzyms mit einer Abstandsänderung von ~ 3 Å beobachtet. Die Unterschiede wurden mittels des Programmes DDMP^[185] aufgetragen.

5.6. Daten aus dem TLS-Assay nach *Livneh*

5.6.1. TLS-Prozess über den 1,3-d(GpTpG) Cisplatin Schaden

Die humanen Zelllinien wurden mit einer Mischung aus *gapped* Pt-GTG Plasmid (kan^R), dem Kontrollplasmid GP20 (cm^R) und dem *carrier* Plasmid pUC18 transfiziert. Nach 7.5 bzw. 10 Stunden Inkubation wurde die DNA extrahiert und in den DNA Reparatur defizienten *E. coli* Indikatorstamm JM107 transformiert. Die Plasmid-Reparatur wurde durch die Anzahl an Kolonien im Verhältnis kan^R/cm^R berechnet. Der Prozentsatz an TLS wurde durch den Abzug des relativen Verhältnisses an Nicht-TLS Ereignissen (große Insertionen und Deletionen) berechnet. Der TLS-Prozentsatz gibt den Durchschnitt aus drei Transfektionsexperimenten an.

Zelllinie	Transformanten		Plasmid-Reparatur	TLS
	kan^R	cm^R		
MRC5				
7.5h	62	652	9%±1%	7±1%
20h	64	228	29%±1%	23%±1%
XP30RO-C15				
7.5h	82	979	8%±1%	10%±1%
20h	206	497	41%±1%	41%±1%
XP30RO-C16				
7.5h	99	1168	8%±1%	8%±1%
20h	254	539	46%±1%	44%±2%
XP30RO				
7.5h	128	1884	7%±1%	5%±1%
20h	149	699	22%±1%	20%±1%
XP4BE				
7.5h	76	1337	5%±0.2%	5%±0.2%
20h	163	511	32%±1%	30%±1%

5.6.2. Analyse der Mutationen während des TLS-Prozesses

Die Plasmide wurden von den kan^R Kolonien mit den GP-Pt-GTG Klonen extrahiert und anschließend einer DNA Sequenzanalyse unterzogen. Mutagene TLS wurde als der Prozentsatz an Nicht-CAC Sequenzen, die gegenüber dem Pt-GTG Schaden eingebaut wurden, in Bezug auf alle TLS Ereignisse (welche keine großen Insertionen oder Deletionen enthalten) berechnet.

	MRC5	XP30RO- C15	XP30RO- C16	XP30RO	XP4BE
-G-T-G-	23 (47.9%)	22 (48.9%)	31 (64.6%)	18 (41.8%)	18 (41.9%)
-X-T-G-	5 (10.4%)	7 (15.6%)	3 (6.3%)	21 (48.8%)	16 (36.4%)
-G-X-G-	2 (4.2%)	1 (2.2%)	0	0	0
-G-T-X-	13 (27.1%)	15 (33.3%)	12 (25%)	3 (7.0%)	4 (9.1%)
-X-T-X-	0	1 (2.2%)	1 (2.1%)	1 (2.3%)	3 (6.8%)
-X-X-G-	0	0	0	0	0
-G-X-X-	2 (4.2%)	0	0	0	0
Insertionen/Deletionen	3 (6.3%)	0	1 (2.1%)	0	3 (6.8%)
Analysierte Klone	48 (100%)	45 (100%)	48 (100%)	43 (100%)	44 (100%)
Mutagene TLS (%)	45.9%	53.2%	33.4%	58.1%	52.3%

6. Literaturverzeichnis

- [1] M. Peyrone, *Ann. Chem. Pharm.* **1844**, *51*, 1–29. Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür.
- [2] M. Galanski, B. K. Keppler, *Pharm. Unserer Zeit* **2006**, *35*, 118–123. Tumorhemmende Metallverbindungen: Entwicklung, Bedeutung und Perspektiven.
- [3] B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature* **1965**, *205*, 698–699. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode.
- [4] B. Lippert, *Cisplatin – chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*, Wiley-VCH, Weinheim, **1999**.
- [5] B. Rosenberg, E. Renshaw, L. Vancamp, J. Hartwick, J. Drobnik, *J. Bacteriol.* **1967**, *93*, 716–721. Platinum-induced filamentous growth in *Escherichia coli*.
- [6] B. Rosenberg, L. Van Camp, E. B. Grimley, A. J. Thomson, *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 1347–1352. The inhibition of growth or cell division in *Escherichia coli* by different ionic species of platinum(IV) complexes.
- [7] B. Rosenberg, L. Vancamp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, *Nature* **1969**, *222*, 385–386. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents.
- [8] B. Rosenberg, L. VanCamp, *Cancer Res.* **1970**, *30*, 1799–1802. The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds.
- [9] D. J. Higby, H. J. W. Jr., D. J. Albert, J. F. Holland, *Cancer* **1974**, *33*, 1219–1225. Diaminodichloroplatinum: a phase I study showing responses in testicular and other tumors.
- [10] L. Kelland, *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 573–584. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy.
- [11] P. J. Loehrer, L. H. Einhorn, *Ann. Intern. Med.* **1984**, *100*, 704–713. Diagnosis and treatment: cisplatin.
- [12] Y. Jung, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 1387–1407. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage.
- [13] http://en.sanofi-aventis.com/binaries/20100210_Results_en_tcm28-27173.pdf, **2009**.
- [14] A. Bhargava, U. N. Vaishampayan, *Expert Opin. Investig. Drugs* **2009**, *18*, 1787–1797. Satraplatin: leading the new generation of oral platinum agents.
- [15] D. S. Alberts, J. K. Noel, *Anti-Cancer Drugs* **1995**, *6*, 369–383. Cisplatin-associated neurotoxicity: can it be prevented?
- [16] M. P. Goren, R. K. Wright, M. E. Horowitz, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1986**, *18*, 69–73. Cumulative renal tubular damage associated with cisplatin nephrotoxicity.
- [17] D. Screnci, M. J. McKeage, *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *77*, 105–110. Platinum neurotoxicity: clinical profiles, experimental models and neuroprotective approaches.
- [18] J. T. Hartmann, C. Kollmannsberger, L. Kanz, C. Bokemeyer, *Int. J. Cancer* **1999**, *83*, 866–869. Platinum organ toxicity and possible prevention in patients with testicular cancer.
- [19] S. D. Schaefer, J. D. Post, L. G. Close, C. G. Wright, *Cancer* **1985**, *56*, 1934–1939. Ototoxicity of low- and moderate-dose cisplatin.
- [20] J. Reedijk, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2499–2510. Why does cisplatin reach guanine-N7 with competing s-donor ligands available in the cell?
- [21] M. S. Davies, S. J. Berners-Price, T. W. Hambley, *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 5603–5613. Slowing of cisplatin aquation in the presence of DNA but not in the presence of phosphate: improved understanding of sequence selectivity and the roles of

- monoaquated and diaquated species in the binding of cisplatin to DNA.
- [22] E. R. Jamieson, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467–2498. Structure, recognition, and processing of cisplatin–DNA adducts.
- [23] D. P. Bancroft, C. A. Lepre, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6860–6871. Platinum-195 NMR kinetic and mechanistic studies of cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II) binding to DNA.
- [24] A. L. Pinto, S. J. Lippard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, *82*, 4616–4619. Sequence-dependent termination of in vitro DNA synthesis by cis- and trans-diamminedichloroplatinum (II).
- [25] M.-H. Baik, R. A. Friesner, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14082–14092. Theoretical study of cisplatin binding to purine bases: why does cisplatin prefer guanine over adenine?
- [26] S. E. Sherman, S. J. Lippard, *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 1153–1181. Structural aspects of platinum anticancer drug interactions with DNA.
- [27] D. Esteban-Fernandez, E. Moreno-Gordaliza, B. Canas, M. A. Palacios, M. M. Gomez-Gomez, *Metallomics* **2010**, *2*, 19–38. Analytical methodologies for metallomics studies of antitumor Pt-containing drugs.
- [28] A. Eastman, *Biochemistry* **1983**, *22*, 3927–3933. Characterization of the adducts produced in DNA by cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II).
- [29] A. M. J. Fichtinger-Schepman, J. L. Van der Veer, J. H. J. Den Hartog, P. H. M. Lohman, J. Reedijk, *Biochemistry* **1985**, *24*, 707–713. Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation.
- [30] S. E. Sherman, D. Gibson, A. H. J. Wang, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7368–7381. Crystal and molecular structure of cis-[Pt(NH₃)₂][d(pGpG)], the principal adduct formed by cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA.
- [31] Y. Mantri, S. J. Lippard, M.-H. Baik, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5023–5030. Bifunctional binding of cisplatin to DNA: why does cisplatin form 1,2-intrastrand cross-links with AG but not with GA?
- [32] M. M. Jennerwein, A. Eastman, A. Khokhar, *Chem.-Biol. Interact.* **1989**, *70*, 39–49. Characterization of adducts produced in DNA by isomeric 1,2-diaminocyclohexaneplatinum(II) complexes.
- [33] J. M. Woynarowski, W. G. Chapman, C. Napier, M. C. S. Herzig, P. Juniewicz, *Mol. Pharmacol.* **1998**, *54*, 770–777. Sequence- and region-specificity of oxaliplatin adducts in naked and cellular DNA.
- [34] M. Kartalou, J. M. Essigmann, *Mutat. Res.* **2001**, *478*, 1–21. Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins.
- [35] F. A. Blommaert, H. C. M. van Dijk-Knijnenburg, F. J. Dijt, L. den Engelse, R. A. Baan, F. Berends, A. M. J. Fichtinger-Schepman, *Biochemistry* **1995**, *34*, 8474–8480. Formation of DNA adducts by the anticancer drug carboplatin: different nucleotide sequence preferences in vitro and in cells.
- [36] S. Sherman, D. Gibson, A. Wang, S. Lippard, *Science* **1985**, *230*, 412–417. X-ray structure of the major adduct of the anticancer drug cisplatin with DNA: cis-[Pt(NH₃)₂(d(pGpG))].
- [37] G. Admiraal, J. L. Van der Veer, R. A. G. De Graaff, J. H. J. Den Hartog, J. Reedijk, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 592–594. Intrastrand bis(guanine) chelation of trinucleoside diphosphate d(CpGpG) to cis-platinum: an x-ray single-crystal structure analysis.

- [38] P. M. Takahara, A. C. Rosenzweig, C. A. Frederick, S. J. Lippard, *Nature* **1995**, *377*, 649–652. Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin.
- [39] P. M. Takahara, C. A. Frederick, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 12309–12321. Crystal structure of the anticancer drug cisplatin bound to duplex DNA.
- [40] A. Gelasco, S. J. Lippard, *Biochemistry* **1998**, *37*, 9230–9239. NMR solution structure of a DNA dodecamer duplex containing a cis-diammineplatinum(II) d(GpG) intrastrand cross-link, the major adduct of the anticancer drug cisplatin.
- [41] C. J. van Garderen, L. P. A. van Houte, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *225*, 1169–1179. The solution structure of a DNA duplex containing the *cis*-Pt(NH₃)₂[d(-GTG-)-N7(G), N7(G)] adduct, as determined with high-field NMR and molecular mechanics/dynamics.
- [42] Y. Wu, P. Pradhan, J. Havener, G. Boysen, J. A. Swenberg, S. L. Campbell, S. G. Chaney, *J. Mol. Biol.* **2004**, *341*, 1251–1269. NMR solution structure of an oxaliplatin 1,2-d(GG) intrastrand cross-link in a DNA dodecamer duplex.
- [43] D. Yang, S. S. G. E. van Boom, J. Reedijk, J. H. van Boom, A. H. J. Wang, *Biochemistry* **1995**, *34*, 12912–12920. Structure and isomerization of an intrastrand cisplatin-cross-linked octamer DNA duplex by NMR analysis.
- [44] L. G. Marzilli, J. S. Saad, Z. Kuklenyik, K. A. Keating, Y. Xu, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2764–2770. Relationship of solution and protein-bound structures of DNA duplexes with the major intrastrand cross-link lesions formed on cisplatin binding to DNA.
- [45] S. T. Sullivan, J. S. Saad, F. P. Fanizzi, L. G. Marzilli, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1558–1559. Dramatic 5'-residue effect on conformer distribution of short oligonucleotide retro models of the cisplatin-DNA cross-link: implications for the Lippard and cross-link distorted base pair steps present in cisplatin-DNA duplex adducts.
- [46] B. Spingler, D. A. Whittington, S. J. Lippard, *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 5596–5602. 2.4 Å Crystal structure of an oxaliplatin 1,2-d(GpG) intrastrand cross-link in a DNA dodecamer duplex.
- [47] S. Sharma, P. Gong, B. Temple, D. Bhattacharyya, N. V. Dokholyan, S. G. Chaney, *J. Mol. Biol.* **2007**, *373*, 1123–1140. Molecular dynamic simulations of cisplatin- and oxaliplatin-d(GG) intrastand cross-links reveal differences in their conformational dynamics.
- [48] Y. Wu, D. Bhattacharyya, C. L. King, I. Baskerville-Abraham, S.-H. Huh, G. Boysen, J. A. Swenberg, B. Temple, S. L. Campbell, S. G. Chaney, *Biochemistry* **2007**, *46*, 6477–6487. Solution structures of a DNA dodecamer duplex with and without a cisplatin 1,2-d(GG) intrastrand cross-link: comparison with the same DNA duplex containing an oxaliplatin 1,2-d(GG) intrastrand cross-link.
- [49] S. G. Chaney, S. L. Campbell, E. Bassett, Y. Wu, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2005**, *53*, 3–11. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts.
- [50] J.-M. Teuben, C. Bauer, A. H. J. Wang, J. Reedijk, *Biochemistry* **1999**, *38*, 12305–12312. Solution structure of a DNA duplex containing a cis-diammineplatinum(II) 1,3-d(GTG) intrastrand cross-link, a major adduct in cells treated with the anticancer drug carboplatin.
- [51] L. Marrot, M. Leng, *Biochemistry* **1989**, *28*, 1454–1461. Chemical probes of the conformation of DNA modified by cis-diamminedichloroplatinum(II).
- [52] M.-F. Anin, M. Leng, *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 4395–4400. Distortions induced in double-stranded oligonucleotides by the binding of cis- or trans-diammine-

- dichloroplatinum(II) to the d(GTG) sequence.
- [53] J. H. J. Den Hartog, C. Altona, H. Van den Elst, G. A. Van der Marel, J. Reedijk, *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 983–986. Unwinding in an undecamer double-helical DNA fragment, after binding of cis-diamminedichloroplatinum to a d(-GpTpG-) sequence.
- [54] M. A. Lemaire, A. Schwartz, A. R. Rahmouni, M. Leng, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 1982–1985. Interstrand cross-links are preferentially formed at the d(GC) sites in the reaction between cis-diamminedichloroplatinum (II) and DNA.
- [55] H. Huang, L. Zhu, B. R. Reid, G. P. Drobny, P. B. Hopkins, *Science* **1995**, *270*, 1842–1845. Solution structure of a cisplatin-induced DNA interstrand cross-link.
- [56] F. Coste, J. Malinge, L. Serre, W. Shepard, M. Roth, M. Leng, C. Zelwer, *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 1837–1846. Crystal structure of a double-stranded DNA containing a cisplatin interstrand cross-link at 1.63 Å resolution: hydration at the platinated site.
- [57] A. Casini, A. Guerri, C. Gabbiani, L. Messori, *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 995–1006. Biophysical characterisation of adducts formed between anticancer metallodrugs and selected proteins: new insights from X-ray diffraction and mass spectrometry studies.
- [58] A. R. Timerbaev, C. G. Hartinger, S. S. Aleksenko, B. K. Keppler, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2224–2248. Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology.
- [59] V. Calderone, A. Casini, S. Mangani, L. Messori, P. L. Orioli, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 1267–1269. Structural investigation of cisplatin-protein interactions: selective platination of His19 in a cuprozinic superoxide dismutase.
- [60] V. Brabec, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **2002**, *71*, 1–68. DNA modifications by antitumor platinum and ruthenium compounds: their recognition and repair.
- [61] J. Reedijk, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 3611–3616. New clues for platinum antitumor chemistry: kinetically controlled metal binding to DNA.
- [62] A. Casini, G. Mastrobuoni, C. Temperini, C. Gabbiani, S. Francese, G. Moneti, C. T. Supuran, A. Scozzafava, L. Messori, *Chem. Commun.* **2007**, 156–158. ESI mass spectrometry and X-ray diffraction studies of adducts between anticancer platinum drugs and hen egg white lysozyme.
- [63] B. Wu, P. Droge, C. A. Davey, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 110–112. Site selectivity of platinum anticancer therapeutics.
- [64] R. A. Hromas, J. A. North, C. P. Burns, *Cancer Lett.* **1987**, *36*, 197–201. Decreased cisplatin uptake by resistant L1210 leukemia cells.
- [65] S. P. Binks, M. Dobrota, *Biochem. Pharmacol.* **1990**, *40*, 1329–1336. Kinetics and mechanism of uptake of platinum-based pharmaceuticals by the rat small intestine.
- [66] S. C. Mann, P. A. Andrews, S. B. Howell, *Int. J. Cancer* **1991**, *48*, 866–872. Modulation of cis-diamminedichloroplatinum(II) accumulation and sensitivity by forskolin and 3-isobutyl-1-methylxanthine in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells.
- [67] S. Ishida, J. Lee, D. J. Thiele, I. Herskowitz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 14298–14302. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals.
- [68] M. Komatsu, T. Sumizawa, M. Mutoh, Z. S. Chen, K. Terada, T. Furukawa, X. L. Yang, H. Gao, N. Miura, T. Sugiyama, S. Akiyama, *Cancer Res.* **2000**, *60*, 1312–1316. Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance.
- [69] G. V. Kalayda, C. H. Wagner, I. Buss, J. Reedijk, U. Jaehde, *BMC Cancer* **2008**, *8*,

175. Altered localisation of the copper efflux transporters ATP7A and ATP7B associated with cisplatin resistance in human ovarian carcinoma cells.
- [70] K. Katano, A. Kondo, R. Safaei, A. Holzer, G. Samimi, M. Mishima, Y. M. Kuo, M. Rochdi, S. B. Howell, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 6559–6565. Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper.
- [71] T. Nakagawa, Y. Inoue, H. Kodama, H. Yamazaki, K. Kawai, H. Suemizu, R. Masuda, M. Iwazaki, S. Yamada, Y. Ueyama, H. Inoue, M. Nakamura, *Oncol. Rep.* **2008**, *20*, 265–270. Expression of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) correlates with cisplatin resistance in human non-small cell lung cancer xenografts.
- [72] R. Safaei, M. H. Maktabi, B. G. Blair, C. A. Larson, S. B. Howell, *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 333–341. Effects of the loss of Atox1 on the cellular pharmacology of cisplatin.
- [73] A. K. Boal, A. C. Rosenzweig, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14196–14197. Crystal structures of cisplatin bound to a human copper chaperone.
- [74] K. Wozniak, J. Blasiak, *Acta Biochim. Pol.* **2002**, *49*, 583–596. Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts.
- [75] W. M. Scovell, N. Muirhead, L. R. Kroos, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1987**, *142*, 826–835. cis-Diamminedichloroplatinum(II) selectively cross-links high mobility group proteins 1 and 2 to DNA in micrococcal nuclease accessible regions of chromatin.
- [76] S. L. Bruhn, P. M. Pil, J. M. Essigmann, D. E. Housman, S. J. Lippard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89*, 2307–2311. Isolation and characterization of human cDNA clones encoding a high mobility group box protein that recognizes structural distortions to DNA caused by binding of the anticancer agent cisplatin.
- [77] A. Travers, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 102–109. Recognition of distorted DNA structures by HMG domains.
- [78] U. M. Ohndorf, M. A. Rould, Q. He, C. O. Pabo, S. J. Lippard, *Nature* **1999**, *399*, 708–712. Basis for recognition of cisplatin-modified DNA by high-mobility-group proteins.
- [79] H. M. Weir, P. J. Kraulis, C. S. Hill, A. R. Raine, E. D. Laue, J. O. Thomas, *EMBO J.* **1993**, *12*, 1311–1319. Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1.
- [80] C. M. Read, P. D. Cary, C. Crane-Robinson, P. C. Driscoll, D. G. Norman, *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 3427–3436. Solution structure of a DNA-binding domain from HMG1.
- [81] D. N. Jones, M. A. Searles, G. L. Shaw, M. E. Churchill, S. S. Ner, J. Keeler, A. A. Travers, D. Neuhaus, *Structure* **1994**, *2*, 609–627. The solution structure and dynamics of the DNA-binding domain of HMG-D from *Drosophila melanogaster*.
- [82] C. H. Hardman, R. W. Broadhurst, A. R. Raine, K. D. Grasser, J. O. Thomas, E. D. Laue, *Biochemistry* **1995**, *34*, 16596–16607. Structure of the A-domain of HMG1 and its interaction with DNA as studied by heteronuclear three- and four-dimensional NMR spectroscopy.
- [83] L. P. van Houte, V. P. Chuprina, M. van der Wetering, R. Boelens, R. Kaptein, H. Clevers, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 30516–30524. Solution structure of the sequence-specific HMG box of the lymphocyte transcriptional activator Sox-4.
- [84] M. H. Werner, J. R. Huth, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Cell* **1995**, *81*, 705–714. Molecular basis of human 46X,Y sex reversal revealed from the three-dimensional solution structure of the human SRY-DNA complex.
- [85] J. C. Huang, D. B. Zamble, J. T. Reardon, S. J. Lippard, A. Sancar, *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 10394–10398. HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease.
- [86] D. B. Zamble, D. Mu, J. T. Reardon, A. Sancar, S. J. Lippard, *Biochemistry* **1996**, *35*, 10004–10013. Repair of cisplatin-DNA adducts by the mammalian excision nuclease.
- [87] D. B. Zamble, Y. Mikata, C. H. Eng, K. E. Sandman, S. J. Lippard, *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *91*, 451–462. Testis-specific HMG-domain protein alters the responses of cells to cisplatin.
- [88] Q. He, C. H. Liang, S. J. Lippard, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 5768–5772. Steroid hormones induce HMG1 overexpression and sensitize breast cancer cells to cisplatin and carboplatin.
- [89] H. Arioka, K. Nishio, T. Ishida, H. Fukumoto, K. Fukuoka, T. Nomoto, H. Kurokawa, H. Yokote, S. Abe, N. Saijo, *Jpn. J. Cancer Res.* **1999**, *90*, 108–115. Enhancement of cisplatin sensitivity in high mobility group 2 cDNA-transfected human lung cancer cells.
- [90] G. Nagatani, M. Nomoto, H. Takano, T. Ise, K. Kato, T. Imamura, H. Izumi, K. Makishima, K. Kohno, *Cancer Res* **2001**, *61*, 1592–1597. Transcriptional activation of the human HMG1 gene in cisplatin-resistant human cancer cells.
- [91] M. Wei, O. Burenkova, S. J. Lippard, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 1769–1773. Cisplatin sensitivity in Hmbg1^{-/-} and Hmbg1^{+/+} mouse cells.
- [92] C. Kunz, K. Zurbriggen, O. Fleck, *Biochem. J.* **2003**, *372*, 651–660. Mutagenesis of the HMGB (high-mobility group B) protein Cmb1 (cytosine-mismatch binding 1) of *Schizosaccharomyces pombe*: effects on recognition of DNA mismatches and damage.
- [93] T. Giraldi, D. M. Taylor, *Biochem. Pharmacol.* **1974**, *23*, 1659–1662. The effects of platinum ethylenediamine dichloride on the template activity of DNA.
- [94] Y. Corda, C. Job, M. F. Anin, M. Leng, D. Job, *Biochemistry* **1991**, *30*, 222–230. Transcription by eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases of DNA modified at a d(GG) or a d(AG) site by the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II).
- [95] Y. Corda, M. F. Anin, M. Leng, D. Job, *Biochemistry* **1992**, *31*, 1904–1908. RNA polymerases react differently at d(ApG) and d(GpG) adducts in DNA modified by cis-diamminedichloroplatinum(II).
- [96] Y. Corda, C. Job, M. F. Anin, M. Leng, D. Job, *Biochemistry* **1993**, *32*, 8582–8588. Spectrum of DNA-platinum adduct recognition by prokaryotic and eukaryotic DNA-dependent RNA polymerases.
- [97] S. Tornaletti, S. M. Patrick, J. J. Turchi, P. C. Hanawalt, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35791–35797. Behavior of T7 RNA polymerase and mammalian RNA polymerase II at site-specific cisplatin adducts in the template DNA.
- [98] H. Kimura, Y. Tao, R. G. Roeder, P. R. Cook, *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 5383–5392. Quantitation of RNA polymerase II and its transcription factors in an HeLa cell: little soluble holoenzyme but significant amounts of polymerases attached to the nuclear substructure.
- [99] M. Hieda, H. Winstanley, P. Maini, F. Iborra, P. Cook, *Chromosome Res.* **2005**, *13*, 135–144. Different populations of RNA polymerase II in living mammalian cells.
- [100] H. Kimura, K. Sugaya, P. R. Cook, *J. Cell Biol.* **2002**, *159*, 777–782. The transcription cycle of RNA polymerase II in living cells.
- [101] R. C. Todd, S. J. Lippard, *Metallomics* **2009**, *1*, 280–291. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds.
- [102] Y. Jung, S. J. Lippard, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 1361–1370. RNA polymerase II blockage by cisplatin-damaged DNA. Stability and polyubiquitylation of stalled

- polymerase.
- [103] A. Tremeau-Bravard, T. Riedl, J. M. Egly, M. E. Dahmus, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 7751–7759. Fate of RNA polymerase II stalled at a cisplatin lesion.
- [104] S. Tornaletti, D. Reines, P. C. Hanawalt, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 24124–24130. Structural characterization of RNA polymerase II complexes arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the transcribed strand of template DNA.
- [105] J. P. Laine, J. M. Egly, *EMBO J.* **2006**, *25*, 387–397. Initiation of DNA repair mediated by a stalled RNA polymerase II.
- [106] C. P. Selby, R. Drapkin, D. Reinberg, A. Sancar, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 787–793. RNA polymerase II stalled at a thymine dimer: footprint and effect on excision repair.
- [107] J. Q. Svejstrup, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2002**, *3*, 21–29. Mechanisms of transcription-coupled DNA repair.
- [108] J. Q. Svejstrup, *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 447–451. Rescue of arrested RNA polymerase II complexes.
- [109] G. E. Damsma, A. Alt, F. Brueckner, T. Carell, P. Cramer, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14*, 1127–1133. Mechanism of transcriptional stalling at cisplatin-damaged DNA.
- [110] H. Kettenberger, K. J. Armache, P. Cramer, *Mol. Cell* **2004**, *16*, 955–965. Complete RNA polymerase II elongation complex structure and its interactions with NTP and TFIIIS.
- [111] A. L. Gnatt, P. Cramer, J. Fu, D. A. Bushnell, R. D. Kornberg, *Science* **2001**, *292*, 1876–1882. Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution.
- [112] B. S. Strauss, *Bioessays* **1991**, *13*, 79–84. The 'A rule' of mutagen specificity: a consequence of DNA polymerase bypass of non-instructional lesions?
- [113] J. S. Taylor, *Mutat. Res.* **2002**, *510*, 55–70. New structural and mechanistic insight into the A-rule and the instructional and non-instructional behavior of DNA photoproducts and other lesions.
- [114] M. Shimizu, B. Rosenberg, *J. Antibiot. (Tokyo)* **1973**, *26*, 243–245. A similar action to UV-irradiation and a preferential inhibition of DNA synthesis in *E. coli* by antitumor platinum compounds.
- [115] K. M. Comess, J. N. Burstyn, J. M. Essigmann, S. J. Lippard, *Biochemistry* **1992**, *31*, 3975–3990. Replication inhibition and translesion synthesis on templates containing site-specifically placed cis-diamminedichloroplatinum(II) DNA adducts.
- [116] Z. Suo, S. J. Lippard, K. A. Johnson, *Biochemistry* **1999**, *38*, 715–726. Single d(GpG)/cis-diammineplatinum(II) adduct-induced inhibition of DNA polymerization.
- [117] G. Villani, U. Hubscher, J. L. Butour, *Nucleic Acids Res.* **1988**, *16*, 4407–4418. Sites of termination of in vitro DNA synthesis on cis-diamminedichloroplatinum(II) treated single-stranded DNA: a comparison between *E. coli* DNA polymerase I and eucaryotic DNA polymerases alpha.
- [118] A. R. Lehmann, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 873–876. Replication of damaged DNA by translesion synthesis in human cells.
- [119] A. J. Rattray, J. N. Strathern, *Annu. Rev. Gen.* **2003**, *37*, 31–66. Error-prone DNA polymerases: when making a mistake is the only way to get ahead.
- [120] S. Prakash, R. E. Johnson, L. Prakash, *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 317–353. Eukariotic translesion synthesis DNA polymerases: specificity of structure and function.
- [121] A. Vaisman, S. G. Chaney, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 13017–13025. The efficiency

- and fidelity of translesion synthesis past cisplatin and oxaliplatin GpG adducts by human DNA polymerase beta.
- [122] A. Vaisman, C. Masutani, F. Hanaoka, S. G. Chaney, *Biochemistry* **2000**, *39*, 4575–4580. Efficient translesion replication past oxaliplatin and cisplatin GpG adducts by human DNA polymerase eta.
- [123] S. S. Daube, G. Tomer, Z. Livneh, *Biochemistry* **2000**, *39*, 348–355. Translesion replication by DNA polymerase delta depends on processivity accessory proteins and differs in specificity from DNA polymerase beta.
- [124] A. Vaisman, S. E. Lim, S. M. Patrick, W. C. Copeland, D. C. Hinkle, J. J. Turchi, S. G. Chaney, *Biochemistry* **1999**, *38*, 11026–11039. Effect of DNA polymerases and high mobility group protein 1 on the carrier ligand specificity for translesion synthesis past platinum-DNA adducts.
- [125] M. R. Albertella, A. Lau, M. J. O'Connor, *DNA Repair (Amst)* **2005**, *4*, 583–593. The overexpression of specialized DNA polymerases in cancer.
- [126] M. R. Albertella, C. M. Green, A. R. Lehmann, M. J. O'Connor, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 9799–9806. A role for polymerase η in the cellular tolerance to cisplatin-induced damage.
- [127] S. G. Chaney, S. L. Campbell, B. Temple, E. Bassett, Y. Wu, M. Faldu, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 1551–1559. Protein interactions with platinum-DNA adducts: from structure to function.
- [128] G. R. Gibbons, W. K. Kaufmann, S. G. Chaney, *Carcinogenesis* **1991**, *12*, 2253–2257. Role of DNA replication in carrier-ligand-specific resistance to platinum compounds in L1210 cells.
- [129] E. L. Mamenta, E. E. Poma, W. K. Kaufmann, D. A. Delmastro, H. L. Grady, S. G. Chaney, *Cancer Res.* **1994**, *54*, 3500–3505. Enhanced replicative bypass of platinum-DNA adducts in cisplatin-resistant human ovarian carcinoma cell lines.
- [130] A. Vaisman, M. Varchenko, A. Umar, T. A. Kunkel, J. I. Risinger, J. C. Barrett, T. C. Hamilton, S. G. Chaney, *Cancer Res.* **1998**, *58*, 3579–3585. The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts.
- [131] E. Bassett, N. M. King, M. F. Bryant, S. Hector, L. Pendyala, S. G. Chaney, M. Cordeiro-Stone, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 6469–6475. The role of DNA polymerase η in translesion synthesis past platinum-DNA adducts in human fibroblasts.
- [132] D. J. Chang, K. A. Cimprich, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 82–90. DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes.
- [133] T. Okuda, X. Lin, J. Trang, S. B. Howell, *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 1852–1860. Suppression of hREV1 expression reduces the rate at which human ovarian carcinoma cells acquire resistance to cisplatin.
- [134] F. Wu, X. Lin, T. Okuda, S. B. Howell, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 8029–8035. DNA polymerase zeta regulates cisplatin cytotoxicity, mutagenicity, and the rate of development of cisplatin resistance.
- [135] X. Lin, J. Trang, T. Okuda, S. B. Howell, *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 563–568. DNA polymerase zeta accounts for the reduced cytotoxicity and enhanced mutagenicity of cisplatin in human colon carcinoma cells that have lost DNA mismatch repair.
- [136] A. Vaisman, C. Masutani, F. Hanaoka, S. G. Chaney, *Biochemistry* **2000**, *39*, 4575–4580. Efficient translesion replication past oxaliplatin and cisplatin GpG adducts by human DNA polymerase η .
- [137] E. Bassett, A. Vaisman, J. M. Havener, C. Masutani, F. Hanaoka, S. G. Chaney, *Biochemistry* **2003**, *42*, 14197–14206. Efficiency of extension of mismatched primer

- termini across from cisplatin and oxaliplatin adducts by human DNA polymerases β and η in vitro.
- [138] C. Masutani, R. Kusumoto, S. Iwai, F. Hanaoka, *EMBO J.* **2000**, *19*, 3100–3109. Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase η .
- [139] A. Alt, K. Lammens, C. Chiocchini, A. Lammens, J. C. Pieck, D. Kuch, K.-P. Hopfner, T. Carell, *Science* **2007**, *318*, 967–970. Bypass of DNA lesions generated during anticancer treatment with cisplatin by DNA polymerase η .
- [140] J. Trincão, R. E. Johnson, C. R. Escalante, S. Prakash, L. Prakash, A. K. Aggarwal, *Mol. Cell* **2001**, *8*, 417–426. Structure of the catalytic core of *S. cerevisiae* DNA polymerase ϵ : implications for translesion DNA synthesis.
- [141] T. A. Steitz, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 17395–17398. DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms.
- [142] S. Avkin, S. Adar, G. Blander, Z. Livneh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 3764–3769. Quantitative measurement of translesion replication in human cells: evidence for bypass of abasic sites by a replicative DNA polymerase.
- [143] S. Avkin, M. Goldsmith, S. Velasco-Miguel, N. Geacintov, E. C. Friedberg, Z. Livneh, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 53298–53305. Quantitative analysis of translesion DNA synthesis across a benzo[a]pyrene-guanine adduct in mammalian cells: the role of DNA polymerase κ .
- [144] N. B. Reuven, G. Tomer, Z. Livneh, *Mol. Cell* **1998**, *2*, 191–199. The mutagenesis proteins UmuD' and UmuC prevent lethal frameshifts while increasing base substitution mutations.
- [145] G. Tomer, Z. Livneh, *Biochemistry* **1999**, *38*, 5948–5958. Analysis of unassisted translesion replication by the DNA polymerase III holoenzyme.
- [146] S. Avkin, Z. Sevilya, L. Toube, N. Geacintov, S. G. Chaney, M. Oren, Z. Livneh, *Mol. Cell* **2006**, *22*, 407–413. p53 and p21 regulate error-prone DNA repair to yield a lower mutation load.
- [147] A. Hendel, O. Ziv, Q. Gueranger, N. Geacintov, Z. Livneh, *DNA Repair* **2008**, *7*, 1636–1646. Reduced efficiency and increased mutagenicity of translesion DNA synthesis across a TT cyclobutane pyrimidine dimer, but not a TT 6-4 photoproduct, in human cells lacking DNA polymerase η .
- [148] S. Shachar, O. Ziv, S. Avkin, S. Adar, J. Wittschieben, T. Reißner, S. Chaney, E. C. Friedberg, Z. Wang, T. Carell, N. Geacintov, Z. Livneh, *EMBO J.* **2009**, *28*, 383–393. Two-polymerase mechanisms dictate error-free and error-prone translesion DNA synthesis in mammals.
- [149] O. Ziv, N. Geacintov, S. Nakajima, A. Yasui, Z. Livneh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 11552–11557. DNA polymerase ζ cooperates with polymerases κ and ι in translesion DNA synthesis across pyrimidine photodimers in cells from XPV patients.
- [150] V. M. Maher, L. M. Ouellette, R. D. Curren, J. J. McCormick, *Nature* **1976**, *261*, 593–595. Frequency of ultraviolet light-induced mutations is higher in xeroderma pigmentosum variant cells than in normal human cells.
- [151] M. J. Pillaire, G. Villani, J. S. Hoffmann, A. M. Mazard, M. Defais, *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 6473–6479. Characterization and localization of cis-diamminedichloroplatinum(II) adducts on a purified oligonucleotide containing the codons 12 and 13 of H-ras proto-oncogene.
- [152] G. A. Burley, J. Gierlich, M. R. Mofid, H. Nir, S. Tal, Y. Eichen, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 1398–1399. Directed DNA metallization.
- [153] F. A. Blommaert, C. P. Saris, *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 1300–1306. Detection of

- platinum-DNA adducts by ^{32}P -postlabelling.
- [154] T. Reißner, S. Schneider, S. Schorr, T. Carell, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3142–3145. Kristallstruktur eines Cisplatin-(1,3-GTG)-Schadens im Komplex mit DNA-Polymerase eta.
- [155] S. Chijiwa, C. Masutani, F. Hanaoka, S. Iwai, I. Kuraoka, *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 388–393. Polymerization by DNA polymerase η is blocked by cis-diamminedichloroplatinum(II) 1,3-d(GpTpG) cross-link: implications for cytotoxic effects in nucleotide excision repair-negative tumor cells.
- [156] R. E. Johnson, S. Prakash, L. Prakash, *Science* **1999**, *283*, 1001–1004. Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Pol eta.
- [157] C. Pieck, Dissertation, LMU München **2007**.
- [158] M. Ober, H. Müller, C. Pieck, J. Gierlich, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18143–18149. Base pairing and replicative processing of the formamidopyrimidine-dG DNA lesion.
- [159] T. S. Krishna, X. P. Kong, S. Gary, P. M. Burgers, J. Kuriyan, *Cell* **1994**, *79*, 1233–1243. Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA.
- [160] L. Haracska, C. M. Kondratik, I. Unk, S. Prakash, L. Prakash, *Mol. Cell* **2001**, *8*, 407–415. Interaction with PCNA is essential for yeast DNA polymerase eta function.
- [161] L. Haracska, M. T. Washington, S. Prakash, L. Prakash, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 6861–6866. Inefficient bypass of an abasic site by DNA polymerase η .
- [162] A. Alt, Dissertation, LMU München **2007**.
- [163] D. L. Ollis, P. Brick, R. Hamlin, N. G. Xuong, T. A. Steitz, *Nature* **1985**, *313*, 762–766. Structure of large fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I complexed with dTMP.
- [164] J. L. Hansen, A. M. Long, S. C. Schultz, *Structure* **1997**, *5*, 1109–1122. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus.
- [165] E. A. Meyer, R. K. Castellano, F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 1210–1250. Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition.
- [166] L. G. Brieba, B. F. Eichman, R. J. Kokoska, S. Doublie, T. A. Kunkel, T. Ellenberger, *EMBO J.* **2004**, *23*, 3452–3461. Structural basis for the dual coding potential of 8-oxoguanosine by a high-fidelity DNA polymerase.
- [167] G. W. Hsu, J. R. Kiefer, D. Burnouf, O. J. Becherel, R. P. P. Fuchs, L. S. Beese, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 50280–50285. Observing translesion synthesis of an aromatic amine DNA adduct by a high-fidelity DNA polymerase.
- [168] Y. Mizushima, H. Motoshima, Y. Yamaguchi, T. Takeuchi, K. Hirano, F. Sugawara, H. Yoshida, *Mar. Drugs* **2009**, *7*, 624–639. 3-O-Methylfunicone, a selective inhibitor of mammalian Y-family DNA polymerases from an Australian sea salt fungal strain.
- [169] N. Sträter, W. N. Lipscomb, T. Klabunde, B. Krebs, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2158–2191. Enzymatische Acyl- und Phosphoryltransferreaktionen unter Beteiligung von zwei Metallionen.
- [170] V. M. Vogt, *Eur. J. Biochem.* **1973**, *33*, 192–200. Purification and further properties of single-strand-specific nuclease from *Aspergillus oryzae*.
- [171] M. Laskowski, *The Enzymes*, 3. Auflage, Academic Press, New York, **1971**.
- [172] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, **1989**.
- [173] M. Wei, S. M. Cohen, A. P. Silverman, S. J. Lippard, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 38774–38780. Effects of spectator ligands on the specific recognition of intrastrand platinum-DNA cross-links by high mobility group box and TATA-binding proteins.
- [174] W. Kabsch, *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 795–800. Automatic processing of rotation

- diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants.
- [175] CCP4, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **1994**, *50*, 760–763. The CCP4 suite: programs for protein crystallography.
- [176] P. Evans, *Joint CCP4 and ESF-EACMB Newsletter on Protein Crystallography* **1997**, *33*, 22–24. SCALA.
- [177] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, L. C. Storoni, R. J. Read, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2005**, *61*, 458–464. Likelihood-enhanced fast translation functions.
- [178] P. D. Adams, R. W. Grosse-Kunstleve, L. W. Hung, T. R. Ioerger, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. J. Read, J. C. Sacchettini, N. K. Sauter, T. C. Terwilliger, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2002**, *58*, 1948–1954. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination.
- [179] E. de La Fortelle, G. Bricogne, *Methods Enzymol.* **1997**, *276*, 472–494. Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for the multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods.
- [180] C. Vonrhein, E. Blanc, P. Roversi, G. Bricogne, *Methods Mol. Biol.* **2007**, *364*, 215–230. Automated structure solution with autoSHARP.
- [181] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **2010**, *in press*. Features and Development of Coot.
- [182] G. N. Murshudov, A. A. Vagin, E. J. Dodson, *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **1997**, *53*, 240–255. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method.
- [183] M. D. Winn, G. N. Murshudov, M. Z. Papiz, *Methods Enzymol.* **2003**, *374*, 300–321. Macromolecular TLS refinement in REFMAC at moderate resolutions.
- [184] I. W. Davis, A. Leaver-Fay, V. B. Chen, J. N. Block, G. J. Kapral, X. Wang, L. W. Murray, W. B. Arendall, 3rd, J. Snoeyink, J. S. Richardson, D. C. Richardson, *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, W375–383. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids.
- [185] F. M. Richards, C. E. Kundrot, *Proteins* **1988**, *3*, 71–84. Identification of structural motifs from protein coordinate data: secondary structure and first-level supersecondary structure.
- [186] A. C. Wallace, R. A. Laskowski, J. M. Thornton, *Protein Eng.* **1995**, *8*, 127–134. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions.
- [187] E. Krissinel, K. Henrick, *J. Mol. Biol.* **2007**, *372*, 774–797. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state.

Lebenslauf Thomas Reißner

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 19. April 1982
Geburtsort: Starnberg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

09/1988 – 09/1992 Grundschule Tutzing
09/1992 – 06/2001 Gymnasium Tutzing
06/2001 Allgemeine Hochschulreife (Abitur) am Gymnasium Tutzing

Studium

10/2001 – 12/2005 Chemie-Studium an der Westfälischen Wilhelms-Universität
Münster
19.03.2003 Vordiplom
06/2005 – 10/2005 Forschungspraktikum an der National University of Singapore
01/2006 – 06/2006 Diplomarbeit in der Gruppe von Prof. Dr. F. Eckehardt Hahn,
Institut für Anorganische und Analytische Chemie,
Westfälische Wilhelms-Universität Münster
28.06.2006 Diplom

Promotion

10/2006 – 10/2010 Dissertation in der Gruppe von Prof. Dr. Thomas Carell,
Institut für Organische Chemie, Ludwig-Maximilians-
Universität München