

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

DNA Photolyasen:
Biochemische Charakterisierung,
Co-Kristallstruktur und Untersuchungen
zum Mechanismus der (6-4) Photolyase aus *Drosophila melanogaster*

Melanie Maul

aus

Würzburg

2009

Erklärung

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

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 27.04.2009



Melanie Maul

Dissertation eingereicht am: 06.05.2009

1. Gutachter: Prof. Thomas Carell
2. Gutachter: Prof. Hendrik Zipse

Mündliche Prüfung: 22.06.2009

Meinen Eltern

Das Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile.

Aristoteles

Danksagung

Meinem Doktorvater, *Prof. Dr. Thomas Carell*, danke ich ganz herzlich für die sehr interessante Themenstellung und die trotz seines engen Terminplans stets vorhandene Diskussionsbereitschaft. Besonders möchte ich mich bei Ihm auch für das entgegengebrachte Vertrauen in meine wissenschaftlichen Fähigkeiten, den experimentellen Freiraum, der viel Platz für eigene Ideen bot, sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen bedanken.

Bei Herrn *Prof. Dr. Hendrik Zipse* möchte ich mich ganz herzlich für die freundliche Übernahme des Koreferates bedanken.

Den Mitarbeitern *Claudia Gräf*, *Frau Voss* und *Frau Gärtner* danke ich für die große Hilfsbereitschaft, in den organisatorischen Herausforderungen des Laboralltags.

Meinen Kooperationspartnern *Prof. Dr. Ilme Schlichting*, *Anna Scherer*, *Max Cryle* und *Thomas Barends* vom MPI für medizinische Forschung in Heidelberg danke ich für die gute und fruchtbare Zusammenarbeit.

Meinen Diplomanten, Bachelor-Studenten und Praktikanten *Emine Kaya*, *Almut Haberer*, *Dorothea Matschkal* und *Franz Wiedemann* danke ich für ihr hohes Engagement und ihre große Motivation, die damit wesentlich zur experimentellen Arbeit beigetragen haben.

Allen ehemaligen und aktuellen Kollegen des Arbeitskreis Carell danke ich für die sehr inspirierende und angenehme Arbeitsatmosphäre. Durch zahlreiche Grillabende, Cocktailparties und gemeinsame Ausflüge sorgten sie für die entsprechende Ablenkung vom Laboralltag. Besonders möchte ich dabei *Andreas Glas* und *Dr. Ulrich Hennecke* für die gemeinsame Arbeit am Photolyase-Projekt danken. Ohne ihre kritischen Diskussionen und die Bereitschaft auch eher unkonventionelle Ideen zu verfolgen, hätten (Die Frösche musst du alleine extrahieren Andy!) wir auf einige Ergebnisse verzichten müssen. Des Weiteren Danke ich der Biochemie, *Dr. Markus Müller* für Rat und Tat in allen biochemischen und computertechnischen Belangen, *Dr. Sabine Schneider* für die doch sehr umfangreiche Einführung in die Welt der Kristallographie und ihrer Geduld während der langen, doch häufig wenig erfolgreichen Nächte im Synchrotron. Als „harten

Kern“ der Biochemie danke ich *Ralf Strasser* und *Dr. Carsten Pieck* für ein offenes Ohr in allen biochemischen und sonstigen Fragen, die häufig bei dem einen oder anderen Bier am Abend geklärt werden konnten.

Bei *Dr. Sabine Schneider*, *Dr. Markus Müller*, *Andreas Glas*, *Ralf Strasser* und *Dr. David Kuch* möchte ich mich insbesondere für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Meinen Mädels *Stephanie Schorr* (danke für die unzähligen Bergaktionen und das Funpark-Klettern!), *Dr. Aline Gégout*, *Eva Jahn*, *Claudia Gräf*, *Emine Kaya*, *Katrin Gutschmiedl* und *Dr. Claudia Chiocchini* möchte ich für ihre Unterstützung und die schöne gemeinsame Zeit danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Freund *David Kuch* (Dr. Oigel) für den stetigen Rückhalt und seine Unterstützung bedanken. Durch sein Wochenend-Bergsport-Programm sorgte er stets für meinen körperlichen Ausgleich neben der Arbeit.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, ohne deren permanente Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Liste der Publikationen

1. M.J. Maul, A.F. Glas, M. Cryle, T.R.M. Barends, S. Schneider, E. Kaya, I. Schlichting, T. Carell, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, »*The Archaeal Cofactor F_0 is a Light Harvesting Antenna in Eukaryotes.*«, in Druck
2. M.J. Maul, T.R.M. Barends, A.F. Glas, M.J. Cryle, T. Domratheva, S. Schneider, I. Schlichting, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10076-10080. »*Structure and mechanism of a DNA (6-4) photolyase.*«
3. A.F. Glas, S. Schneider, M.J. Maul, U. Hennecke, T. Carell, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, »*Synthesis, Crystal Structure and (6-4) Photolyase Mediated Repair of DNA Containing T(6-4)T, T(6-4)T, T(Dew)T, and T(Dew)C DNA Photolesions.*«, submitted
4. D.M. Hammond, A. Manetto, J. Gierlich, V.A. Azov, P.M.E. Gramlich, G.A. Burley, M. Maul, T. Carell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4184–4187. »*DNA Photography: An Ultrasensitive DNA-Detection Method Based on Photographic Techniques.*«

Konferenzbeiträge

1. Poster Präsentation: A.F. Glas, M.J. Maul, S. Schneider, T. Carell, *XIVth Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Compounds*, Český Krumlov, Czech Republic, 08.-13. Juni **2008**. New Insights into Photorepair.
2. Vortrag: M.J. Maul, *SFB749-Symposium*, Wildbad-Kreuth, 25.-27. März **2008**. Photoreactivation by (6-4) Photolyase.
3. Poster Präsentation: M.J. Maul, A.F. Glas, U. Hennecke, T. Carell, *Nacon VII, International Meeting on Recognition Studies in Nucleic Acids*, Sheffield, UK, 01.-05. April **2007**. Photoreactivation by (6-4) Photolyase.

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	11
2	SUMMARY	14
3	EINLEITUNG	17
3.1	DNA SCHÄDEN	17
3.2	DNA REPARATURSYSTEME	18
3.3	UV-SCHÄDEN	19
3.3.1	<i>Der CPD Schaden</i>	20
3.3.2	<i>Der (6-4) Schaden und sein Dewar-Valenz Isomer</i>	21
3.3.3	<i>Folgen UV-geschädigter DNA</i>	23
3.4	DIE FAMILIE DER PHOTOLYASEN UND CRYPTOCHROME.....	24
3.4.1	<i>Die CPD Photolyasen</i>	26
3.4.2	<i>Die (6-4) Photolyase</i>	35
3.4.3	<i>Cryptochrome</i>	38
3.5	DAS F ₀ -COENZYM.....	41
3.5.1	<i>Überblick</i>	41
3.5.2	<i>Biosynthese von Deazariboflavinen</i>	42
3.5.3	<i>Das Redoxsystem der Deazaflavine</i>	44
3.5.4	<i>Spektroskopische Eigenschaften der Deazaflavine</i>	47
3.5.5	<i>Deazaflavine als Coenzyme der enzymatischen Photoreversion</i>	47
4	AUFGABENSTELLUNG	49
5	MATERIAL UND METHODE	50
5.1	MATERIAL	50
5.1.1	<i>Chemikalien</i>	50
5.1.2	<i>Spezielle Anwendungen</i>	50
5.1.3	<i>Enzyme</i>	51
5.1.4	<i>Plasmide ohne Insert</i>	51
5.1.5	<i>Bakterienstämme</i>	52
5.1.6	<i>Geräte</i>	52
5.1.7	<i>DNA- und Proteinstandards</i>	55
5.1.8	<i>Puffer, Medien und Stammlösungen</i>	56
5.1.9	<i>Datenbanken und Programme</i>	56
5.1.10	<i>Bioinformatische Anwendungen</i>	58
5.2	MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	59
5.2.1	<i>Herstellung elektrokompetenter Zellen</i>	59
5.2.2	<i>Transformation von elektrokompetenten E. coli</i>	59

5.2.3	<i>Transformation von chemisch-kompetenten Zellen</i>	60
5.2.4	<i>Stammhaltung</i>	60
5.2.5	<i>Induktion der Proteinexpression der (6-4) Photolyase</i>	60
5.2.6	<i>Induktion der Proteinexpression der CPD Photolyase</i>	61
5.2.7	<i>Aufschluss im Durchflusshomogenisator</i>	61
5.2.8	<i>Aufschluss mit der French-Press</i>	62
5.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	63
5.3.1	<i>DNA Isolierung</i>	63
5.3.2	<i>Agarosegelelektrophorese</i>	65
5.3.3	<i>DNA-Konzentrationsbestimmung</i>	66
5.3.4	<i>Restriktionsverdau von DNA</i>	66
5.3.5	<i>PCR – Polymerase-Ketten-Reaktion</i>	67
5.3.6	<i>Ortsspezifische Mutagenese</i>	69
5.3.7	<i>Gateway®-Technologie</i>	70
5.4	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	74
5.4.1	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	74
5.4.2	<i>Proteinquantifizierung</i>	76
5.4.3	<i>Proteinreinigung</i>	77
5.4.4	<i>Rekonstitution der (6-4) Photolyase</i>	80
5.4.5	<i>Ermittlung der Bindungskonstanten von F_0</i>	81
5.4.6	<i>Reparaturassay mit der (6-4) Photolyase</i>	81
5.4.7	<i>^{18}O-Reparaturassay</i>	82
5.5	KRISTALLISATION DER (6-4) PHOTOLYASE	83
5.5.1	<i>Herstellung eines polyklonalen Antikörpers</i>	84
5.5.2	<i>Antikörper-Reinigung mittels Affinitätschromatographie</i>	84
5.5.3	<i>Immunspezifische Affinitätsreinigung über das Antigen</i>	85
5.5.4	<i>Immunpräzipitation</i>	85
5.5.5	<i>Western Blot</i>	86
5.5.6	<i>Strippen der Membran</i>	87
5.6	ANALYTISCHE METHODEN	88
5.6.1	<i>Tryptischer Peptidverdau</i>	88
5.6.2	<i>HPL-Chromatographie</i>	90
5.6.3	<i>Fluoreszenz- und UV/VIS-Spektroskopie</i>	90
5.7	CHEMISCHE SYNTHESE DES F_0-COFAKTORS	91
5.7.1	<i>Analytik und verwendete Geräte</i>	91
5.7.2	<i>Allgemeine Arbeitsmethoden</i>	92
5.7.3	<i>Synthese von F_0</i>	93
6	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	98

6.1	CHARAKTERISIERUNG DER (6-4) PHOTOLYASE	98
6.1.1	<i>Homologievergleich der Photolyase/Cryptochrom Superfamilie</i>	98
6.1.2	<i>Klonierung und Expression der (6-4) Photolyase aus D. melanogaster</i>	102
6.1.3	<i>Analytische Größenausschlusschromatographie</i>	107
6.1.4	<i>Spektroskopische Eigenschaften der gereinigten (6-4) Photolyase</i>	108
6.2	REKONSTITUTION DER (6-4) PHOTOLYASE	110
6.2.1	<i>Synthese des F₀-Coenzyms</i>	110
6.2.2	<i>Rekonstituierung des zweiten Cofaktors der (6-4) Photolyase</i>	114
6.2.3	<i>Bestimmung der Bindungskonstanten von F₀</i>	115
6.3	REPARATUR DES (6-4) PHOTOPRODUKTS	116
6.3.1	<i>Bestimmung des pH-Optimums</i>	117
6.3.2	<i>Bestimmung der optimalen Enzymmenge und der Belichtungszeit</i>	118
6.3.3	<i>Standard-Aktivitätsassay für die (6-4) Photolyase</i>	119
6.3.4	<i>Vergleich der Aktivität vor und nach Rekonstitution mit F₀</i>	120
6.4	NACHWEIS DES F ₀ COFAKTORS IN VIVO	122
	CO-KRISTALLISATION DER (6-4) PHOTOLYASE	129
6.4.1	<i>Kristallisation mit T(6-4)T und T(6-4)C-Schaden enthaltender DNA</i>	129
6.4.2	<i>Diffraktionsanalyse der (6-4) Photolyase</i>	130
6.4.3	<i>Strukturanalyse der (6-4) Photolyase</i>	131
6.4.4	<i>Co-Kristallisationsversuche mit F₀</i>	135
6.4.5	<i>Das aktive Zentrum</i>	136
6.4.6	<i>His365, His369 und Tyr423 sind essentiell für die Funktion der (6-4) Photolyase</i>	139
6.5	ZUSAMMENFASSUNG, DISKUSSION UND AUSBLICK	142
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	149
8	LITERATURVERZEICHNIS	154
9	ANHANG	165

1 Zusammenfassung

Neben der fehlerfreien Weitergabe der genetischen Information während der Zellteilung durch einen intakten Replikationsapparat, ist auch die Aufrechterhaltung der genetischen Integrität der DNA durch Reparaturenzyme entscheidend für das Überleben der Zellen, sowie für einen gesunden Organismus. Um die genomische Integrität zu wahren, entwickelten sich im Laufe der Evolution verschiedene Mechanismen, u.a. die Exzisionreparatur von geschädigter DNA oder die direkte chemische Reversion der DNA Schäden. Letztere wird durch die Proteinfamilie der Photolyasen katalysiert, welche die einzigartige Fähigkeit besitzen, Pyrimidindimere mit Hilfe von UV-A/B- oder Blaulicht ($\lambda = 320\text{-}500\text{ nm}$) zu spalten. Je nach Art des Substrates lassen sich die Photolyasen in die CPD und die (6-4) Photolyasen unterteilen. Die (6-4) Photolyasen zeigen untereinander, auf die gesamte Sequenzlänge bezogen, eine Homologie von lediglich 25 %. Im Gegensatz zu den CPD Photolyasen existierten von den (6-4) Photolyasen keine genaueren Informationen über die Zusammensetzung der Cofaktoren sowie über den Mechanismus der Photoreaktivierung, der möglicherweise über ein kurzlebiges Oxetanintermediat verläuft. Aufgrund spektroskopischer Messungen von *X. laevis* (6-4) Photolyase wurde vermutet, dass auch, wie bei den CPD Photolyasen, FAD als einer der beiden möglichen Cofaktoren vertreten ist.⁽¹⁾ Ein zweites, lichtsammelndes Chromophor konnte jedoch bisher nicht identifiziert werden.

Der Deazaflavin-Cofaktor ist ein weitverbreitetes Coenzym mit unterschiedlichen Aufgaben. Als Redox-Cofaktor F_{420-n} tritt er häufig in methanogenen Bakterien auf, als F_0 in Photolyasen dient er, als Lichtantenne, der Erweiterung des Absorptionsspektrums. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das F_0 für Rekonstituierungsexperimente synthetisiert werden. Dabei zeigte sich in Rekonstitutionsversuchen mittels UV- und Fluoreszenzspektroskopie, dass von den vier bekannten Cofaktoren, FAD, FMN, MTHF und F_0 , lediglich das F_0 in Rekonstitutionsversuchen an die (6-4) Photolyase gebunden wurde. Die Bestimmung

der Enzymaktivität nach der Rekonstituierung mit F_0 zeigte eine 5-fach erhöhte Aktivität unter den zuvor festgelegten Standardbedingungen. Der F_0 Cofaktor konnte zusätzlich auch direkt in *D. melanogaster*, durch Extraktion aus den Fliegen nachgewiesen werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden erstmals vier Co-Kristallstrukturen der nativen (6-4) Photolyase aus *D. melanogaster* erhalten: Das Enzym im Komplex mit dem T(6-4)T (2.0 Å) sowie dem T(6-4)C Schaden (2.9 Å) im aktiven Zentrum, das Enzym im Komplex mit dem T(6-4)T Schaden und dem gebundenen F_0 Cofaktor (2.1 Å) und schließlich die Photolyase mit dem T(6-4)T Schaden nach Reparatur durch Reduktion mit Na-Dithionit und Weißlicht (2.7 Å). Die Strukturen zeigen hohe Ähnlichkeit zu den bereits bekannten Strukturen aus der Familie der Photolyasen und Cryptochrome. Die N-terminale α/β -Domäne ist über einen interdomänen *Loop* mit der C-terminalen FAD-bindenden, helikalen Domäne verbunden. Zudem öffnet die (6-4) Photolyase wie die CPD Photolyase⁽²⁾ während der Schadenserkenkung die DNA vollständig und das Dimer wird um fast 180° in die aktive Tasche des Enzyms gedreht (*dinucleotide-flipping*) (Abb. 1-1).

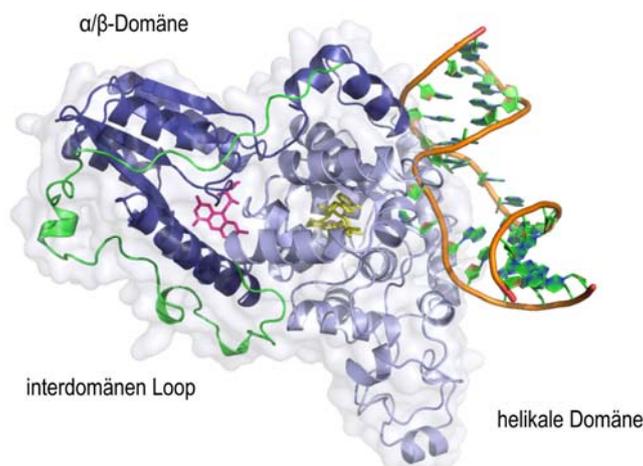


Abbildung 1-1: Struktur der (6-4) Photolyase aus *Drosophila melanogaster* im Komplex mit dem (6-4) Schaden. Die N-terminale Domäne ist in dunkelblau und die katalytische α -helikale Domäne ist in hellblau dargestellt. Über das Modell wurde eine semitransparente Proteinoberfläche gelegt. Der FAD und F_0 Cofaktor sind in gelb und pink abgebildet.

2 Summary

Next to the error-free DNA replication during cell division, it is also essential for the survival of cells and a healthy organism to maintain its genetic integrity through various repair systems. To preserve genetic integrity, organisms evolved different mechanisms like the excision repair mechanism or the direct chemical reversal of damaged DNA. The latter is catalyzed by the family of photolyases. Photolyases are able to split pyrimidine dimers by using near UV- or blue light ($\lambda = 320\text{-}500\text{ nm}$). With regard to the substrate photolyases are referred to as CPD or (6-4) photolyases. The (6-4) photolyases exhibit a sequence homology of only 25 %. In contrast to the CPD photolyases there is little known about their cofactor composition and repair mechanism which probably involves a short-lived oxetane intermediate. From spectroscopic analysis of *X. laevis* (6-4) photolyase and analogy to CPD photolyases it was proposed that one of the possible cofactors is a FAD.⁽¹⁾ A second, light harvesting chromophore had not been identified.

The deazaflavin-cofactor is a common coenzyme with various functions. It is often found as redox-cofactor F_{420-n} in methanogenic bacteria and broadens the action spectra of the photolyases as F_0 light antenna. In this work the F_0 cofactor was synthesized for reconstitution experiments. From the four known cofactors, FAD, FMN, MTHF and F_0 , only F_0 was found to bind to the enzyme during reconstitution. The enzyme activity after reconstitution with F_0 exhibited a 5-fold increase of activity under standard conditions. It was also shown that F_0 is present in native *D. melanogaster* by extraction of the flies.

Four co-crystal structures of the native (6-4) photolyase from *Drosophila melanogaster* were obtained for the first time in the second part of this work. The enzyme in complex with T(6-4)T lesion (2.0 Å) and the T(6-4)C lesion (2.9 Å) in the active site, the enzyme in complex with the T(6-4)T lesion and the bound F_0 cofactor (2.1 Å) and finally photolyase with the repaired T(6-4)T lesion after activation through reduction with Na-dithionite and white light (2.7 Å). These structures show high similarity with known structures of the photolyase and cryptochrome family. The

2 Summary

N-terminal α/β -domain is connected to the FAD-binding, helical C-terminal domain via an interdomain loop. Furthermore, like the CPD photolyases⁽²⁾ the (6-4) photolyase opens the DNA completely and the dimer flips out of the duplex into the active site (*dinucleotide-flipping*)(Fig. 1-1).

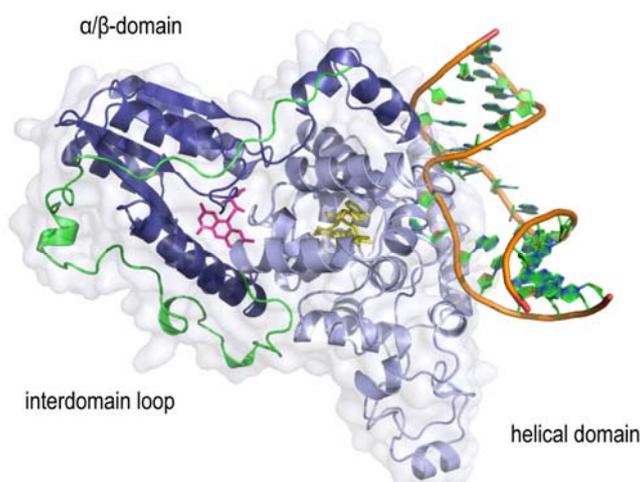


Abbildung 2-1: Structure of the (6-4) photolyase from *Drosophila melanogaster* in complex with the (6-4) lesion with a semitransparent surface. The N-terminal domain is shown in dark-blue and the catalytical α -helical domain in light-blue. The FAD and the F_0 cofactor are shown in yellow and in pink.

In addition, co-crystal structures of the T(6-4)T and the T(6-4)C Dewar-Valence isomere were obtained at 2.9 Å and 2.6 Å. However, the electron densities were ambiguous.

A catalytical triade His365-His369-Tyr423 was identified based on the structural data and additional mutation studies (Fig. 1-2). Two further co-crystal structures of the mutants H365N and H369M were obtained (both 3.2 Å). These results, together with ENDOR-spectroscopic experiments, did not provide evidence for the existence of an oxetane intermediate during repair. The recently postulated mechanism of a radical pyrimidine C5 intermediate in this work was confirmed by repair experiments with U(6-4)T lesion containing DNA. As expected, the repair of the U(6-4)T lesion was less efficient than the repair of the T(6-4)T lesion.

2 Summary

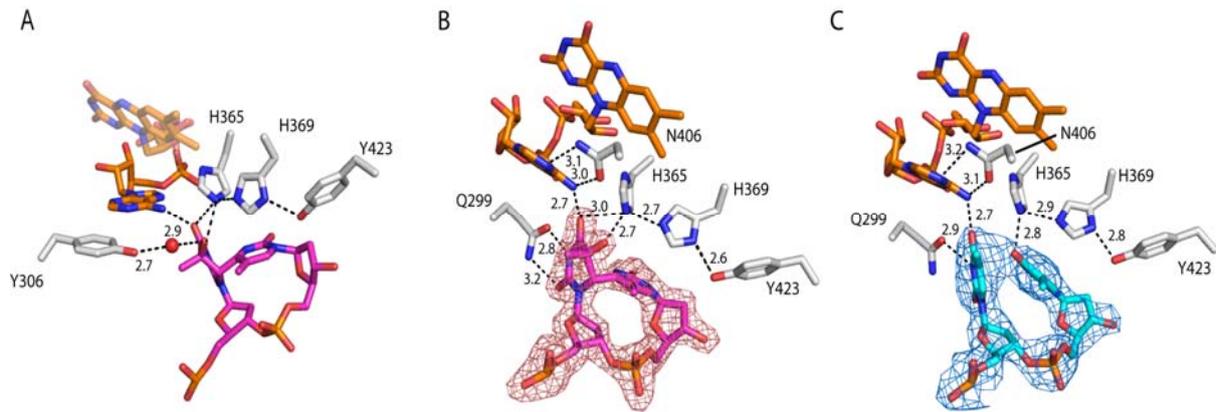


Abbildung 2-2: Structure of the active site of the (6-4) photolyase. (A) Catalytic residues and hydrogen-bonding to O5 of the pyrimidins and Tyr306 of the water molecule. (B-C) Fo-DFc-electron density map of the lesion before *simulated annealing* in CNS. (C) T(6-4)T lesion before (pink) and (C) after repair (blue), contoured at 3σ level. FAD is shown in orange and selected residues in the active site in grey.

3 Einleitung

3.1 DNA Schäden

Erst 21 Jahre nach der Entdeckung der DNA^(3, 4) als Träger der genetischen Information durch James Watson und Francis Crick, realisierte Crick, dass die primäre Struktur der DNA nicht, wie bisher angenommen, gegen jeglichen äußeren Einfluss stabil ist und dass offensichtlich verschiedene Reparaturmechanismen existieren müssen, die deren genetische Integrität gewährleisten.⁽⁵⁾

Selbst unter physiologischen Bedingungen ist die DNA ständigen Veränderungen in ihrer Primärstruktur ausgesetzt, wie dem Verlust von Purinen durch Hydrolyse der Bindung zwischen Zucker und Phosphatrückgrat^(6, 7) oder der Transformation von Cytosin zu Uracil durch Deaminierung. Auch stoffwechselbedingte, reaktive Metabolite wie *reactive oxygen species* (ROS) oder *reactive nitrogen species* (RNS) können leicht mit den Basen der DNA reagieren und dadurch die codierenden Informationen ändern oder vollständig auslöschen. Hinzu kommen eine Reihe externer Faktoren, welche die genetische Integrität beeinflussen. Hierzu gehören u.a. eine Vielzahl an Chemikalien (z.B. alkylierende Reagenzien) sowie radioaktive und UV Strahlung. Allen gemein ist die Fähigkeit mutagene, oder sogar zytotoxische Schäden zu verursachen, die zu fehlerhafter Transkription bzw. Replikation oder zu deren vollständigen Erliegen und zum Zelltod führen können. Die am häufigsten auftretenden Schäden, bei denen entweder einzelne Basen oder Nukleoside, mehrere Nukleoside oder das Zucker-Phosphat-Rückgrat betroffen sein können, sind oxidative Schäden,⁽⁸⁾ *bulky adducts*,⁽⁹⁾ UV Schäden⁽¹⁰⁾ sowie Einzel- und Doppelstrangbrüche⁽¹¹⁾ (Abb. 3-1 A). In Anbetracht der schädlichen Einflüssen auf die DNA ist es nicht verwunderlich, dass sich im Laufe der Evolution diverse Mechanismen entwickelt haben, die in der Lage sind die entstandenen Schäden zu beseitigen.

3.2 DNA Reparatursysteme

Die DNA-Reparatur lässt sich aufgrund unterschiedlicher Mechanismen in drei Gruppen unterteilen (Abb. 3-1 A). Zum Einen können die Schäden durch direkte Reversion in die intakten Basen überführt werden. Zum Zweiten kann die Reparatur durch Entfernen und Ersatz der geschädigten Strukturen erfolgen (*excision repair*).⁽¹²⁾ Zum Dritten werden Strangbrüche, die das Zucker-Phosphatrückgrat betreffen, durch *single-strand break repair* (SSBR) oder *double-strand break repair* (DSBR) behoben.⁽¹²⁾ Im letzteren Fall existieren mehrere Möglichkeiten, den Strangbruch zu entfernen, wobei die Reparatur meist über homologe Rekombination oder nicht-homologes *end-joining* erfolgt.

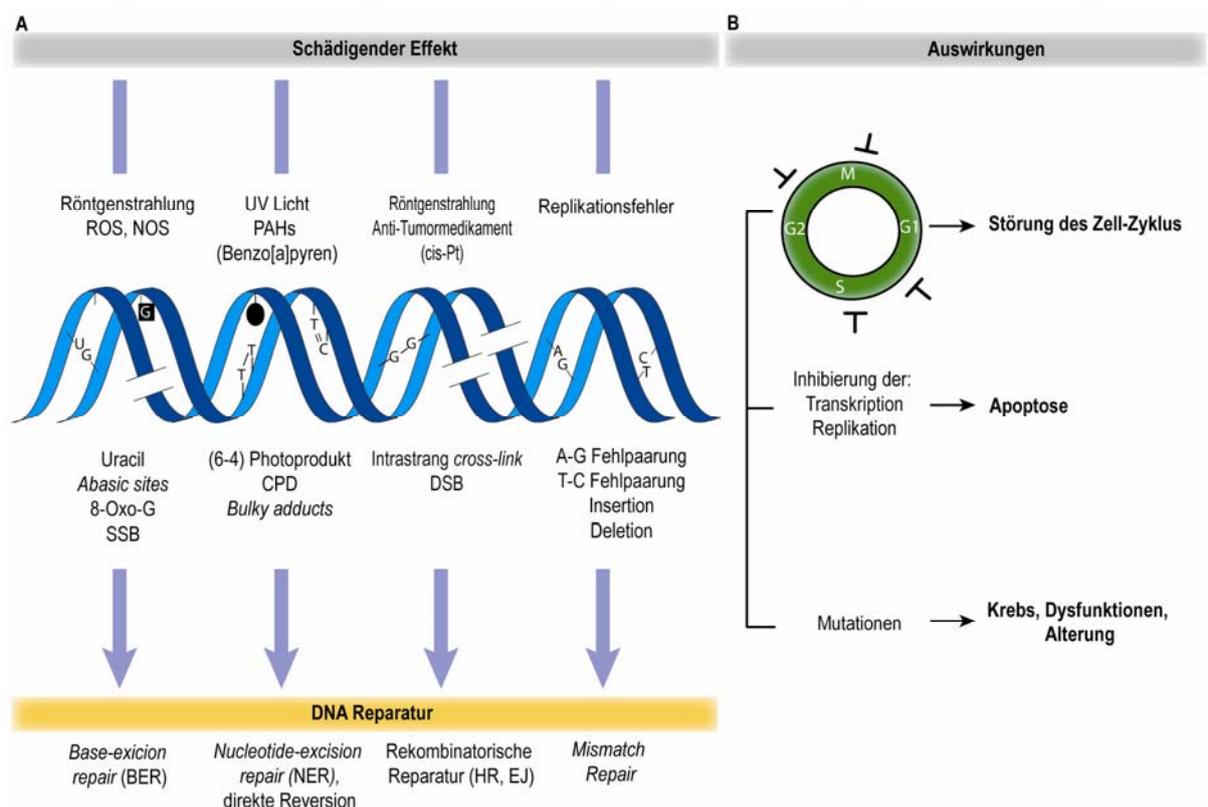


Abbildung 3-1: (A) Ursachen und Reparaturmechanismen von DNA Schäden. (B) Folgen nicht reparierter Schäden in der DNA. HR= homologe Rekombination; EJ= end-joining; PAH= polyzyklische, aromatische Kohlenwasserstoffe.

Die Exzisionsreparatur, welche sich in *base excision repair* (BER), *nucleotide excision repair* (NER) und *mismatch repair* (MMR) gliedern lässt,⁽¹²⁻¹⁵⁾ beinhaltet das Schneiden des geschädigten Stranges, das Entfernen der fehlerhaften Nukleotide, die neu-Synthese der entfernten Nukleotide und letztlich die Ligation der Fragmente. Da die Art der DNA-Synthese nicht-semikonservativ (keine vollständige Strang-Synthese) statt findet, wird sie auch als Reparatursynthese bezeichnet.⁽¹⁶⁾ BER, NER und MMR unterscheiden sich neben der Schadensspezifität auch im biochemischen Mechanismus der Schadenserkenkung und der Zusammensetzung und Komplexizität der Reparaturenzyme.

3.3 UV-Schäden

Die Erforschung der Auswirkungen von UV Strahlung auf Organismen läutete in den 40er Jahren den Beginn der Erforschung der DNA Reparatur ein.⁽¹⁷⁾ Dabei stellte *Kelner* fest, dass der letale Effekt von UV Strahlung auf *Streptomyces griseus*, durch erneute Bestrahlung der Bakterienkolonien mit Licht des sichtbaren Bereiches, verhindert werden kann.⁽¹⁸⁾ Die Konsequenzen der Schädigung der DNA durch UV Strahlung sowie deren Reparatur stellen heute eines der am besten untersuchten Modelle im Bereich der DNA Reparatur dar. Aus biologischer Sicht ist UV Strahlung einer der bedeutendsten schädigenden Faktoren für die Organismen. Als wichtiges Mutagen für frühe Lebensformen trug sie wahrscheinlich zur Steigerung der genetischen Vielfalt bei, Stoffwechselprozesse wie die Photosynthese oder die lichtabhängige Vitamin D Bildung konnten sich unter ihrem Einfluss entwickeln; aber auch Mechanismen, die zur Anpassung an die damals enorm hohe UV-Strahlung aufgrund der mutmaßlich noch nicht existierenden Stratosphäre dienten, wurden geschaffen.

Die Basen der DNA enthalten konjugierte aromatische Ringstrukturen, durch die UV Strahlung mit Wellenlängen von 260 nm und länger absorbiert wird. Die stark schädigende UV-C Strahlung (100 nm - 295 nm) im Bereich des Absorptionsmaximums der DNA (260 nm) wird fast vollständig von der Ozonschicht

der Erde zurückgehalten. Jedoch werden die beiden am häufigsten auftretenden UV Schäden, das Cyclobutanpyrimidindimer (CPD) und das (6-4) Photoprodukt bzw. dessen Dewar-Valenz Isomer, auch unter dem Einfluss der UV-B Strahlung (295 nm - 320 nm) gebildet. In beiden Fällen kommt es dabei zur photochemischen Reaktion zweier benachbarter Pyrimidinbasen durch [2+2] Cycloaddition (Abb. 3-1 A).⁽¹⁰⁾

Weiterhin existieren verschiedene, weniger häufig auftretende UV-induzierte oxidative Schäden (z.B. 8-OxoG). Sie werden durch den UV-A Anteil (320 nm - 400 nm) des Sonnenlichts und endogene *Photosensitizer* (Riboflavin oder Porphyrinen), unter Bildung von ROS bzw. RNS, erzeugt (Abb. 3-1 A).^(16, 19)

3.3.1 Der CPD Schaden

Bei 80 bis 90 % aller Photoschäden handelt es sich um *cis-syn* CPD Schäden. Der CPD Schaden entsteht durch die [2+2] Cycloaddition zweier benachbarter Pyrimidine zwischen den jeweiligen C5-C6 Doppelbindungen (Abb. 3-2).^(10, 20-22) Von den vier möglichen Konfigurationen *cis-syn*, *cis-anti*, *trans-syn* oder *trans-anti*, existiert in der doppelsträngigen B-DNA, aufgrund der vorgegebenen Orientierung der Basen, nur das *cis-syn* Isomer.^(23, 24) Thymin besitzt die niedrigste Triplettenergie und ist damit der bessere Akzeptor beim Energietransfer innerhalb der DNA, wodurch sich für die Bildungswahrscheinlichkeit der CPD Schäden folgende Häufigkeitsverteilung ergibt: 5'-T<>T-3' > 5'-T<>C-3' > 5'-C<>T-3' > 5'-C<>C-3' (Verhältnis: 68:16:13:3 bei 254 nm).⁽¹⁶⁾ Daneben beeinflussen auch die flankierenden Sequenzen die Schadensentstehung.

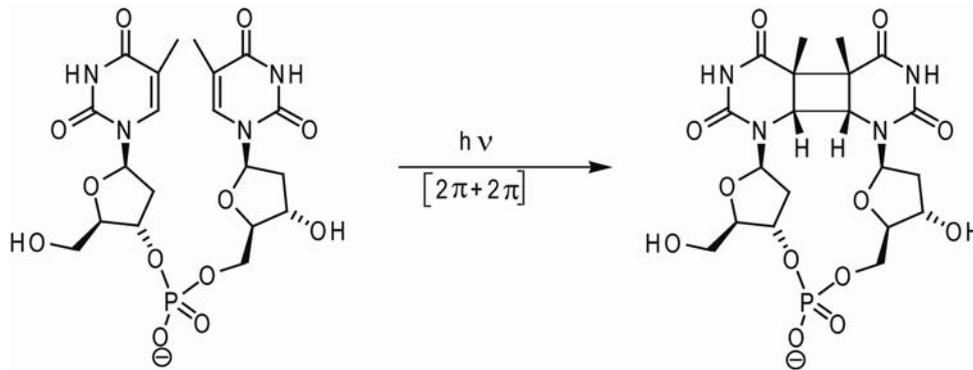


Abbildung 3-2: Bildung des T(CPD)T Schadens.

Die Kristallstruktur eines DNA Oligonukleotides mit 5'-T<>T-3' CPD Schaden zeigt einen Knick der Helix um etwa 30° in Richtung der *major groove* sowie die Öffnung der DNA um etwa 9°. Die Auswirkungen auf die DNA Struktur ist insgesamt nicht sehr groß. Der CPD Schaden ist im Vergleich zu anderen Schäden wie den *bulky adducts* oder dem (6-4) Schaden sterisch wenig störend.⁽²⁵⁾ Am 3'-T des Dimers kann weiterhin Watson-Crick Basenpaarung statt finden, am 5'-T allerdings ist die Basenpaarung mit Adenin stark geschwächt, da die Wasserstoffbrückenbindungen nur geschwächt ausgebildet werden können.

3.3.2 Der (6-4) Schaden und sein Dewar-Valenz Isomer

Das Pyrimidin-Pyrimidon (6-4) Photoaddukt, oder das (6-4) Photoprodukt, ist der zweithäufigste Photoschaden. Er tritt jedoch deutlich seltener als der CPD Schaden auf, wobei die Schadensverteilung in den Zellen nicht bekannt ist. Belichtungen von Zellen mit UV-B Strahlung ergaben ein Verhältnis von (6-4) zu CPD Schaden von 1:3. Der (6-4) Schaden ist das Resultat einer Paternò-Büchi Reaktion zwischen der C5-C6 Doppelbindung eines 5'-Pyrimidins und dem C4-Heteroatom eines 3'-Pyrimidins, wodurch ein instabiles heterozyklisches Oxetan Intermediat entsteht, das sich durch Deprotonierung des N3 des 3'-Pyrimidins öffnet und im Anschluss isomerisiert (Abb. 3-3).^(10, 26-29) Handelt es sich bei der 3'-Base um ein Cytosin, reagiert dessen Imin-Tautomer unter Entstehung des Azetidin Intermediates, das,

3 Einleitung

genau wie das instabile Oxetan, unter Ringöffnung in den (6-4) Schaden zerfällt. Die entstandenen Photoprodukte sind leicht zu detektieren, da sie eine charakteristische Eigenabsorption bei 326 nm (T(6-4)T Schaden) bzw. 314 nm (T(6-4)C Schaden) zeigt. Unter UV Strahlung entsteht das (6-4) Photoprodukt vorwiegend an 5'-T<>C-3' und 5'-T<>T-3' Sequenzen und selten an 5'-C<>C-3' bzw. 5'-C<>T-3' Sequenzen.⁽¹⁶⁾ Wie bei den CPD Schäden ist auch hier eine Abhängigkeit von den flankierenden Sequenzen zu beachten. Da bisher noch keine Kristallstruktur eines DNA Stranges mit (6-4) Schaden existierte, konnten Aussagen über die Störung und damit die Destabilisierung der DNA-Helix nur aus UV-Denaturierungsexperimenten und NMR Messungen erhalten werden. Es zeigte sich dabei, dass das (6-4) Photoprodukt offensichtlich eine deutlich schwerere sterische Störung der Doppelhelix verursacht, als der CPD Schaden. Der neu entstandene Pyrimidonring scheint nicht mehr an der Basenpaarung beteiligt zu sein. Aus energetischen Gründen wird anstelle von Adenin Guanin während des Überlesens des Schadens durch eine Polymerase bevorzugt eingebaut.⁽³⁰⁻³²⁾

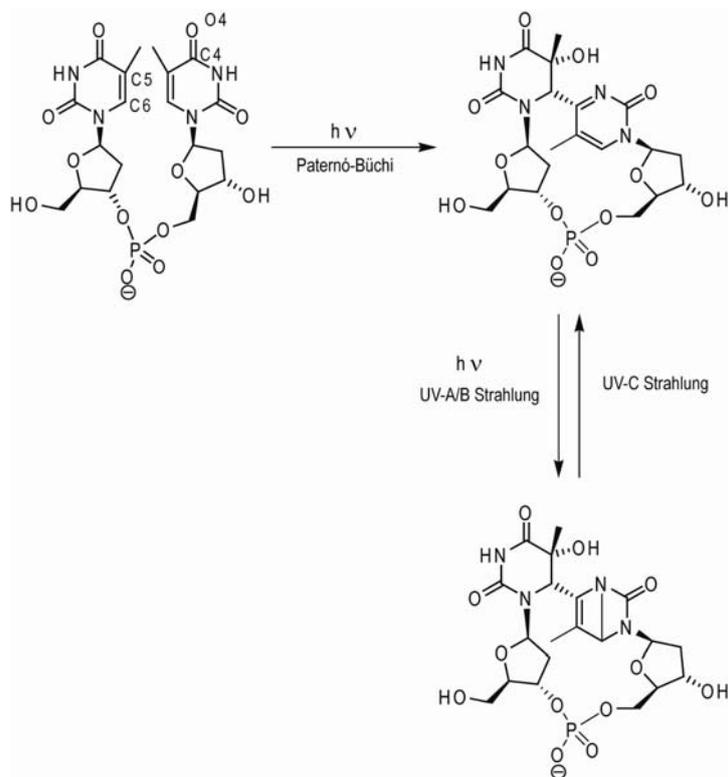


Abbildung 3-3: Bildung des T(6-4)T Schadens und dessen Dewar-Valenz Isomer.

Die Belichtung des (6-4) Photoproduktes mit Wellenlängen um 312 nm führt, wie in Abb. 3-3 dargestellt, zur Bildung des Dewar-Valenz Isomers.^(21, 33, 34) Experimente mit Hamsterzellen zeigten unter Einfluss künstlichen Sonnenlichts, d.h. UV-A und UV-B-Strahlung, eine deutlich erhöhte Bildung von Dewar-Valenz Isomeren.⁽³⁵⁾ Aufgrund der biologischen Relevanz des wissenschaftlich bislang vernachlässigten Isomers, gewinnt dieses jedoch immer mehr an Interesse. Ähnlich dem (6-4) Schaden kommt es auch hier zur Verzerrung des DNA Doppelstranges, und erneut scheint Guanin gegenüber dem 3'-Ende des Schadens anstelle von Adenin bevorzugt eingebaut zu werden.⁽³⁶⁾

3.3.3 Folgen UV-geschädigter DNA

In gesunden Geweben herrscht ein physiologisches Gleichgewicht (Homöostase), das durch Signalkaskaden zwischen den Zellen sowie innerhalb einer Zelle, deren Proliferation und Differenzierung steuert. Störungen des Signalweges auf Protein- oder mRNA-Ebene zeigen unter normalen Umständen keine langfristigen negativen Auswirkungen auf die Homöostase, da sowohl Proteine als auch mRNA kontinuierlich erneuert werden. Dagegen stellen Eingriffe in Form von strukturellen Veränderungen in der Primärstruktur der DNA eine enorme Gefahr für die korrekte Signaltransduktion dar. Die permanente fehlerhafte Codierung der Proteine auf DNA-Ebene oder der eventuelle vollständige Verlust eines Gens, das für ein Protein eines Signalweges codiert, kann ohne die beschriebenen Reparatursysteme, zu Mutationen, Dysfunktionen mit Folgen wie Onkogenese oder Zelltod führen (Abb. 3-1 B).

Der CPD und der (6-4) Schaden sind, wie bereits erwähnt, die am häufigsten auftretenden, mutagenen Photoschäden.⁽¹⁶⁾ Sie verursachen charakteristische C > T Mutationen und CC > TT Tandem Mutationen in Dipyrimidinsequenzen,⁽³⁷⁻³⁹⁾ die v.a. in den Proto-Oncogenen der *Ras*-Familie sowie den Tumorsuppressorgenen *p53* und *PTCH* lokalisiert sind. Insbesondere die CC > TT Tandem Mutation ist spezifisch für UV Strahlung, sie ist sozusagen der Fingerabdruck des Sonnenlichts in unserem

Genom. Die Häufigkeit, mit der diese Gene in Hautkrebszellen mutiert vorliegen, liegt bei Personen mit intaktem Reparatursystem zwischen 30 - 60 %, bei *Xeroderma pigmentosum* Patienten (XP) steigt sie auf bis zu 50 - 80 % an. Nach UV Exposition zeigen die XP-Patienten zusätzlich eine Hypermutation der Gene. Xeroderma pigmentosum (XP) ist eine seltene autosomal, rezessive Krankheit, die sich in unterschiedlichen Varianten äußert. Die betroffenen Personen zeigen als Hauptmerkmal eine extrem hohe Lichtempfindlichkeit und Hautkrebsentwicklung, da entweder ein Defekt in der NER, oder ein beschädigtes postreplikatives Reparatursystem vorliegt.⁽⁴⁰⁻⁴²⁾ Daneben ergaben *in vivo* Studien, dass insbesondere der CPD Schaden die Ursache der UV-bedingten Störung des Zellzyklus ist und damit zum überwiegenden Teil zur Karzinogenese beiträgt. Das karzinogene Potential des (6-4) Photoproduktes ist dagegen deutlich geringer. Diese Läsion führt in den meisten Fällen zur frühzeitigen Apoptose der geschädigten Zellen.^(43, 44)

3.4 Die Familie der Photolyasen und Cryptochrome

Grundsätzlich erfolgt die Reparatur der UV Schäden in jedem Organismus über einen oder mehrere der in Kapitel 3.2 beschriebenen Mechanismen. In Eukaryoten, Archaea und Bakterien findet die Reparatur überwiegend durch *nucleotide excision repair* statt, in Säugern wie dem Menschen ausschließlich. Daneben existieren Mechanismen wie die Photoreaktivierung, d.h. die direkte Reversion des Photoschadens durch die Gruppe der Photolyasen, die hocheffizient und spezifisch für den entsprechenden Schaden sind.^(18, 45, 46) Aufgrund der hohen Substratspezifität lassen sich die Photolyasen in drei Gruppen einteilen: **CPD Photolyasen** sind in fast allen Lebensreichen präsent⁽⁴⁷⁾ und entfernen CPD Schäden aus der DNA.^(22, 48-50) Sie lassen sich auf Basis ihrer Sequenzidentität in Klasse I DNA Photolyasen, zu denen Bakterien, Pilze und Haloarchaea zählen, und Klasse II DNA Photolyasen, die u.a. in Eukaryoten, wenigen Bakterien, pathogenen sowie einigen parasitären Organismen zu finden sind, gliedern.⁽⁴⁷⁾ Des Weiteren wurde vor kurzem eine dritte Klasse an DNA Photolyasen identifiziert.

Ihnen gehören bisher 20 Bakterien an, die in naher Verwandtschaft mit den Pflanzencryptochromen stehen und teilweise Photolyaseaktivität zeigen.⁽⁵¹⁾

Die Reparatur des (6-4) Photoproduktes wird durch die entsprechenden **(6-4) Photolyasen** katalysiert, die bisher nur in einigen Eukaryoten gefunden werden konnten.⁽⁵²⁾ Die Reversion von Dipyrimidinen in Einzelstrang-DNA wird dagegen von der Familie der Cry-DASH Proteine katalysiert, welche in Pflanzen, Bakterien und Tieren zu finden sind.^(53, 54) **Cryptochrome** sind den Photolyasen hinsichtlich Sequenzidentität und Struktur extrem ähnlich. Allerdings konnte keine Photolyaseaktivität festgestellt werden. Sie treten hauptsächlich in Tieren und Pflanzen auf, bei denen sie in den circadianen Rhythmus involviert sind und die lichtabhängige Entwicklung der Pflanzen steuern.⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾

3.4.1 Die CPD Photolyasen

Photolyasen sind monomere Proteine mit einem Molekulargewicht von 55 - 65 kDa (450 - 550 AS).⁽²¹⁾ Durch gleichzeitige oder nachfolgende Bestrahlung der Organismen mit Blaulicht (350 - 450 nm), sind sie in der Lage die schädigenden Effekte des UV Lichtes (200 - 300 nm) durch Photoreversion umzukehren.^(18, 58) Photolyasen enthalten als redox-aktiven Cofaktor immer ein nicht-kovalent gebundenes Flavin-Adenin Dinukleotid (FAD). Zusätzlich wird das Absorptionsspektrum der Photolyasen durch einen zweiten, als Lichtantenne fungierenden Cofaktor erweitert, bei dem es sich entweder um ein Folat (5,10-Methenyltetrahydrofolylpolyglutamat, MTHF) oder Deazaflavin (8-Hydroxy-5-deazaflavin, 8-HDF/F₀), handelt.^(21, 46) Eine weitere Einteilung der Photolyasen kann somit auch aufgrund der Zugehörigkeit zur Klasse des Deazaflavin-Typs oder der Folat-Typ Photolyasen erfolgen.

3.4.1.1 Evolution der Photolyasen

Die weite taxonomische Verbreitung der Photolyasengene lässt darauf schließen, dass die Entwicklung der Photolyasen bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Evolution begann.^(47, 59) Phylogenetische Untersuchungen ergaben, dass es sich bei der ersten Photolyase aller Wahrscheinlichkeit nach um eine CPD Photolyase handelte. Durch die mindestens 8-fache Genduplikation des ursprünglichen Photolyasengens (Abb. 3-4), welche der Teilung der Reiche in Bakterien und Eukarya vorangegangen sein muss, entstanden die uns bekannten unterschiedlichen Photolyasetypen.⁽⁴⁷⁾ Im Laufe der Evolution gingen Photolyasengene mehrfach verloren und erhielten z.T. neue Funktionen, etwa in Form von Cryptochromen. *Lucas-Lledó et al.* beobachteten,⁽⁵⁹⁾ dass die Photolyasengene in Prokaryoten eine Verlustrate aufweisen, die dreimal höher ist, als ein einzelner Basenaustausch in 16s rRNA. Parallel zum Genverlust erwarben Prokaryoten mit ähnlicher Rate neue Gene durch horizontalen Gentransfer. Folglich zeigten Bakterien im Laufe der Evolution ein enorm variables Repertoire an Photolyasen.

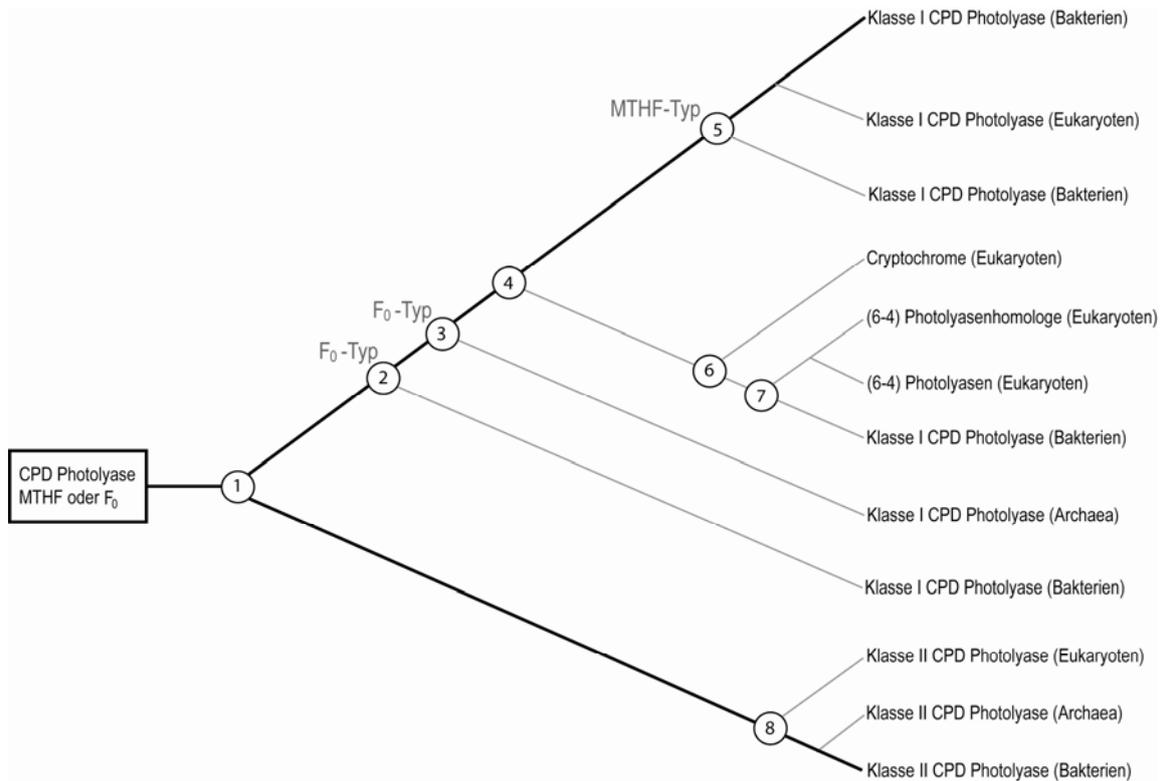


Abbildung 3-4: Evolutionäre Entwicklung der Photolyasen-Familie. Die Zahlen 1 - 8 geben die Anzahl der Genduplikationen, vor der Teilung in Bakterien und Eukaryoten, wieder.

Generell sind Enzyme, die unter hohem Selektionsdruck stehen, hoch-effizient. Enzyme, die einem geringen Selektionsdruck unterliegen, zeigen geringe Effizienz, verlieren ihre Funktion oder gehen im Verlauf der Evolution vollständig verloren. Berechnungen ergaben, dass die natürliche Selektion der Photolyasengene bei Bakterien im Durchschnitt deutlich höher ist, als bei Eukaryoten. Dementsprechend sollte die Effizienz der eukaryotischen Photolyasen, aufgrund geringeren Selektionsdrucks, niedriger ausfallen oder gar vollständig verloren gegangen sein.⁽⁶⁰⁾ Säuger beispielsweise stehen durch die Existenz alternativer DNA-Reparatursysteme sowie einer vergleichsweise niedrigen UV Strahlung in deren Umwelt unter geringem Selektionsdruck. Allerdings sollte die geringe effektive Populationsgröße der Säuger das vollständige Auslöschen des Photolyasengens verhindern. Dennoch weisen sie keine Photolyasen auf, was nach *Lynch* darin begründet liegt, dass die Funktion des

Photolyasengens nicht beibehalten werden kann, wenn der Selektionsvorteil der DNA Reparatur durch Photolyasen kleiner als $1/2N_e$ in einem diploiden Eukaryoten ist, wobei N_e die effektive Populationsgröße darstellt.⁽⁶¹⁾ Zudem könnte eine weitere Erklärung sein, dass die UV Strahlung in der Umgebung der Organismen so gering ausfiel, dass die Photolyasengene überflüssig wurden. Dies würde zur Anhäufung von Mutationen im betreffenden Gen, bis hin zu dessen Auslöschung führen.⁽⁵⁹⁾

Auch der zweite Cofaktor, das MTHF oder das F_0 , scheint sich im Laufe der Evolution innerhalb der Proteinfamilie geändert zu haben. Welches der beiden Chromophore zuerst in den Photolyasen existierte und wie die weitere Verbreitung statt fand ist noch nicht geklärt. In beiden Fällen gäbe es eine Möglichkeit, das erste Auftreten des jeweiligen Cofaktors zu erklären. Da MTHF im Gegensatz zu F_0 weit verbreitet und deutlich häufiger in Organismen zu finden ist, wäre es möglich, dass dieser Cofaktor als erster in Photolyasen integriert wurde. Andererseits ist F_0 , wie von *Kim et al.* gezeigt,⁽⁶²⁾ der bessere Photoakzeptor, der die damalige hohe UV-Strahlung effizienter nutzen konnte. F_0 könnte im Laufe der Zeit durch MTHF ersetzt worden sein, da die UV-Belastung zum Einen abnahm und zum Anderen MTHF für die Organismen leichter zugänglich war.⁽⁴⁷⁾

3.4.1.2 Primäre Struktur

Bisher konnten 70 potentielle Photolyasen (NCBI) identifiziert werden, deren Sequenzhomologie im Bereich von 15 % - 70 % variiert. Die 150 AS des C-terminalen Endes weisen die höchste Sequenzhomologie unter allen Klassen der CPD wie auch der (6-4) Photolyasen auf.⁽⁶³⁾ Deshalb wurde vermutet, dass es sich dabei um die FAD-Bindungsdomäne handelt, was später durch biochemische Untersuchungen⁽⁶⁴⁾ sowie kristallographische Daten⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾ bestätigt wurde. Der N-terminale Bereich ist dagegen wenig konserviert, dennoch kann zwischen einzelnen Photolyaseklassen eine gewisse Homologie festgestellt werden, woraus die Einteilung in Klasse I, II und III CPD Photolyasen^(68, 69) und (6-4) Photolyasen⁽⁵²⁾ resultiert. Darüber hinaus zeigen Photolyasen keine Sequenzhomologien zu anderen Flavoproteinen, was darin begründet ist, dass die Aktivität der Photolyasen auf einem angeregten, zweifach reduzierten $FADH^-$ beruht, wohingegen andere Proteine FAD in

seinem Grundzustand nutzen.⁽⁷⁰⁾ Abbildung 3-6 A zeigt den schematischen Aufbau der Photolyase/Cryptochrom-Familie.

3.4.1.3 Cofaktoren

3.4.1.3.1 Flavin

FAD, die am häufigsten in Enzymen auftretende Form des Flavins, ist nicht nur maßgeblich an der Bindung der geschädigten DNA beteiligt, sondern als redox-aktiver Cofaktor auch essentiell für die katalytische Reaktion. Das Chromophor ist nicht-kovalent an die Photolyasen gebunden und liegt in seiner aktiven, zweifach-reduzierten Form, FADH^- , vor (Abb. 3-5). Unter physiologischen Bedingungen wird das FAD in seiner oxidierten Form (FAD_{ox}) synthetisiert und als solches in das Apoenzym integriert.^(64, 71, 72) Es wird vermutet, dass die Überführung in die aktive Form durch Photoreduktion von mehreren, in dessen Nähe befindlichen Tyrosin- und Tryptophanreste, statt findet.⁽⁷³⁻⁷⁵⁾

3.4.1.3.2 Deazaflavin

Als zweiten, lichtsammelnden Cofaktor verwenden Photolyasen des Deazaflavin-Typs, 8-Hydroxy-7,8-didemethyl-5-deazariboflavin (8-HDF, F_0) (Abb. 3-5).⁽⁷⁶⁾ Der zweite Chromophor ist weder an der Bindung des Substrates, noch an dessen Umsatz beteiligt und damit nicht essentiell für das Enzym. Durch einen größeren Extinktionskoeffizienten und ein Absorptionsmaximum bei längeren Wellenlängen als FADH^- , steigert F_0 die Quantenausbeute des Enzyms und somit die Reparaturrate um das bis zu 100-fache.^(71, 76, 77)

3.4.1.3.3 MTHF

Das Pterin, 5,10-Methenyl-tetrahydrofolat, tritt in der Mehrzahl der Photolyasen auf (Abb. 3-5), wobei die Anzahl der Glutamatreste von drei bis sechs variiert. Die Energietransferrate zum FADH^- ist um die Hälfte geringer als die des Deazaflavins, was dessen Effektivität als Photoantenne herabsetzt.^(21, 45, 46)

Neben F_0 und MTHF wurden auch FAD und FMN (Flavin-Adenin Mononukleotid) in einigen thermophilen Bakterien als weitere Cofaktoren entdeckt.^(78, 79)

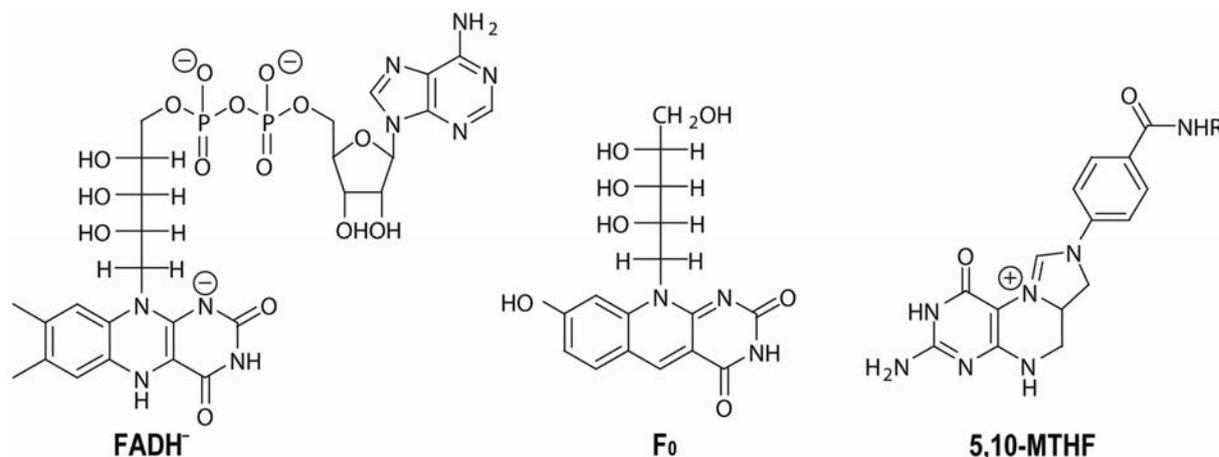


Abbildung 3-5: Cofaktoren der Photolyasen bzw. Cryptochrome. R =Glutamatreste.

3.4.1.4 Die Kristallstruktur der CPD Photolyasen

Die ersten Kristallstrukturen von *Park et al.*^(65, 66) und *Tamada et al.*⁽⁶⁷⁾ zeigten die Klasse I CPD Photolyasen von *E. coli* und *A. nidulans*. Beide Strukturen weisen eine für DNA-bindende Proteine ungewöhnliche, globuläre Struktur des Proteins auf und zeigen, trotz geringer Sequenzhomologie, die gleiche Architektur: Eine N-terminale α/β -Domäne und eine C-terminale α -helikale Domäne, in der sich das FAD in einer ungewöhnlichen U-förmigen Konformation befindet. Der Cofaktor ist durch eine Öffnung in der Mitte der helikalen Domäne einfach zugänglich. Dies erklärt die Anfälligkeit des FADs gegenüber Oxidation während der Reinigung des Proteins

(Abb. 3-6 C). Die Diffusion des Chromophors bleibt jedoch aufgrund der geringen Größe der Öffnung aus. Der zweite Cofaktor bindet zwischen der α/β -Domäne und der α -helikale Domäne.⁽²¹⁾ Allerdings zeigen sich enorme Unterschiede in den Bindetaschen von F_0 und MTHF. Während das F_0 im Inneren des Enzyms aus *A. nidulans* gebunden vorliegt, befindet sich das MTHF aus *E. coli* nahe an der Proteinoberfläche und ist relativ schwach mit dem Enzym assoziiert (Abb. 6-3 B). Der mittlere Abstand zwischen dem FAD und dem zweiten Cofaktor beträgt in der *A. nidulans* Photolyase 17.4 Å, in der *E. coli* Photolyase 16.4 Å (Abstand zwischen den Zentren der Isoalloxazine, bzw. dem N5 des MTHFs).⁽⁴⁶⁾ Photochemische Studien zeigten, dass der zweite Cofaktor durch *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) zum $FADH^{\cdot-}$ zur Reparatur beiträgt. Nach Förster ist der Energietransfer günstig, wenn der interchromophore Abstand klein und die Orientierung der Übergangs-Dipolmomente von Akzeptor und Donor identisch ist.^(21, 70) Trotz des geringeren Abstandes in der *E. coli* Photolyase, beträgt dessen Energie-transfer Effizienz nur 70 %⁽⁸⁰⁾, im Gegensatz zur Photolyase aus *A. nidulans*, die eine Effizienz von 100 %⁽⁸¹⁾ aufweist. Die Proteinstrukturen liefern die Erklärung dieses Phänomens: Die Dipolmomente von Donor und Akzeptor der *E. coli* Photolyase besitzen eine Orientierung von fast 90° zueinander, die der *A. nidulans* Photolyase dagegen nur 35.6 Å, wodurch die größere Entfernung der Moleküle leicht kompensiert wird.^(65, 67)

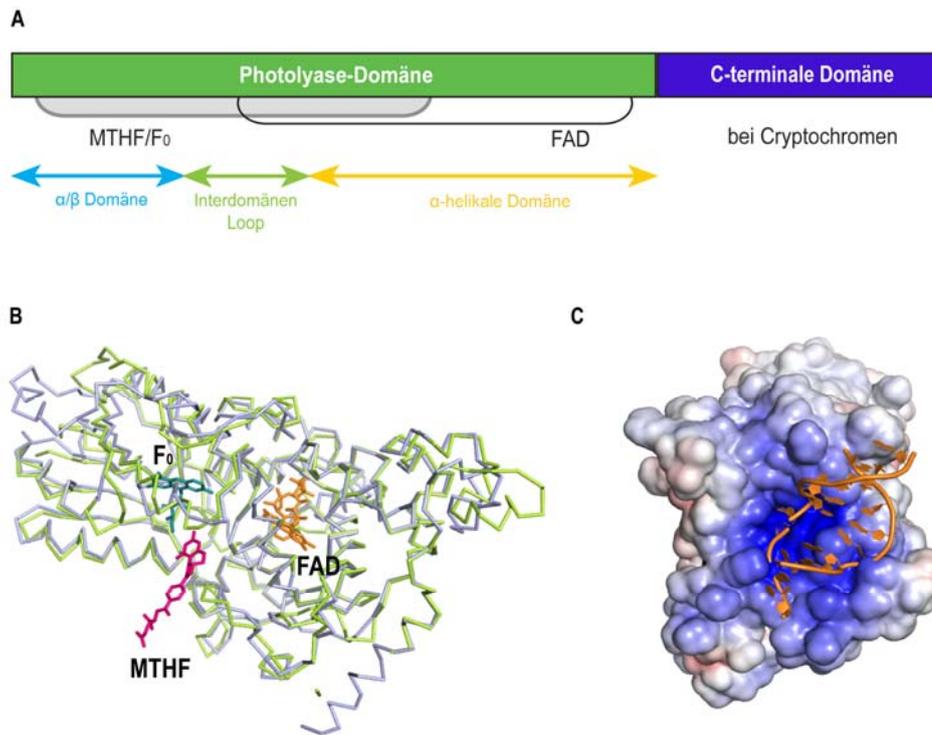


Abbildung 3-6: (A) Schematische Darstellung der Photolyase/Cryptochrom-Familie. (B) Vergleich der *E. coli* CPD Photolyase (hellgrün) (Cofaktoren: MTHF, FAD) und der *Anacystis nidulans* CPD Photolyasen (hellblau) (Cofaktoren F₀, FAD) sowie die Lage ihrer Cofaktoren. (C) Elektrostatisches Potential der *A. nidulans* CPD Photolyase. Die Kavität mit dem FAD-Cofaktor ist weiß umrandet; rot und blau repräsentieren negative und positive Ladungen (ABPS/Pymol).^(82, 83)

Die erste Co-Kristallstruktur einer CPD Photolyase aus *A. nidulans* und eines CPD-Schaden enthaltenden DNA-Doppelstranges zeigte, dass sich die Struktur des Proteins durch DNA-Bindung nur minimal ändert. Das Protein öffnet dabei die DNA vollständig und klappt den Schaden um annähernd 180° aus dem Duplex in die aktive Tasche (*dinucleotide-flipping*).⁽²⁾

3.4.1.5 Substratbindung

Die Photolyase bindet die DNA nicht nur aufgrund der spezifischen Struktur des DNA Rückgrates, sie erkennt insbesondere die Struktur des Schadens und ist somit vollkommen sequenzunabhängig.⁽²¹⁾ Die Bindungsaffinität von einzel- und

doppelsträngigem Substrat ist für CPD Photolyasen vergleichbar. Die spezifische Bindungskonstante für das *cis-syn* Thymidindimer beträgt $K_s = 10^{-9}$ M, für die unspezifische DNA-Bindung hingegen $K_s = 10^{-4}$ M.^(84, 85) Die Spezifität der Bindung wird durch mehrere Faktoren beeinflusst: Zum Einen eine positiv geladene Furche an der Proteinoberfläche, an der sich die DNA über das negativ geladene Phosphatrückgrat anlagern kann. Weiterhin eine Öffnung in der α -helikalen Domäne mit den exakten Ausmaßen für das Dimer und zum Anderen konservierte hydrophobe Reste in der aktiven Tasche sowie das FAD im Inneren der Öffnung. Die Bindetasche besitzt mehrere aromatische Tryptophanreste, die den herausgedrehten Schaden durch π - π -Interaktionen binden. Letztlich wird das Dimer durch eine Vielzahl an Wasserstoffbrückenbindungen in der Tasche stabilisiert.^(2, 21)

3.4.1.6 Reparaturmechanismus der CPD Photolyase

Zunächst erfolgt die lichtunabhängige Bindung des Schadens. Im Anschluss wird das Dimer aus der DNA in die aktive Tasche des Enzyms gedreht, was zur Bildung eines stabilen Enzym/Substrat-Komplexes führt, der in einem nächsten lichtabhängigen Schritt, in der Bildung eines Enzym/Produkt-Komplexes resultiert. Dabei absorbiert der zweite Cofaktor ein Photon im UV-/Blaulicht Bereich (350 nm - 450 nm) und transferiert die Anregungsenergie durch FRET auf das FADH^- , welches wiederum ein Elektron auf das Dimer überträgt und dieses durch [2+2] Cycloreversion in die intakten Basen überführt. Schließlich wird das FADH^- durch Rücktransfer des Elektrons auf das radikalische Semichinon, FADH^\bullet , regeneriert (Abb. 3-7).^(21, 46, 70)

3 Einleitung

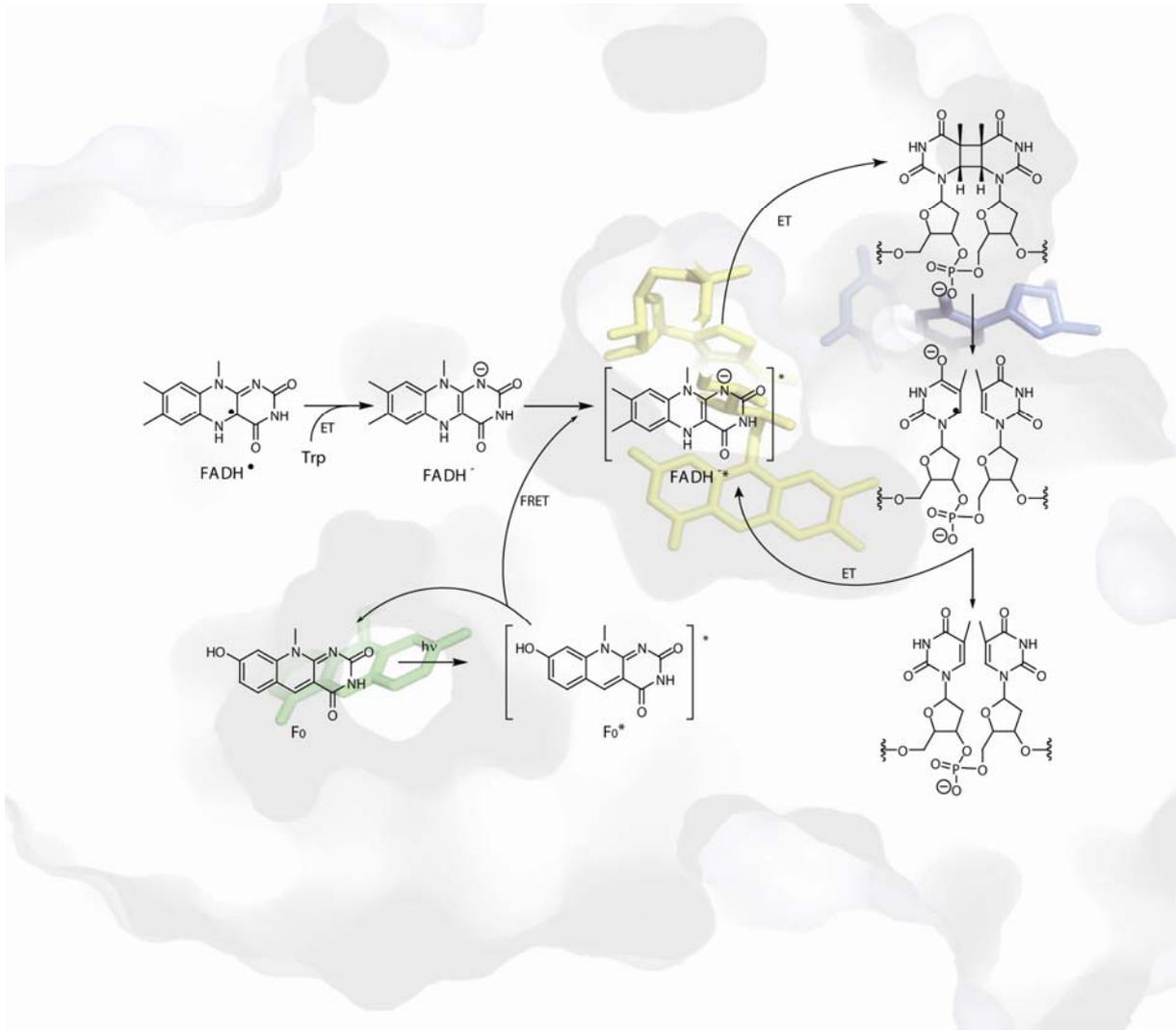


Abbildung 3-7: Reaktionsmechanismus der CPD Photolyasen der Deazaflavinklasse. ET=Elektronentransfer, FRET= *fluorescence resonance energy transfer*.

3.4.2 Die (6-4) Photolyase

Durch direkte Belichtung oder mit Hilfe von CPD Photolyasen können die C5-C5 und die C6-C6 σ -Bindung der Cyclobutan Dimere gespalten, und die intakten Basen hergestellt werden. Im Gegensatz dazu würde die bloße Spaltung der C5-OH und der C6-C4 Bindung des (6-4) Photoprodukts zwei geschädigte Basen zur Folge haben. Das betreffende Reparaturenzym muss deshalb in der Lage sein, sowohl die Spaltungsreaktion, als auch eine Transferreaktion zu katalysieren.⁽²¹⁾ Lange Zeit wurde vermutet, dass der (6-4) Schaden sowie sein Dewar-Valenz Isomer in allen Organismen allein durch *nucleotide excision repair* entfernt wird.^(86, 87) Die (6-4) Photolyasen, die beide Eigenschaften (Lyse und Transfer) vereinen, wurden 1993 erstmals in *Drosophila melanogaster*⁽⁵²⁾, später in *Xenopus laevis*⁽⁸⁸⁾ und *Arabidopsis thaliana*⁽⁸⁹⁾ entdeckt. Sie konnten bisher weder in Säugern noch in Bakterien nachgewiesen werden. Erste Untersuchungen hinsichtlich Sequenz, Struktur und Cofaktoren zeigten, dass die (6-4) Photolyasen eine hohe Homologie zu den klassischen CPD Photolyasen aufweisen, weshalb auch von einem ähnlichen Reaktionsmechanismus ausgegangen wurde.^(22, 88, 90, 91) Fehlende strukturelle Daten und unzureichende spektroskopische Studien, mangels ausreichender Proteinausbeuten sowie undefiniertes Protein im Hinblick auf die Chromophore, verhinderten bisher einen fundierten Einblick in den Reparaturmechanismus, als auch in die Existenz und Art des zweiten Cofaktors.

3.4.2.1 Substratbindung

Die spezifische Bindungskonstante der (6-4) Photolyase für doppelsträngige DNA mit (6-4)-Schaden beträgt $K_s=10^{-9}$ M. Einzelsträngige, (6-4) Schaden enthaltende DNA und DNA mit Dewar-Valenz Isomer wird ebenfalls gebunden, jedoch mit geringerer Affinität.⁽⁴⁶⁾ Auch hier wird aufgrund der Sequenzhomologie zu den CPD Photolyasen auf einen ähnlichen Erkennungs- und Bindungsmechanismus der DNA geschlossen.

3.4.2.2 Photoreaktivierung

Die Reparatur des CPD Schadens erfolgt mit einer Quantenausbeute von $\Phi = 0.7$, die des (6-4) Schadens mit lediglich $\Phi = 0.11$.⁽⁹²⁾ Trotz geringer Quantenausbeute und unterschiedlicher funktioneller Gruppen am C4 der 3'-Base katalysiert die (6-4) Photolyase zuverlässig die Reparatur des T(6-4)C sowie des T(6-4)T Schadens. Dies lässt darauf schließen, dass der Transfer der Amino- oder Hydroxylgruppe während der Reparatur über eine intramolekulare Reaktion innerhalb des Substrates statt findet.^(92, 93)

Analog zu den CPD Photolyasen wird wahrscheinlich auch hier das FAD entweder durch direkte Lichtabsorption oder durch FRET eines zweiten Chromophores in den angeregten, reduzierten Zustand versetzt (Abb. 3-8). Die Reparatur des Schadens durch die (6-4) Photolyasen warf erneut die Frage nach dem Oxetan bzw. Azetidin auf, das ein wichtiges Zwischenprodukt während der Reparatur darstellt. *Hitomi et al.*⁽⁹⁴⁾ zeigten, dass durch Mutation von zwei, in (6-4) Photolyasen hoch-konservierten Histidinresten (His354 und His358) deren katalytische Aktivität vollständig verloren geht, und dass zudem die Reparaturrate stark pH-Wert abhängig ist. Es wird angenommen, dass die Anordnung der Histidine H-Bindung zum N3 des 3'-Pyrimidons und der Hydroxylgruppe des 5'-Pyrimidins erlaubt. Dadurch könnte das His358 ein Proton von der 5-OH Gruppe der 5'-Base abstrahieren und gleichzeitig His354 das N3 der 3'-Base protonieren, um ein hoch-elektrophiles Iminiumion zu erzeugen. Der nukleophile Angriff am kationischen 3'-C4 durch ein freies Elektronenpaar eines Sauerstoffanions führt zur Bildung des Oxetanintermediates, welches im Anschluss durch Elektronentransfer des FADH^- in eine intakte Base und eine Base mit radikalischem Anion zerfällt. Letzteres überträgt sein Elektron zurück auf das FADH° .^(94, 95)

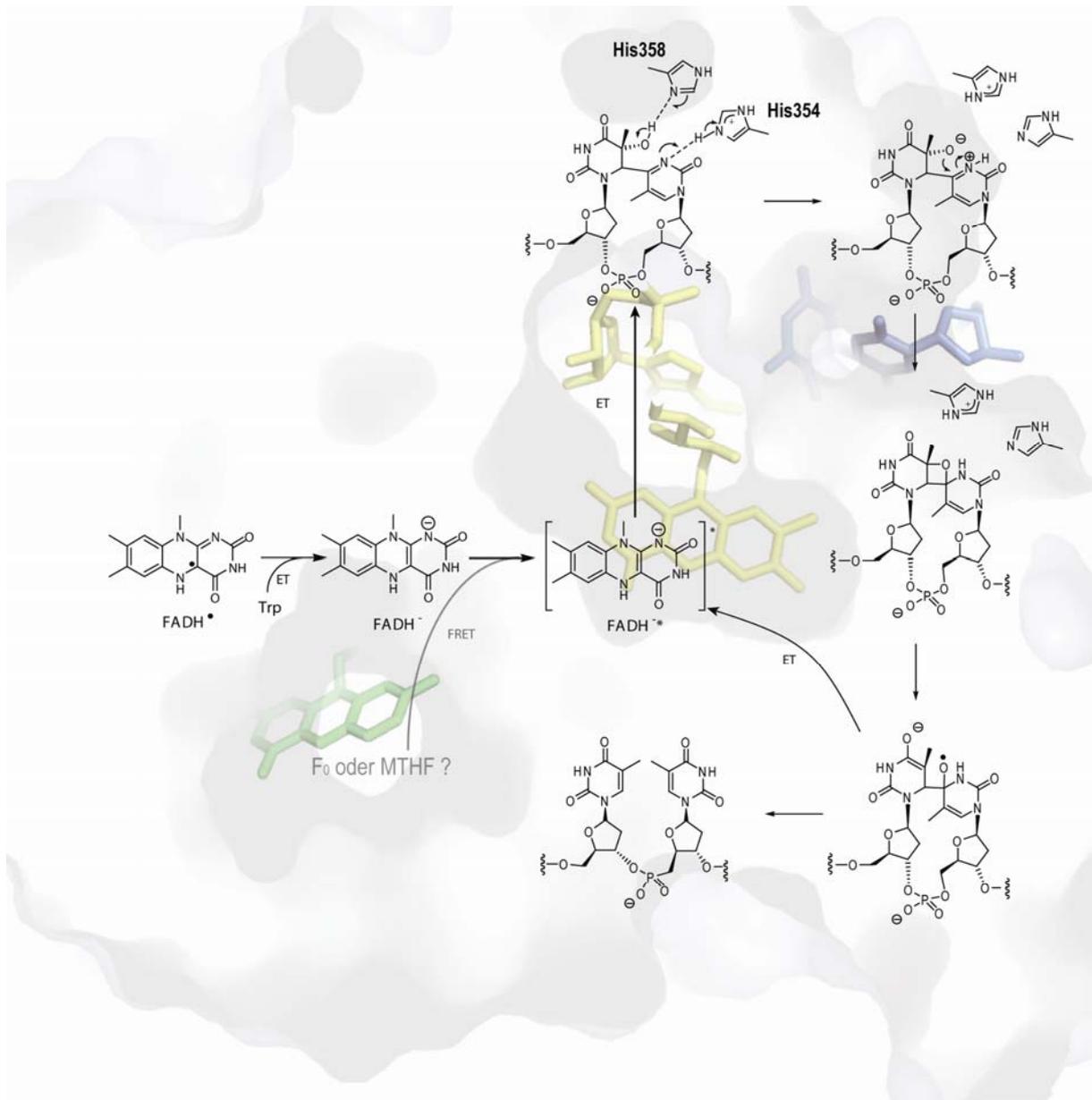


Abbildung 3-8: Möglicher Reaktionsmechanismus der (6-4) Photolyasen. His358 und His354, konservierte Aminosäuren im aktiven Zentrum der (6-4) Photolyase aus *Xenopus laevis*. ET=Elektronentransfer, FRET=fluorescence resonance energy transfer.

3.4.2.3 Das Antennenpigment

Bisher wurde vermutet, dass (6-4) Photolyasen auf das MTHF als Antennenpigment zurückgreifen, da weder *D. melanogaster* noch andere Eukaryoten, bei denen (6-4) Photolyasen zu finden sind, in der Lage sind, Deazaflavine zu synthetisieren.⁽⁹⁶⁾ Hinweise darauf geben partiell-gereinigte (6-4) Photolyase Fraktionen aus *X. laevis*,

die ein Absorptionsmaximum bei 416 nm aufweisen.⁽⁹²⁾ Allerdings ist der eindeutige Nachweis des MTHFs problematisch. Kristallstrukturen von MTHF enthaltenden CPD Photolyasen zeigen, dass die Bindetasche des Chromophors nahe an der Proteinoberfläche liegt, wodurch häufig ein reinigungsbedingter Verlust des Cofaktors auftritt.⁽⁸⁰⁾

3.4.3 Cryptochrome

Cryptochrome wurden ursprünglich als Pigmente mit unbekanntem (kryptischem) Charakter definiert, die als Blaulichtrezeptoren in Pflanzen auftreten. 1993 entdeckten *Ahmad* und *Cashmore*⁽⁹⁷⁾ das erste photoreaktive Protein in *Arabidopsis thaliana*, das eine hohe Sequenzhomologie zu den Photolyasen aufwies. Kurze Zeit darauf wurden Photolyasen-Homologe im humanen Organismus gefunden, die jedoch keine Photolyase-Aktivität zeigten.^(56, 90) Es wurde davon ausgegangen, dass diese als Blaulichtrezeptoren fungieren.⁽⁵⁶⁾ Derzeitig werden alle Proteine, die Sequenzhomologien zu Photolyasen aufweisen, aber keine Reparaturfunktion zeigen, den Cryptochromen zugeordnet.⁽²¹⁾ Sie sind an der Signalaufnahme und Weiterleitung von Lichtsignalen im blauen und UV-A Bereich beteiligt. In Pflanzen kontrollieren sie dadurch die Photomorphogenese sowie den Phototropismus; in Säugern sind sie wichtiger Bestandteil des zirkadianen Rhythmus. Des Weiteren existieren Hinweise die für eine Beteiligung der Cryptochrome an der Orientierung der Zugvögel im Magnetfeld der Erde.⁽⁹⁸⁻¹⁰¹⁾

3.4.3.1 Struktur

Der gravierendste Unterschied hinsichtlich der Struktur zwischen Photolyasen und Cryptochromen besteht in einem 50 bis 250 AS langen N- oder C-terminalen Fortsatz, welcher der Signaltransduktion dient.^(97, 102) Bisher jedoch konnte dieser Teil der Cryptochrome, bis auf eine kurze N-terminale Erweiterung des *Arabidopsis Cry3*, strukturell nicht charakterisiert werden. Erste Kristallstrukturen der Photolyase-ähnlichen Domäne, bakterieller und pflanzlicher Cryptochrome, sowie

von *Arabidopsis* Cry3 in Komplex mit einem synthetischen CPD Schaden⁽¹⁰³⁾ zeigten überraschende Homologie zu den Strukturen der Photolyasen. Bisher gibt es aber noch keine Strukturen von tierischen Cryptochromen, aber es wird vermutet, dass auch hier ein gleichartiger Strukturaufbau vorliegt.^(53, 104-106)

3.4.3.2 DNA Bindung

Da aus evolutionärer Sicht die Cryptochrome von den Photolyasen abstammen, lag der Verdacht nahe, dass es sich bei ihnen ebenfalls um DNA-bindende Proteine handelt, die als eine Art Transkriptionsfaktor agieren. In der Tat binden Cry-DASH Proteine und *Arabidopsis* Cry 3 die DNA schwach^(53, 107), humanes Cry2 bindet mit hoher Affinität Einzelstrang-DNA ($K_s = 5 \times 10^{-9}$) sowie das (6-4) Photoprodukt.⁽¹⁰⁸⁾ Hingegen konnte keine DNA Bindung von *Arabidopsis* Cry1 beobachtet werden. Die positive Oberflächenladung von Cry1 ist im Vergleich zu den Photolyasen stark reduziert, was u.a. die fehlende Affinität erklärt (Abb. 3-9). Dagegen zeigt *Arabidopsis* Cry3 eine noch stärker positiv geladene Oberfläche an der vermuteten DNA Bindungstasche als die Photolyasen (Abb. 3-9).⁽¹⁰⁷⁾ Die dennoch schwache DNA Bindung kann durch die hohe Ladungsdichte erklärt werden, wodurch das Substrat in seiner herausgedrehten Konformation destabilisiert wird.⁽¹⁰³⁾

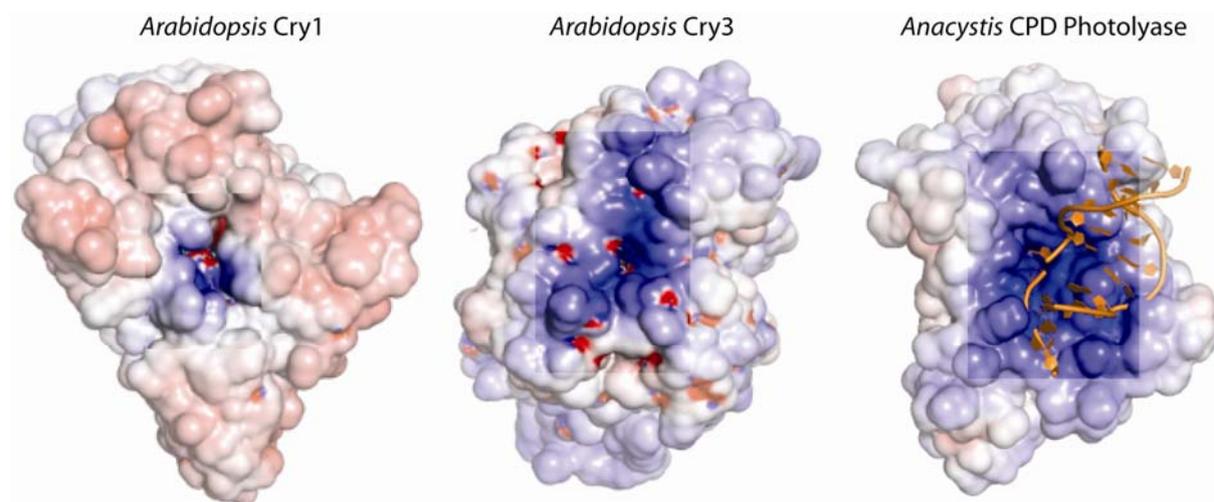


Abbildung 3-9: Elektrostatisches Potential um die Kavität von *Arabidopsis* Cry1, *Arabidopsis* Cry3 und der CPD Photolyase aus *A. nidulans*. (ABPS/Pymol)^(82, 83)

3.4.3.3 Chromophore

Wie die Photolyasen besitzen auch Cryptochrome zwei Cofaktoren. FAD, dessen Redoxzustand in Cryptochromen von Pflanzen und Insekten noch ungeklärt ist, sowie MTHF.^(51, 109) Die Bindung des MTHFs in Cry-DASH Proteinen unterscheidet sich leicht von der Art der Bindung in Photolyasen, zudem ist in *Arabidopsis* Cry3 nur ein Glutaminsäurerest für die Cofaktorbindung verantwortlich. Generell jedoch ist die strukturelle Anordnung der Cofaktoren ähnlich. Andere Chromophore wie Deazaflavine oder ein weiteres FAD- bzw. FMN-Molekül konnten nicht nachgewiesen werden.⁽¹¹⁰⁾

3.4.3.4 Mechanismus

Derzeit sind keine photochemischen Reaktionen bekannt, die von Cryptochromen katalysiert werden. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass bereits die C-terminale Erweiterung in der Lage ist, ein Photosignal auf Effektormoleküle zu übertragen.^(45, 55, 104, 111) Eine Ausnahme stellt dabei die Cry-DASH Unterfamilie dar, zu der auch das *Arabidopsis* Cry3 Protein gehört. Als potentielle Photolyasen sind sie ausschließlich in der Lage, CPD Schäden in einzelsträngiger DNA zu entfernen.^(54, 105) Ferner wurde eine lichtabhängige Konformationsänderung sowie Autophosphorylierung bei *Arabidopsis* Cry1 beobachtet.^(112, 113) Dabei interagiert der normalerweise ungeordnete C-terminale Bereich mit der Photolyase-ähnlichen Domäne. Die N-terminale Erweiterung von *Arabidopsis* Cry3 dagegen ist so weit vom aktiven Zentrum entfernt, dass hier eine Konformationsänderung als unwahrscheinlich erscheint.⁽¹⁰⁶⁾ Des Weiteren zeigt die Kristallstruktur von Cry1 ein ATP Analogon im aktiven Zentrum, das anders positioniert ist, als das Dimer in Photolyasen.⁽¹⁰⁴⁾ Möglicherweise blockiert dieses ATP Analogon den Zugang zum FAD und verhindert dadurch den Elektronentransfer.

3.5 Das F₀-Coenzym

3.5.1 Überblick

Riboflavin, auch als Vitamin B₂ bekannt, ist einer der vielfältigsten biologischen Redoxfaktoren und Vorstufe der Flavocoenzyme.⁽¹¹⁴⁾ Sein Analogon, das 5-Deazariboflavin, wurde 1970 von *O'Brien et al.* erstmals synthetisiert,⁽¹¹⁵⁾ erweckte aber erst 1978 die Aufmerksamkeit der Öffentlichkeit, als *Eirich et al.* von der Existenz des Deazaflavin-Cofaktors in natürlichen Systemen berichteten.⁽¹¹⁶⁾ Diese neu entdeckte Struktur, ein Derivat des 8-Hydroxy-7-desmethyl-5-deazariboflavins, wurde auf Grund seiner charakteristischen Absorption bei einer Wellenlänge von 420 nm als Coenzym F₄₂₀ bezeichnet (Abb. 3-10).⁽¹¹⁶⁾

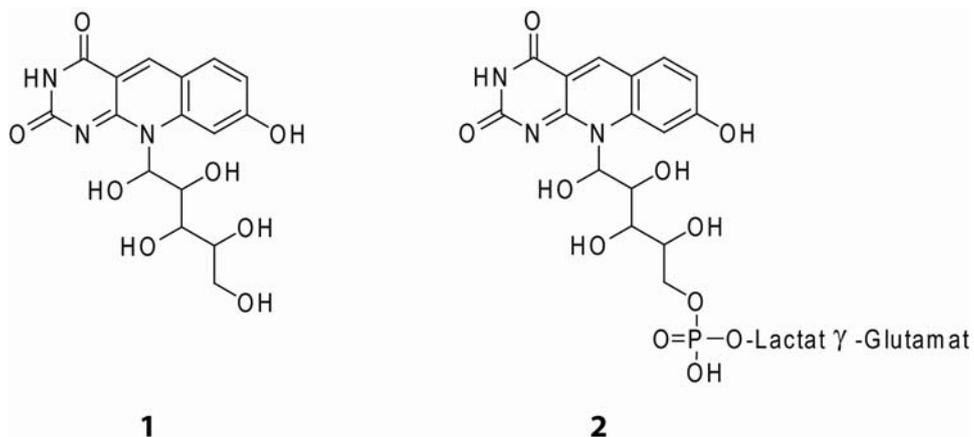


Abbildung 3-10: Struktur von 8-Hydroxy-5-deazariboflavin **1** und Coenzym F₄₂₀ **2**.

Das Coenzym F₄₂₀ konnte bisher in Archaea, dort v.a. in methanogenen Archaea, aber auch in GC-reichen gram-positiven Bakterien wie *Streptomyces* und *Mycobakterien* nachgewiesen werden, wobei es essentiell für den Energiestoffwechsel der methanogenen Archaea ist. Als chemoautotrophe Organismen am Ende der Nahrungskette des anaeroben Abbaus der Biomasse benötigen sie das Coenzym F₄₂₀ zur Umsetzung von beispielsweise CO₂ und H₂.

Kohlenstoffdioxid wird durch eine 8-e⁻-Reduktion in CH₄ überführt, wobei vier H₂ Moleküle, katalysiert durch Hydrogenasen, oxidiert werden. In *Streptomyces* ist F₄₂₀ ein wichtiger Cofaktor der Biosynthese von Tetracyclin sowie Lincomycin. Des Weiteren ist 8-Hydroxy-5-deazaflavin (8-HDF oder F₀), ein Derivat des Cofaktors, im Cyanobakterium *Anacystis nidulans* vorhanden. Berichten zur Folge tritt er auch in der eukaryotischen Grünalge *Scenedesmus acutus* auf, wo es als Chromophor in Photolyasen am Prozess der Photoreaktivierung von DNA Schäden beteiligt ist.^(76, 77, 96, 117-123)

3.5.2 Biosynthese von Deazariboflavinen

In vivo Studien mit ¹³C-markierten Vorstufen des Deazaflavins in *M. thermoautotrophicum* zeigten, dass sowohl die Ribitylseitenkette als auch die Pyrimidinuntereinheit des Cofaktors von GTP oder einem, GTP-verwandten Nukleotidbaustein stammen. Die Inkorporation des Zwischenproduktes des Riboflavinstoffwechsels, 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion, in F₀ erfolgt mit hoher Effizienz, bei gleichzeitigem Verlust der Aminogruppe an Position 5. Der carbozyklische Ring zusammen mit dem C5 Kohlenstoffatom lässt sich von Tyrosin ableiten. Abbildung 3-1 zeigt den Mechanismus, der theoretisch zur Bildung des F₀ Cofaktors führt.^(114, 124, 125)

3 Einleitung

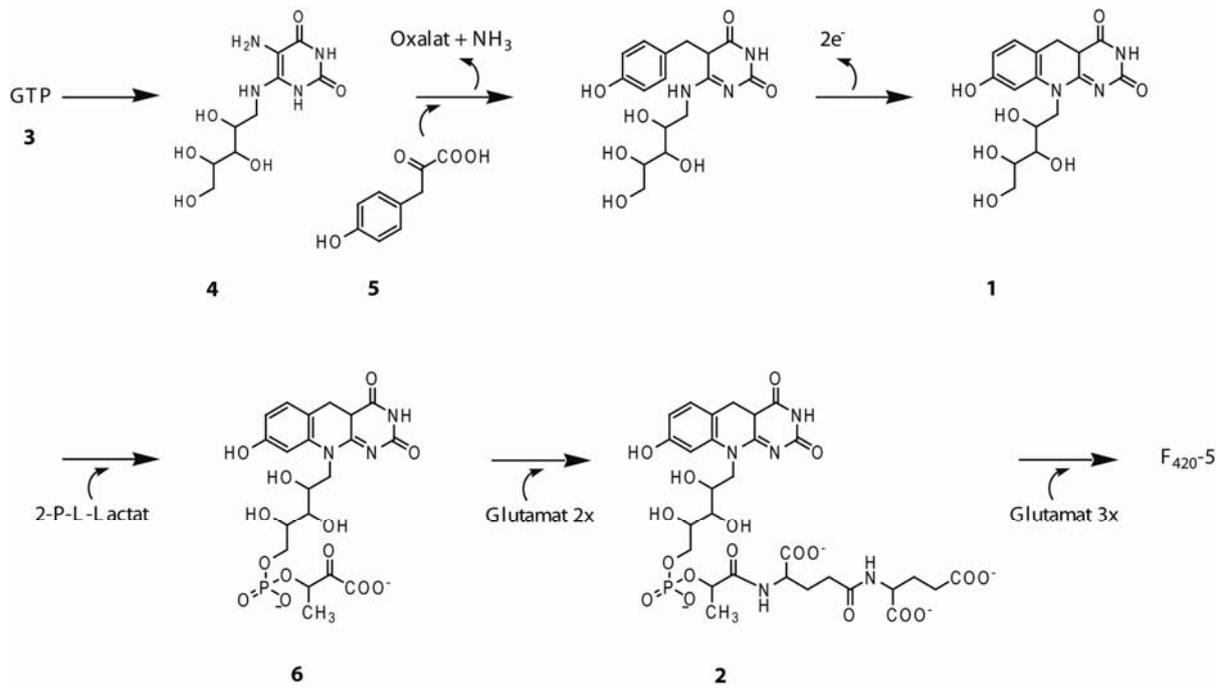
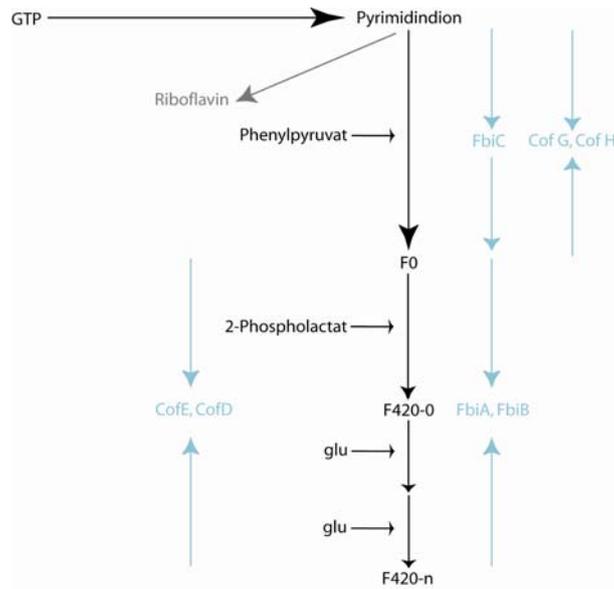


Abbildung 3-11: Biosynthese von 5-Desaza-7,8-desmethyl-8-hydroxy-riboflavin (F₀, 1). 3, GTP; 4, 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-pyrimidindion; 5, 4-Hydroxyphenylpyruvat; 6, Coenzym F₄₂₀-0, 2, Coenzym F₄₂₀-2, (F₄₂₀-*x*, wobei *x* = Anzahl der Glutamatreste).

Untersuchungen der an der Biosynthese von F₀ beteiligten Proteine zeigen drei Genabschnitte, *fbIA*, *fbIB* und *fbIC*, welche für die gleichnamigen Proteine (FbiA, FbiB und FbiC) kodieren. *FbiA* und *FbiC*-Homologe wurden in allen, *FbiB*-Homologe in den meisten der bisher sequenzierten Mikroorganismen gefunden, die in der Lage sind, F₄₂₀ zu synthetisieren. Welche Reaktionen dabei spezifisch von FbiA und FbiB katalysiert werden ist noch unbekannt, jedoch sind beide Enzyme essentiell für die Synthese von F₄₂₀-5 (Abb. 3-11). Mutationsstudien der beiden Genabschnitte *fbIA* und *fbIB* ergaben, dass F₀ unabhängig davon in beiden Fällen synthetisiert wird. FbiC scheint dagegen bereits während der Umsetzung von Pyrimidindion zu F₀ eine wichtige Rolle zu spielen.^(126, 127)

3 Einleitung



Schema 1: Übersicht der Enzyme der Biosynthese von F₀ und F₄₂₀ und deren funktionelle Einordnung während des Syntheseprozesses.

Wie bereits erwähnt ist das Coenzym F₄₂₀ ein Derivat des 8-Hydroxy-7-desmethyl-5-deazaflavins, wobei die 5'-Ribityl-OH-Gruppe phosphoryliert und mit einem Lactyl-oligoglutamyl-Rest vorliegt. Die Übertragung der 2-Phospholactat-Einheit von Lactyl-2-diphospho-5'-guanosin (LPPG) auf 7,8-Didemethyl-8-hydroxy-5-deazaflavin unter Bildung eines L-lactyl-phosphodiesters (F₄₂₀₋₀ bis F₄₂₀₋₆) und GMP wird durch das Enzym CofD, das Produkt des *cofD* Gens, katalysiert.⁽¹²⁸⁾ Ein weiteres Enzym, CofE, addiert in einer GTP-abhängigen Reaktion zwei L-Glutamate an den L-Lactyl-phosphodiester unter Bildung von F₄₂₀-L-glutamyl-glutamat (F₄₂₀₋₂).^(114, 129) Schema 1 zeigt einen Überblick die Enzyme und den möglichen Ablauf der Synthese.

3.5.3 Das Redoxsystem der Deazaflavine

Der trizyklische 5-Deazaisoalloxazin Kern ist ein funktionelles Hybrid zwischen dem monozyklischen Nicotinamid und dem trizyklischen Flavincoenzym. Häufig werden Deazaflavine auch als „NAD in einem Flavin-Gewand“ bezeichnet. Das in der

Literatur beschriebene Redoxverhalten erinnert stark an das der monozyklischen Nicotinamide (Abbildung 3).

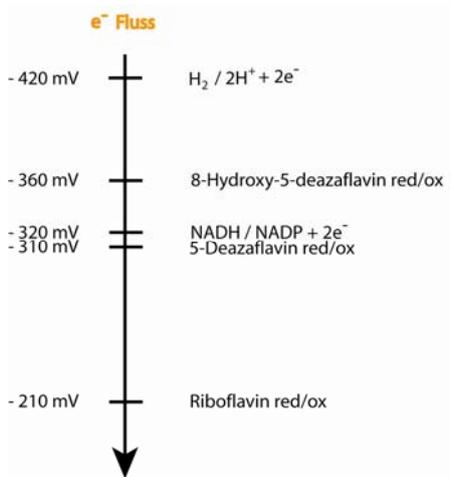


Abbildung 3-12: Strukturen von Riboflavin, 8-Hydroxy-5-deazariboflavin und NAD⁺.

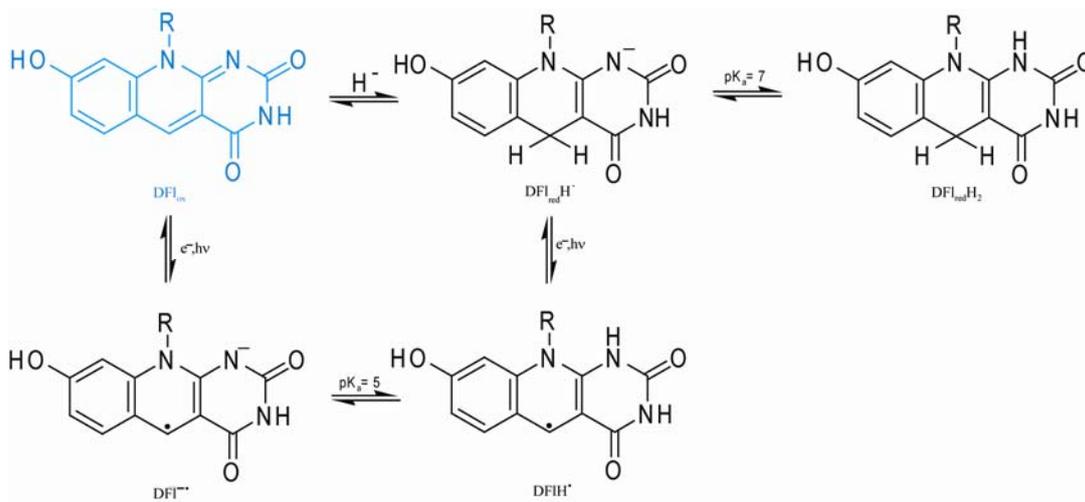
Der Substituent an Position 5 des Flavinsystems konvertiert den zentralen Pyrazin- in einen Pyridinring; Pyridin bzw. Dihydropyridin im zweifach-reduzierten Stadium dominieren die Redox Eigenschaften. Da Pyridinradikale eine deutlich höhere Energie als Pyrazinradikale aufweisen, sind 5-Deazaflavine und die Nicotinamide im Grundzustand obligate Zweielektron-Hydrid-Transfer-Coenzyme.⁽⁹⁶⁾

Weiterhin können Substituenten an Position 8 des 5-Deazaflavins einen enormen Einfluss auf chemische sowie physikalische Eigenschaften der Deazaflavine haben. Elektronendonoren, wie z.B. eine Hydroxy-Gruppe erniedrigen das Redoxpotential von 5-Deazaflavin -310 mV, auf -360 mV für 8-Hydroxy-5-deazaflavin (Riboflavin: -210 mV).⁽⁹⁶⁾ Eine Deprotonierung der Hydroxy-Gruppe ($pK_a \sim 6$) resultiert in einem elektronenreichen „chinoiden“ Anion, welches nur sehr schwer zu reduzieren ist (Schema 3, 2).⁽¹³⁰⁾

3 Einleitung



Schema 2: Redoxpotentiale des Riboflavins, des Wasserstoffs und NADH/NADP im Vergleich zu den Deazaflavinen.



Schema 3: Das Redoxsystem des 8-Hydroxy-5-deazaflavins. In blau, die in Photolyasen vorliegende Form des 8-HDF (F₀).

5-Deazaflavine besitzen wie auch Flavine einen amphoteren Charakter. Im oxidierten und im voll reduzierten Zustand sind die pK_a-Werte der 5-deazaflavine mit denen des Flavins vergleichbar. Der Angriff eines Hydridions an Position C5 führt zur Bildung des 1,5-Dihydro-8-hydroxy-5-deazariboflavins. Die Protonierung eines instabilen Deazaflavin-Radikals kann nicht an C5 erfolgen, da es ansonsten zur Unterbrechung der trizyklischen Konjugation durch ein sp³-hybridisiertes C-Atom

kommen würde. Deshalb erfolgt die Protonierung an N1, welches nicht entscheidend zur Stabilisierung des Radikals beiträgt.⁽¹³¹⁾

3.5.4 Spektroskopische Eigenschaften der Deazaflavine

Generell zeigen 5-Deazaflavine Absorptionsmaxima um 400 nm ($\epsilon \sim 20\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) und eine starke Fluoreszenz um 450 nm. Absorptions- und Fluoreszenzmaxima lassen sich leicht durch Heteroatom-Substituenten an Position C8 verschieben.^(52, 132) So führen Elektronendonoren an C8 im Allgemeinen zu einer bathochromen Verschiebung der Maxima sowie zu einer erhöhten Quantenausbeute der Fluoreszenz. Die Deprotonierung der C8-OH Gruppe von 8-HDF führt ebenso zu einer weiteren Verschiebung des Absorptionsmaximums in den längerwelligen Bereich ($\lambda_{\text{max}} \sim 420\text{ nm}$, $\epsilon \sim 40\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Durch die Phenol-Ionisation wird ein tief farbiges delokalisiertes Anion erzeugt, welches eine Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{max}} \sim 470 - 475\text{ nm}$ aufweist.⁽¹³³⁾

3.5.5 Deazaflavine als Coenzyme der enzymatischen Photoreversion

Für die Durchführung von Redoxreaktionen benötigen viele der bisher charakterisierten Enzyme den Cofaktor in seiner C8-OH protonierten Form. Das 8-Hydroxy-5-deazaflavin tritt jedoch nicht nur als Redoxsystem im Metabolismus von Organismen auf, sondern dient zudem auch als Antennenpigment der DNA-Photolyasen in der lichtinduzierten, enzymatischen Reparatur von UV-Schäden der DNA. Allerdings liegt F_0 in den Reparaturenzymen in der deprotonierten, redoxinaktiven chinoiden Form vor. Diese wird in der Literatur als inert gegenüber Reduktionsmitteln angegeben. Der „lichtsammelnde“ Cofaktor absorbiert Lichtenergie bei Wellenlängen $> 350\text{ nm}$, was für die Nucleobasen der DNA unbedenklich ist. Dabei werden die hohen Extinktionskoeffizienten des chinoiden 8-HDF genutzt, um die erhaltene Energie effizient mittels *Förster*-Energietransfermechanismus auf das

vollständig reduzierte und deprotonierte Flavin-Coenzym (FADH^-) zu übertragen. Die Bindung des F_0 an das Apoenzym verursacht eine erneute bathochrome Verschiebung um 20 nm, wodurch das Absorptionsmaximum in diesem Fall bei $\lambda_{\text{max}} \sim 440 \text{ nm}$ liegt.^(2, 22, 67, 134, 135)

4 Aufgabenstellung

Vor 50 Jahren hätte sich niemand vorstellen können, dass Experimente mit zellfreien *E. coli* Extrakten und *H. influenza* DNA bis in die heutige Zeit so weitreichende Folgen für aktuelle, wissenschaftliche Themen haben könnten.^(18, 58, 136) Unzählige experimentelle, wie auch theoretische Informationen, auf dem enorm wichtigen Gebiet der DNA Reparatur durch Photolyasen wurden bisher erhalten. Trotz großer Anstrengungen blieben Erfolge den Mechanismus der direkte Reversion des (6-4) Photoproduktes durch (6-4) Photolyasen darzustellen bislang aus. Zwar wird aufgrund der Sequenzhomologie zu den CPD Photolyasen von einer ähnlichen Struktur und einem entsprechenden, auf einem Oxetan- bzw. Azetidinintermediat, basierenden Mechanismus ausgegangen, doch noch immer sind wichtige Details des Mechanismus von hypothetischer Natur. Um den Elektronentransfer zwischen dem Flavin Cofaktor und dem DNA Schaden vollständig zu verstehen und die entscheidenden Unterschiede zwischen CPD, (6-4) Photolyasen und Cryptochromen hervorzuheben, war es notwendig Kristallstrukturen des aktiven Enzyms mit seinem Substrat zu erhalten. Hierbei galt es, das Enzym in hoher Reinheit und ausreichenden Mengen bereit zu stellen.

Zusätzlich ist die Frage nach der Existenz und der Art eines zweiten Cofaktors immer noch ungeklärt. Die Tatsache, dass die Organismen, welche (6-4) Photolyasen aufweisen, nicht in der Lage sind das Deazaflavin F_0 zu synthetisieren lässt vermuten, dass es sich bei dem zweiten Chromophor um ein Pterin oder Flavin-Analogon handeln muss. Aber auch hier gibt es bislang keine eindeutigen Hinweise auf die Art des lichtsammelnden Cofaktors. Deshalb war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, das kommerziell nicht erhältliche F_0 zunächst auf dem Weg der chemischen Synthese darzustellen. Im Anschluss sollte durch Rekonstituierungsexperimente sowie Co-Kristallisation mit verschiedenen Cofaktoren, das zweite Chromophor charakterisiert und dessen Einfluss auf die Reparaturaktivität bestimmt werden.

5 Material und Methode

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien

Chemikalien und Lösungsmittel in BioChemica Qualität wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Boehringer (Mannheim), Invitrogen (Karlsruhe), Merk (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma/Aldrich/Fluka (Deisenhofen) bezogen.

5.1.2 Spezielle Anwendungen

Tabelle 5-1: Isolierungs- und Präparationssysteme.

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller
DNeasy Kit	Präparation von genomischer DNA	Qiagen, Hilden
MinElute PCR Purification Kit	Reinigung von PCR-Produkten	Qiagen, Hilden
MinElute Gel Extraction Kit	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	Qiagen, Hilden
PeqGold GelPure Kit	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	Peqlab, Erlangen
PeqGold Plasmid Miniprep Kit I	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	Peqlab, Erlangen
Topo® Kit	Klonierung	Invitrogen, Karlsruhe
Gateway® System	Klonierung	Invitrogen, Karlsruhe

5.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme sowie Polymerasen wurden vorwiegend von der Firma New England Biolabs (NEB, Frankfurt am Main) und der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Andere DNA modifizierende Enzyme, Ligasen und DNasen stammen von den Firmen NEB und Sigma-Aldrich.

5.1.4 Plasmide ohne Insert

Tabelle 5-2: Verwendete Plasmide.

Bezeichnung	Hersteller
pDest 007	Hergestellt von Jan Carsten Pieck
pDest 17	Invitrogen, Karlsruhe
pDONR201	Invitrogen, Karlsruhe

5.1.5 Bakterienstämme

Tabelle 5-3: Verwendete *E. coli* Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Herkunft
NEB Turbo	F' <i>proA+B+ lacIq ΔlacZM15/fhuA2 Δ(lac-proAB). glnV zgb-210::Tn10 (TetR) endA1 thi-1 Δ(hsdSmcrB)</i>	NEB, Frankfurt a. Main
DH5α	F-, <i>endA1, hsdR17(rK-mK+), supE44, thi-recA1, gyrA1, gyrA (Nalr), relA1, Δ(lacIZYAargF), U169 deoR (ΦdlacD(lacZ))</i>	Stratagene, Amsterdam
TOP10	F- <i>mcrA (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ M15, lacX74 recA1 ara 139 (ara-leu)7697 galU galK, rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe
XL10 Gold	TetRΔ(<i>mcrA</i>)183, Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173, <i>endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac, Hte [F-proAB lacIqZΔM15Tn10(Tetr)Amy Camr]</i>	Stratagene, Amsterdam
Rosetta™ (DE3)	F-, <i>ompT, hsdSB(r_B⁻ m_B⁻) gal, dcm, lacY1, pRARE, (argU, argW, ileX, glyT, leuW, proL), (Cm^R)</i>	Novagene, Schwalbach
Tuner™ (DE3)	F- <i>ompT, hsdSB(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1, (Cm^R)</i>	Novagene, Schwalbach
BL21 (DE3)	F- <i>ompT hsdSB(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3, (Cam^R))</i>	Novagene, Schwalbach
B834 (DE3)	F- <i>ompT hsdSB(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm met (DE3)</i>	Novagene, Schwalbach

5.1.6 Geräte

Tabelle 5-4: Verwendete Geräte.

Geräte	Hersteller
Äkta Basic Chromatographie System	GE, München
Äkta Purifier Chromatographie System	GE, München
Agarose Gelelektrophoresekammer	Biorad, München
Autoklav Vakulab S3000	Systec, Gießen

5 Material und Methoden

Biofuge pico	Heraeus, Hanau
BioPhotometer 6131	Eppendorf, Hamburg
Carey UV-Spectrometer Bio100	Varian, Darmstadt
Elektrotransformator, Micropuls	Biorad, München
Elisa Reader, FP Spektrometer	Tecan, Crailsheim
Fluorimeter	Jasco, Gross-Umstadt
French Pressure Cell Press	Thermo, Dreieich
Gelscanner IDA	Raytest, Straubenhardt
Geldokumentationsgerät LAS3000	Raytest, Straubenhardt
Geltrockner 583	Biorad, München
Hochdruckhomogenisator	Avestin, Mannheim
HPLC	Waters, Eschborn
Inkubator 1S	Noctua, Wiesloch
Inkubator 44R	New Brunswick, Nürtingen
Kristallisationsroboter Hydra II	Thermo, Dreieich
LC-MS	Dionex, Idstein Thermo, Dreieich
Mastercycler Personal	Eppendorf, München
Mini Protean 3 Cell	Biorad, München
Multicaster	Biorad, München
Nanodrop UV-Spectrometer	Peqlab, Erlangen
pH Meter MP220	Mettler Toledo, Gießen
PCR Realplex	Eppendorf, Hamburg
Power Supply	Biorad, München

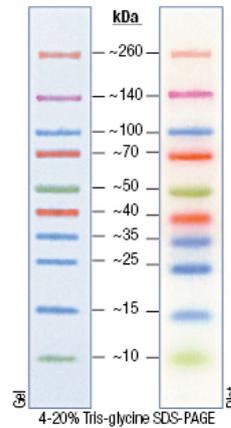
5 Material und Methoden

Sorvall Zentrifuge, Evolution RC	Kendro, Dreieich
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschränke	Sanyo, Bad Nenndorf
Tischzentrifuge, 5415R	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blotter, Semi-Dry	Biorad, München
Vortexer	VWR, Darmstadt
Waters Millipore System	Millipore, Schwalbach
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

5.1.7 DNA- und Proteinstandards

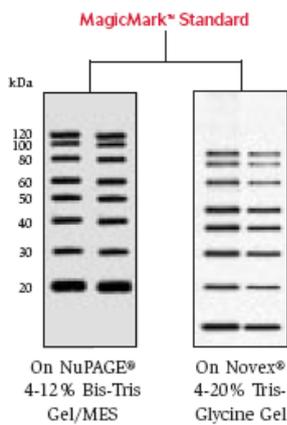
Protein	Approximate Molecular Weights (kDa)				
	Tris-Glycine	Tricine	NuPAGE® MES	NuPAGE® MOPS	NuPAGE® Tris-Acetate
Myosin	250	210	188	191	210
Phosphorylase	148	105	98	97	111
BSA	98	78	62	64	71
Glutamic Dehydrogenase	64	55	49	51	55
Alcohol Dehydrogenase	50	45	38	39	41
Carbonic Anhydrase	36	34	28	28	n/a
Myoglobin Red	22	17	17	19	n/a
Lysozyme	16	16	14	14	n/a
Aprotinin	6	7	6	n/a	n/a
Insulin, B Chain	4	4	3	n/a	n/a

NuPAGE® Novex Bis-Tris 4-12% Gel

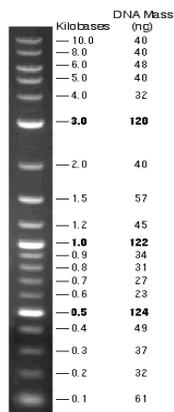


SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Protein Standard, Invitrogen

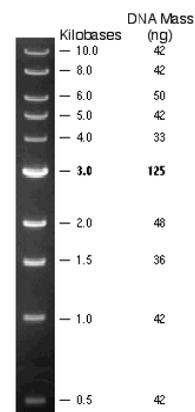
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas



MagicMark™ Protein Western Protein Standard, Invitrogen



2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb), NEB



DNA Ladder 1 kb, NEB

5.1.8 Puffer, Medien und Stammlösungen

Die angegebenen Bestandteile wurden in entionisiertem Wasser gelöst und bei 121 °C autoklaviert. Für Agar-Platten wurden dem jeweiligen Medium noch 15 % (w/v) Agar und das entsprechende Antibiotikum nach Abkühlen hinzugesetzt.

Tabelle 5-5: Verwendete Medien.

Medien	
LB-Medium	1.0 % (w/v) Pepton, 0.5 % (w/v) Hefeextrakt, 1.0 % (w/v) NaCl, pH 7.5
TB-Medium	0.5 % (w/v) Trypton, 1.0 % (w/v) Hefeextrakt, 0.4 % (v/v) Glycerin, 900 mL H ₂ O add 100 mL 0.17 M KH ₂ PO ₄ , 0.72 M K ₂ HPO ₄
SOC-Medium	2.0 % (w/v) Pepton, 0.5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2.5 % mM KCl, pH 7.2

Induktor und Antibiotika-Stammlösungen	
Anhydrotetracyclin	2 mg/mL in Dimethylformamid
Carbenicillin	100 mg/mL in Wasser
Chloramphenicol	34 mg/mL in Ethanol
Kanamycin	25 mg/mL in Wasser
IPTG	238 mg/mL in Wasser

5.1.9 Datenbanken und Programme

EMBL European Molecular Biology Laboratory

Data Library Nucleotide Sequence Database Heidelberg

<http://www.embl-heidelberg.de>

<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>

NCBI National Center for Biotechnology Information USA

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>

Swiss-Prot Department de Biochemie Medicale
Centre Medical Universitaire Genf, Schweiz

<http://www.swissprot.com>

Bioinformatik Vector NTI 10, Invitrogen

Äkta Unicorn 6.0, GE

Cary UV-Spectrometer VariaUV 3.00 (303)

Fluorimeter Spectra Manager Version 1.54.03

Elisa-FP-Reader X Fluoro Genius Pro, Tecan

Gel-Scanner Aida Image Analyzer v.4.10, Raytest

Hydra II Matrix, Controlmate Version 1.1.19 for Hydra eDrop

5.1.10 Bioinformatische Anwendungen

5.1.10.1 *Homologievergleiche und Alignments*

DNA- und Proteinsequenzen der Cryptochrome, Photolyasen und anderer Enzyme wurden mittels der NCBI Datenbank gefunden. Homologievergleiche wurden sowohl mit dem NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) Server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) als auch mit Clustal X 1.8 bzw. der BLAST Search Funktion des Bioinformatik Programms, Vector NTI 10 durchgeführt. Allgemeine Sequenzalignments wurden ebenfalls mit Vector NTI 10 und Clustal x 1.8 durchgeführt.

5.1.10.2 *Strukturvergleiche und Strukturabbildungen*

Für die Darstellung der Kristallstrukturen bzw. der Strukturvergleiche wurden die Programme WinCoot 0.3.3 sowie Pymol 1.0r1 verwendet.

5.1.10.3 *Primerdesign und Klonierungsstrategien*

Die Klonierungsstrategien sowie die dafür benötigten Primer wurden im Vector NTI 10 entwickelt und dargestellt.

5.1.10.4 *Kalkulation der Proteinparameter*

Physikalische und chemische Parameter der rekombinanten Proteine wie Molekulargewicht (MW), Isoelektrischer Punkt (pI), Extinktionskoeffizienten und Restriktionsschnittstellen wurden mit Vector NTI 10 und dem Programm *PeptideCutter* der *expasy* Internetseite ermittelt.

5.2 Mikrobiologische Methoden

5.2.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Mit einer 5 mL Flüssigkultur des entsprechenden *E. coli* Stammes, die über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert wurde, wurden am folgenden Tag 250 mL LB-Medium angeimpft. Bei einer OD₆₀₀ von 0.6-0.8 wurde die Kultur für 15 min auf Eis gestellt um weiteres Wachstum zu stoppen. Anschließend wurden sie in 50 mL Falcon-Tubes aliquotiert bei 4 °C und 4000 rpm sedimentiert, der Überstand möglichst vollständig abdekantiert und das Pellet in 50 mL, sterilem Wasser resuspendiert und gewaschen. Das Pellet im Anschluss mit 50 mL, 10 %iger, eiskalter Glycerinlösung resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Der Vorgang wurde noch einmal mit 50 mL und dann zweimal mit 25 mL 10 %iger, eiskalter Glycerinlösung wiederholt. Die Pellets wurden am Ende in 2 mL der Glycerinlösung resuspendiert und in sterile Kryotubes aliquotiert.

5.2.2 Transformation von elektrokompetenten *E. coli*

Zunächst wurde, pro Elektrotransformation, eine Elektroporationsküvette auf Eis vorgekühlt und 1 mL SOC- bzw. 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 Elektroporationküvette 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.

5.2.3 Transformation von chemisch-kompetenten Zellen

Pro Transformation wurde ein Aliquot elektrokompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 10 ng bis 100 ng DNA versetzt (maximal 2 μ L). Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert, anschließend einem Hitzeschock von 42 °C für 30 s ausgesetzt und erneut 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 250 μ L SOC-Medium zu den Zellen gegeben und diese bei 37 °C und 450 rpm im Eppendorf-Thermomixer 1 h inkubiert, bevor sie bei 4000 rpm für 4 min sedimentiert wurden. Das Sediment wurde auf einer entsprechenden Agar-Platte ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Platten im Anschluss bei 4 °C gelagert.

5.2.4 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.

5.2.5 Induktion der Proteinexpression der (6-4) Photolyase

Von einer Agarplatte wurde ein Klon entnommen und damit eine 5 mL Flüssigkultur mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft. Die ÜNK wurde bis zum nächsten Morgen bei 37 °C und 200 rpm auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Das als Vollmedium verwendete TB-Medium oder LB-Medium wurde im Verhältnis 1/200 mit einer ÜNK überimpft und weiterhin bei 37 °C geschüttelt. Bei einer OD_{600} von 1.0 bis 1.2 wurde mit 0.2 nM Anhydrotetracyclin der Promotor induziert; die Proteinexpression fand bei 16 °C über Nacht statt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation im SLA-3000 Rotor (8 min, 8000 rpm) sedimentiert und mittels

French-Press bzw. Durchflusshomogenisator (Kapitel 5.2.7 und 5.2.8) aufgeschlossen oder bei -20 °C gelagert.

5.2.6 Induktion der Proteinexpression der CPD Photolyase

Die aus dem Stamm *E. coli* K12 stammende CPD Photolyase wurde von *Dr. Claudia Chiocchini* in den Expressionsvektor *pExp007-cpdc* kloniert und in *E. coli* BL21™ *Star* (DE3) transformiert. Der daraus erhaltene Klon CC7 wurde unter den Bedingungen, wie in Kapitel 5.2.5 beschrieben, in LB-Medium kultiviert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0.6 mit 1 mM IPTG. Anschließend wurden die Zellen weitere 4 h bei 37 °C inkubiert und unter den in Kapitel 5.2.5 bereits angegebenen Bedingungen geerntet, aufgeschlossen und gelagert.

5.2.7 Aufschluss im Durchflusshomogenisator

Der Durchflusshomogenisator wurde zum Aufschluss großer Expressionsansätze von 5 L bis 10 L verwendet. Das Bakteriensediment der Proteinexpression wurde in 100 mL DNase I Puffer mit einer Tablette *Protease Inhibitor Complete (Roche)* resuspendiert. Zum Kühlen des Systems wurde eiskalter DNase I Puffer 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 bei 18000 rpm für 30 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand für die weiteren Reinigungsschritte verwendet.

5.2.8 Aufschluss mit der *French-Press*

Für Expressionsansätze bis zu 4 L wurden die pelletierten Zellen in DNase I Puffer und einer Tablette *Protease Inhibitor Complete (Roche)* resuspendiert und in den eisgekühlten Zylinder der *French-Press* gegeben (maximal 30 mL). Zuvor wurden alle Teile der *French-Press* die mit der Zellsuspension in Berührung kommen auf Eis vorgekühlt. Der Stempel wurde langsam bei einem maximalen Druck von 1500 psi nach unten bewegt, wodurch die Zellsuspension auf einen Zapfen trifft und dort durch auftretende Scherkräfte zerplatzen. Durch ein Ventil wurden die aufgeschlossenen Zellen in ein auf Eis gelagertes Gefäß abgeführt. Dieser Vorgang wurde 4- bis 5-mal wiederholt. Der Zellaufschluss wurde bei 18000 rpm für 30 min bei 4 °C zentrifugiert und aus dem Überstand konnte anschließend durch weitere Aufreinigungsschritte das gewünschte Protein isoliert werden.

5.3 Molekularbiologische Methoden

5.3.1 DNA Isolierung

5.3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA mittels Peqlab-Plasmid Isolations-Kit

Tabelle 5-6: Puffer Plasmid-DNA Isolierung.

Lösung I pH 8.0	50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 100 mg/mL RNase A
Lösung II	200 mM Natriumhydroxid 1 % (w/v) SDS
Lösung III pH 5.5	3 M Kaliumacetat
DNA-Waschpuffer pH 6.5	1.0 M NaCl 50 mM MOPS 15 % (v/v) Ethanol
Elutionspuffer-Puffer pH 8.5	10 mM Tris

Die während der Klonierung erzeugten Plasmidkonstrukte wurden zunächst aus den zur Amplifikation herangezogenen *E. coli* Zellen isoliert. Dazu wurden 5 mL Medium (LB- oder TB-Medium siehe auch Kapitel 3.1.8) in einem 12 mL *Snap-Cap* mit einem Klon angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien zentrifugiert (4000 rpm, 10 min), das Medium verworfen und das entstandene Sediment in 250 µL Lösung I resuspendiert. Diese Lösung wurde in ein 1.5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, 250 µL Lösung II hinzugegeben und 3-mal invertiert. Die Reaktion wurde 2 min inkubiert und mit 350 µL Lösung III, nach 3-maligem invertieren, abgestoppt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgefäß in einer Tischzentrifuge mit 10000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine *HiBind*-Miniprep-Zentrifugensäule überführt und 1 min mit 10000 rpm zentrifugiert. Die an die Säule gebundene DNA wurde 2-mal mit 750 µL DNA-Waschpuffer überschichtet und anschließend mit 10000 rpm 1 min

erneut zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule erneut, zum vollständigen Entfernen des Puffers, 1 min mit 10000 rpm zentrifugiert. Die DNA auf der Säule wurde nun bei Raumtemperatur getrocknet und mit 30-40 µL Elutionspuffer 1 min bei 10000 rpm in der Tischzentrifuge eluiert. Die so isolierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

5.3.1.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen mit dem Qiagen-MinElute-Gel-Extraction Kit

Tabelle 5-7: Puffer DNA Extraktion aus Agarosegelen.

PE-Puffer pH 6.5	1.0 M NaCl 50 mM MOPS 15 % (v/v) Ethanol
EB-Puffer pH 8.5	10 mM Tris

Die zu isolierende DNA-Bande wurde zunächst mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend nach dem Herstellerprotokoll weiter behandelt. Dazu wurde die ausgeschnittene Bande in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß überführt, gewogen und mit dem dreifachen des Gewichtes an QG-Puffer behandelt. Im Anschluss wurde das Agarosegelstück im Thermoblock bei 54 °C für 10 min inkubiert, so dass es sich vollständig auflöste. Zur pH-Wert-Kontrolle ist dem QG-Puffer Phenolrot als pH-Indikator zugesetzt. Bei pH-Werten >7 konnte der pH-Wert mit 3 M Natriumacetat korrigiert werden. Isopropanol wurde im Verhältnis 1:1 zum Gelvolumen hinzugegeben und durch mehrmaliges invertieren gemischt. Die Probe wurde nun auf die Säule aufgetragen und 30 s bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die gebundene DNA 2-mal mit je 750 µL PE-Puffer gewaschen. Die Säule wurde dazu jeweils 1 min bei 13000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde nun wieder getrocknet und die gebundene DNA mit 10 –15 µL EB-Puffer eluiert.

5.3.2 Agarosegelelektrophorese

Tabelle 5-8: Puffer Agarosegelelektrophorese.

TAE-Laufpuffer	40 mM Tris, pH 7.5 1 mM EDTA
TAE-Gelpuffer	20 mM Tris, pH 7.5 0.5 mM EDTA
EtBr	1 mg/mL

DNA-Fragmente können aufgrund ihrer Größe und Konformation durch Agarosegelelektrophorese getrennt werden. Es liegt eine Spannung von ca. 110 V längs der Laufrichtung an. Die DNA Fragmente wandern durch ein Agarosepolymer zur Anode und werden dabei in ihrer Laufgeschwindigkeit beeinflusst (Siebeffekt). Kleine, kompakte DNA-Moleküle wandern dabei schneller als große, linearisierte DNA-Moleküle. Es wurden je nach zu erwartender Fragmentgröße 0.8-2.0 %ige Agarosekonzentrationen verwendet. Dem flüssigen Agarosegel wurden 0.1 µL EtBr/1 mL Agarosegel hinzugesetzt. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid ist in der Lage in ds-DNA zu interkalieren. Die Detektion erfolgt nach Anregung ($\lambda_{\text{abs}}=300 \text{ nm}$) bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\text{em}}=595 \text{ nm}$. Die zur Ermittlung der Fragmentgröße verwendeten Standards sind in Kapitel 5.1.7 dargestellt.

5.3.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

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

$$1A_{260} = 50 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} dsDNA = 33 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} ssDNA = 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \text{ in H}_2\text{O}$$

Der Reinheitsgrad der DNA kann über das 260/280 nm Verhältnis bestimmt werden. Bei Werten im Bereich von 1.8 und 2.0 liegen keine bis wenige Verunreinigungen vor. Werte oberhalb des Bereichs deuten auf RNA-Verunreinigungen, Werte unterhalb dieses Bereiches, auf Proteine oder Aromaten (Phenol) hin. Für die Messung wurden 2 µl der unverdünnten Probe auf die Messplatte des Spektrometers pipettiert.

5.3.4 Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktion von Plasmid-DNA bzw. DNA-Fragmenten wurde mit dem entsprechenden Restriktionsenzym und dem, vom Hersteller empfohlenen Puffer, bei dem enzymspezifischen Temperaturoptimum durchgeführt. Das Restriktionsenzym wurde mit 5-10 U pro µg DNA eingesetzt. Hierbei wurde folgender Ansatz verwendet:

Restriktionsenzym 1 (10 U/µL)	1 µl
Restriktionsenzym 2 (10 U/µL, nur bei Doppelrestriktion)	1 µl
DNA (~1 µg)	x µl
10 x Puffer	2 µl
evtl. BSA, von Enzym abhängig	2 µl
HPLC-H ₂ O	y µl
Gesamt	20 µl

Die Inkubationszeit betrug 1 h. Bei gleichzeitiger Doppelrestriktion musste darauf geachtet werden, dass der verwendete Puffer für beide Enzyme eine maximale Aktivität zur Folge hatte, was aus den Herstellerangaben hervorging. Die Kontrolle der Restriktion erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese.

5.3.5 PCR – Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion dient zur enzymatischen Amplifikation von definierten DNA-Abschnitten unter Verwendung von kurzen Oligonukleotiden (*Primern*). Es handelt sich dabei um einen zyklischen Prozess, bestehend aus Denaturierung, *Primer-Annealing* und *Primer-Extension*. Theoretisch verdoppelt sich in jedem Zyklus die Zahl der DNA-Abschnitte. Die *Annealing*-Temperatur der *Primer* lässt sich empirisch bestimmen (Tabelle 9-1, Anhang). Dabei wird berücksichtigt, dass zwischen Adenin und Thymin zwei Wasserstoffbrücken und zwischen Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrücken ausgebildet werden. Für die Ermittlung der *Annealing*-Temperatur wird die Gesamtzahl der Nukleotide, sowie der Anteil an Guaninen und Cytosinen in einem *Primer* bestimmt. Überhängenden Anteile werden dabei nicht berücksichtigt. Die PCR wurde standardmäßig mit drei verschiedenen DNA Templatkonzentrationen durchgeführt um den Erhalt des PCR Produktes sicherzustellen.

Master Mix für 4 Ansätze:

Puffer (10 x)	10 µL
dNTPs (10 mM)	4 µL
<i>Primer sense</i> (10 µM)	4 µL
<i>Primer antisense</i> (10 µM)	4 µL
AccuPrime <i>Pfx</i> (15 U/µL)	2 µL
Gesamt	26 µL

4 verschiedene DNA-Templat Konzentrationen von 1 ng bis 100 ng

Master Mix	6.5 μ L
DNA-Templat	x μ L
HPLC-H ₂ O	y μ L
Gesamt	20 μ L

Tabelle 5-9: Stufen der PCR.

Stufe	Zyklen	Segment	Temperatur	Dauer
1	1		95 °C	1:30 min
2	10	Denaturierung	95 °C	0:10 min
		Annealing	T _m	0:30 min
		Extension	68 °C	1:00 min/1 kbp
		Slope	-0.2 °C/Zyklus	
3	25-30	Denaturierung	95 °C	0:10 min
		Annealing	T _m -2 °C	0:30 min
		Extension	68 °C	1:00 min/1 kb
4	1		68 °C	5:00 min
5	1	Hold	4 °C	

Bei der PCR handelt es sich um eine Touchdown-PCR, welche zu höherer Spezifität und höheren Ausbeuten führt.

Die Dauer der *Primer*-Verlängerung variiert je nach Länge des zu amplifizierenden DNA-Stücks. Für 1000 bp wurden 60 s veranschlagt. Es wurden 25-30 des Zyklus 3 durchgeführt. Anschließend erfolgte eine 5 minütige Inkubation bei 68 °C, um nicht komplettierte Doppelstränge fertig zu synthetisieren.

5.3.6 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese erlaubt neben Punktmutationen in der DNA den Einbau, die Deletion und den Austausch von Aminosäuren. Durch den Eingriff in die Aminosäuresequenz lassen sich Rückschlüsse auf die Struktur und der damit verbundenen Aktivität von Proteinen gewinnen. Für die Mutagenese sind drei Schritte notwendig:

(1) PCR

Für die mutagene PCR dient ein Plasmid mit dem Zielgen als Templat. Die *Primer* sollen eine Länge von 25 bis 45 Basen haben, wobei die gewünschte Punktmutation bzw. das degenerierte Codon möglichst in der Mitte der *Primer* lokalisiert sein sollte. Folgende Bedingungen wurden für die PCR gewählt:

Master Mix für 3 Ansätze:

Puffer (10 x)	6 μ L
dNTPs (10 mM)	3 μ L
Primer sense (10 μ M)	3 μ L
Primer antisense (10 μ M)	3 μ L
Pfu Turbo (2.5 U/ μ L)	3 μ L
Gesamt	18 μ L

Für die Ansätze wurden 1 μ L, 1.5 μ L und 2 μ L Plasmid-DNA eingesetzt.

Master Mix	6 μ L
DNA-Templat	x μ L
HPLC-H ₂ O	y μ L
Gesamt	20 μ L

Tabelle 5-10: Stufen der mutagenen PCR.

Stufe	Zyklen	Segment	Temperatur	Dauer
1	1		95 °C	2 min
2	30	Denaturierung	95 °C	0:30 min
		Annealing	58 °C	0:30 min
		Extension	72 °C	1:00 min/1 kbp
3		Extension	72 °C	10 min
4	1	Hold	4 °C	

(2) *DpnI* Restriktion

Nach der PCR wird das Plasmid-Templat, welches die ursprüngliche genetische Information trägt, enzymatisch verdaut. Da die in *E. coli* amplifizierte DNA in fast allen Fällen dam-methyliert vorliegt kann diese durch die *DpnI* Endonuklease verdaut werden. (Erkennungssequenz: 5'-Gm⁶ATC-3')

(3) Transformation

Von dem Reaktionsansatz wurden 2 µL in XL10-Gold ultrakompetente Zellen transformiert, die in der Lage sind lineare ssDNA in zirkuläre dsDNA umzuwandeln. Aus den Kolonien wurden Übernachtskulturen angeimpft, die DNA isoliert und sequenziert (GATC, Konstanz).

5.3.7 Gateway®-Technologie

Die Gateway®-Technologie erlaubt einen schnellen und effizienten Transfer von DNA-Sequenzen in unterschiedliche Vektorsysteme zur Funktionsanalyse und Proteinexpression. Die Methode beruht auf dem Prinzip der Amplifikation des Bakteriophagen Lambda (λ -Phagen) in *E. coli*. Die Rekombination des λ -Phagen setzt sich aus dem lysogenen und dem lytischen Zyklus zusammen. Der lysogenen Zyklus wird durch das Phagenprotein Integrase (Int) und dem *E. coli Integration Host Factor* (IHF) katalysiert. Die Integration findet an spezifische *Attachment-Sites*, *attP* auf der Phagen-DNA und *attB* auf dem *E. coli* Genom, statt. Nach der Integration

flankieren *attL* und *attR* *Attachment-Sites* die Phagen-DNA. Im lytischen Zyklus wird mittels der λ -Phagen Enzyme *Int*, *Excisionase* (*Xis*) und dem *E. coli* IHF die Umkehrung der *Attachment-Sites* von *attL* und *attR* in *attB* und *attP* katalysiert. Bei der Verwendung von Primern, die bereits die *attB*-sites enthalten, kann das spätere PCR-Produkt in einer BP-Reaktion (lysogener Zyklus) in einen *Entry*-Vektor bzw. im nachfolgenden Schritt, der LR-Reaktion (lytischer Zyklus) in einen Expressionsvektor kloniert werden. Die kommerziell erhältlichen Enzym-Mixe für BP- sowie LR-Reaktion erlauben Restriktion, Exzision und Ligation in einem Schritt. Zudem ermöglicht der *Entry*-Klon (BP-Reaktion) eine einfache Sequenzierung und den schnellen Wechsel zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Expressionssystemen ohne weitere Notwendigkeit der Sequenzierung.

5.3.7.1 BP-Reaktion

Das *attB*-flankierte PCR-Produkt oder ein linearisierter *attB*-Expressions-Klon wird durch die BP-Reaktion in einen Donor-Vektor (pDONR201, pDONR207) integriert. Während der erfolgreichen Rekombination wird das *ccdB* Gen (*attP*-sites), welches für einen DNA-Gyrase-Inhibitor kodiert, durch das PCR-Produkt (*attB*) ersetzt. Ist dies nicht der Fall, wird nach der erfolgten Transformation das *ccdB* in *E. coli* translatiert, was zur Inhibierung des Zellwachstums führt. Die Enzyme *Int* und IHF nutzen die *Attachment-Sites* um das *attB*-flankierte PCR-Produkt mit dem *attP*-flankierten *ccdB* Gen auszutauschen. Dabei wird ein Teil der Erkennungssequenzen mit dem *ccdB* ausgeschnitten, der entstandene *Entry*-Klon beinhaltet das durch *attL*-sites flankierte PCR-Produkt. Das *ccdB* Gen mit *attR*-sites entsteht als *by*-Produkt (Abb. 3-1).

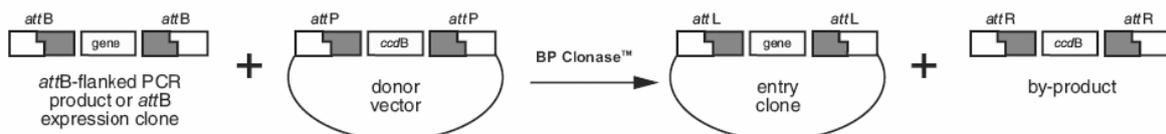


Abbildung 5-1: Herstellung eines Entry-Klons mittels BP-Reaktion (Invitrogen, Online Katalog 2006).

Die Reaktion wurde in einem 1.5 mL Reaktionsgefäß durchgeführt:

PCR-Produkt (15-150 ng)	x µL
pDONR 201/207 (150 ng/ µL)	1 µL
TE-Puffer pH 8.0	y µL
Gesamt	10 µL

Die bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagerte *BP-Clonase II Mix* wurde auf Eis aufgetaut, 2-mal gevortext und 2 µL zur Reaktion zugegeben. Die Reaktion wurde ü.N. bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Thermomixer inkubiert und am darauf folgenden Morgen durch Zugabe von 1 µL Proteinase K (10 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$) abgestoppt. Je 2 µL des Reaktionsansatzes wurden für die Elektrotransformation in 50 µL *E. coli* DH5α oder *E. coli* Turbo bzw. für die Hitzetransformation TOP10 verwendet. Die Selektion erfolgte auf kanamycinhaltigem Nährboden.

5.3.7.2 LR-Reaktion

Das PCR-Produkt, welches sich zwischen den *Attachment-Sites attL* im *Entry*-Vektor befindet wird im Anschluss in einen *Destination*-Vektor kloniert (LR-Reaktion). Diese Vektoren enthalten ebenfalls das *ccdB* Gen, welches hier wiederum durch die *Attachment-Sites attR* flankiert ist. Das Enzym *Xis* excisiert zunächst die *attR* und *attP*-sites flankierender DNA Fragmente, welche im Anschluss durch die umgekehrte Katalyse von *Int* und dem IHF ausgetauscht werden. Der *Entry*-Vektor erhält somit das *ccdB* Gen (*attP*-sites), der *Destination*-Vektor wird zum Expressions-Klon mit flankierenden *attB*-sites (Abb. 3-2).



Abbildung 5-2: Herstellung eines Expressions-Klons mittels LR-Reaktion (Invitrogen, Online-Katalog 2006).

Die Reaktion wurde in einem 1.5 mL Reaktionsgefäß durchgeführt:

pEntry (50-150 ng)	x μ L
pDest (150 ng/ μ L)	1 μ L
TE-Puffer pH 8.0	y μ L
Gesamt	10 μ L

Der *LR-Clonase II Mix* aus dem -80 °C Gefrierschrank wurden auf Eis aufgetaut, 2-mal gevortext und 2 μ L des Enzym-Mix zur Reaktion hinzugegeben. Die Reaktion wurde ü.N. bei 25 °C im Thermomixer inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Reaktion durch die Zugabe von 1 μ L Proteinase K (10 min bei 37 °C) abgestoppt. Im Anschluss wurden 2 μ L des Reaktionsansatzes in 50 μ L *E. coli* DH5 α oder *E. coli* Turbo transformiert. Die Selektion erfolgte auf ampicillinhaltigem Medium. Die isolierten Plasmide konnten anschließend in verschiedene Expressionsstämme transformiert werden.

5.4 Proteinchemische Methoden

5.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Tabelle 5-11: Puffer SDS-PAGE.

SDS-Auftragspuffer pH 6.8	62.5 mM Tris 4.0 % (w/v) Sodiumdodecylsulfat (SDS) 20.0 % (w/v) Glycerin 5.0 % (w/v) β -Mercaptoethanol
Rotiphorese 30	30.0 % (w/v) Acrylamid 0.8 % (w/v) Bisacrylamid
Trenngelpuffer pH 8.8	3.0 M Tris
Sammelgelpuffer pH 6.8	500 mM Tris
10 x SDS Laufpuffer	250 mM Tris 1.92 M Glycin 1.00 % (w/v) SDS
APS-Lösung	10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
SDS- Lösung	10 % (w/v) SDS
Färbelösung	0.25 % (v/v) Coomassie Brilliant Blue R250 9.20 % (v/v) Essigsäure 45.40 % (v/v) Ethanol
Entfärbelösung	20 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure

Proteingemische wurden durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (Laemmli, 1970). Dazu wurde ein diskontinuierliches System, bestehend aus Trenn- und Sammelgel verwendet. Zunächst wurde das Trenngel in die Kammern gegossen und sofort mit Isopropanol überschichtet um eine gerade Kante zu erhalten. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel mit den Taschenformern auf das Trenngel gegeben. Die

fertigen Gele wurden anschließend bei 4 °C in feuchten Tüchern gelagert oder, zur umgehenden Verwendung, in die Elektrophoresekammern eingesetzt und die Apparatur mit 1 x SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Proteinproben wurden im Verhältnis 6:1 mit SDS-Auftragspuffer versetzt und 5 min bei 95 °C gekocht. Dabei werden Tertiär- und Sekundärstrukturen durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken und Streckung der Moleküle gelöst. Disulfidbrücken zwischen Cysteinen wurden durch die reduzierende Wirkung von β -Mercaptoethanol aufgespalten. Pro 1 g Protein binden ca. 1.4 g des anionischen Tensides SDS, so dass die Proteine eine konstante Eigenladung aufweisen. Maximal 20 μ L der behandelten Probe wurden pro Tasche auf das Gel geladen. Zusätzlich wurden 8 μ L des in Kapitel 5.1.7 aufgeführten Proteinstandards aufgetragen. Die Spannung betrug 120 V (konstant). Das Gel wurde anschliessend mit Coomassie gefärbt und überschüssiger Farbstoff durch waschen in Entfärber entfernt.

Tabelle 5-12: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele.

Gelkonzentration	Trenngel			Sammelgel
	10 %	12 %	15 %	5 %
Aqua dest. (mL)	7.9	6.6	4.6	5.5
30 % Rotiphorese (mL)	6.7	8	10	1.3
Trenngelpuffer (mL)	5	5	5	1
10 %ige SDS-Lösung (μ L)	200	200	200	80
10 %ige APS-Lösung (μ L)	200	200	200	80
Temed (μ L)	20	20	20	8

5.4.2 Proteinquantifizierung

5.4.2.1 Warburg-Formel

Die Quantifizierung von Proteinen erfolgt durch Absorptionsmessung bei 280 nm. Bei dieser Wellenlänge besitzen die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin ihr Absorptionsmaximum. Bei der statistisch ermittelten Anzahl an aromatischen Aminosäuren in einem Protein gilt, dass eine Absorptionseinheit bei 280 nm einer Konzentration von 1 mg/mL Protein entspricht. Die exakte Proteinkonzentration lässt sich durch Multiplikation mit dem entsprechenden Extinktionskoeffizienten bestimmen. Voraussetzung dafür ist die Kenntnis der Aminosäuresequenz. Unter Berücksichtigung eventuell vorhandener Nukleinsäure- und Nukleotidverunreinigungen gilt folgendes:

$$\text{Proteinkonz.} = \text{Faktor} \times \text{Proteinkonz.} = (1.55 \times A_{280}) - (0.76 \times A_{260})$$

Für die Messung wird zunächst das Spektrometer mit dem Lagerpuffer des Proteins kalibriert. Die Proteinkonzentration wurde im Anschluss gegen die Referenz gemessen.

5.4.2.2 Bradford-Assay

Das Prinzip des Bradford-Assays beruht darin, dass der verwendete Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue G 250 an anionische Gruppen von Proteinen bindet, wodurch es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm kommt. Die Bradford-Lösung (Biorad) wurde dafür 1:5 mit bidest. Wasser verdünnt. Für die Bestimmung des Referenz-Wertes, wurden 950 µL der Bradford-Lösung mit 50 µL des betreffenden Puffers versetzt. Die Probenvorbereitung zur Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte wie folgt:

Bradford-Lsg.	950 μ L
Proteinlsg.	x μ L
Puffer	y μ L
Gesamt	1000 μ L

5.4.3 Proteinreinigung

5.4.3.1 *Strep-TagII* Affinitätsreinigung der (6-4) Photolyase

Puffer A	100 mM Tris-HCl pH 8.0 50 mM NaCl 1 mM EDTA
Puffer B	Puffer A 2.5 mM Desthiobiotin

Die hohe Bindungselektivität 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* oder, bei größeren Volumina, durch *Batch*-Inkubation an das Säulenmaterial gebunden. Bei der *Batch*-Inkubation wurde das lose Säulenmaterial für 2 Stunden mit der Proteinlösung bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert und anschließend in eine XK16 Säule (GE) gepackt. Die Interaktion erfolgt, wie in Abbildung 5-3 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. Die Fraktionsgröße betrug 2.5 mL. Das Eluat wurde vereinigt und mit 30 kDa Amicon® Ultra Zentrifugenfiltern (Millipore) auf ein Volumen von 500 μ L aufkonzentriert und in HepA Puffer (Kapitel 5.4.3.3) umgepuffert.

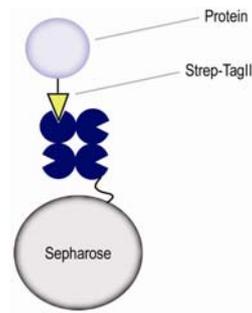


Abbildung 5-3: Prinzip der Strep-TagII Reinigung.

5.4.3.2 *Strep-TagII* Affinitätsreinigung der *E. coli* CPD Photolyase

Storage-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7.4 50 mM NaCl 1 mM EDTA 10 mM DTT 50 % Glycerin
----------------	---

Die *Strep-TagII* Reinigung der CPD Photolyase erfolgte analog der Reinigung der (6-4) Photolyase. Jedoch wurden die gesammelten Fraktionen im Anschluss sofort in *Storage*-Puffer umgepuffert, aufkonzentriert und mittels SDS-PAGE analysiert.

5.4.3.3 *Heparin* Affinitätsreinigung

HepA pH 7.6	100 mM Tris-HCl pH 7.6 50 mM NaCl 1 mM EDTA 5 mM DTT 5% Glycerin
HepB pH 7.6	HepA Puffer 800 mM NaCl

Neben dem Einsatz als Antikoagulant wird das Glucosaminoglycan Heparin, ebenfalls zur Reinigung von DNA-bindenden Proteinen herangezogen. Die Bindung der Proteine erfolgt aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit dem polyanionischen Charakter der Nukleinsäure. Die Interaktion kann durch Erhöhung der Ionenstärke geschwächt werden. Für die Affinitätsreinigung wurden *HiTrap* Heparin HP Säulen (GE) verwendet. Zunächst wurde die Säule mit 5 CV HepA Puffer equilibriert, die Probe über den 500 µL Proben-Loop aufgetragen, Verunreinigungen ausgewaschen und das gebundene Protein mit einem linearen Gradienten von 0 %-100 % HepB in 5 CV eluiert. Die Proteinfractionen wurden vereinigt und mit 30 kDa Amicon® Ultra Zentrifugenfiltern (Millipore) aufkonzentriert und in HepA umgepuffert. Die Proteinkonzentration wurde anschließend mit dem Bradford-Assay bestimmt; die Reinheit mit der beschriebenen SDS-PAGE kontrolliert.

5.4.3.4 Analytische und präparative Größenausschlusschromatographie

Die Feinreinigung des Enzyms wurde mit einer Superdex S200 16/60 pg Säule (GE) in HepA Puffer bei einer Flussrate von 1 mL/min durchgeführt. Reinheit sowie Langzeitlagerung der (6-4) Photolyase mit einer Superdex S200 10/30-Säule (GE) kontrolliert. Als Laufpuffer wurde HepA Puffer verwendet, die Flussrate betrug 0.3 mL/min.

5.4.3.5 Endotoxin-freie Reinigung der (6-4) Photolyase

Die Überexpression von rekombinanten Proteinen in gram-negativen Bakterien wie z.B. *E.coli* führt zu Verunreinigungen mit bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) des Endprodukts. LPS können bei der Immunisierung von Tieren mit nicht endotoxin-freien Antigenen (rekombinanten Proteinen) zu inflammatorischen Prozessen führen.

Um möglichst LPS-freies Antigen für die Immunisierung zu erhalten wurden, wenn möglich, endotoxin-freie Einweg Plastikwaren verwendet. Säulen und Anlage wurden mit 1 M NaOH für 1 h gespült, Amicon® Ultra Zentrifugenfilter (Millipore) wurde mit 0.5 M NaOH vorbereitet. Für alle Puffer und Lösungen wurde

MilliQ-Wasser verwendet. Da die LPS einen hydrophoben Lipidrest mit einer negativen Nettoladung bei leicht saurem, neutralen und basischem pH-Wert besitzen, macht man sich diese Eigenschaft bei der Reinigung der Antigene zunutze. Im Anschluss an die übliche Reinigung wurde die Photolyase zusätzlich über einen Anionentauscher bei pH 8.0 (Q-Sepharose, (GE)), von Endotoxinen befreit. Die Photolyase bindet unter diesen Bedingungen nicht an die Säule, d.h. sie befindet sich im Durchlauf, die Endotoxine wurden mit einer Stoßelution von der Säule eluiert. Als Puffer wurden HepA und HepB Puffer pH 8.0 verwendet. Die gereinigte (6-4) Photolyase wurde anschließend lyophilisiert.

5.4.4 Rekonstitution der (6-4) Photolyase

Photolyasen enthalten neben dem katalytischen Cofaktor FAD einen zweiten, ebenfalls nicht-kovalent gebundenen Cofaktor. Bei dem zweiten Chromophor handelt es sich entweder um ein Flavin- oder einen Deazaflavintyp, welcher nahe an der Proteinoberfläche lokalisiert ist. Aufgrund der Reinigungsprozedur kann es somit leicht zum Verlust kommen. Des Weiteren ist das verwendete Expressionssystem ausschlaggebend dafür, ob der betreffende Cofaktor überhaupt dort synthetisiert werden kann. Um über die Art des in der (6-4) Photolyase von *Drosophila melanogaster* vorzufindenden, zweiten Cofaktors Aufschluss zu erhalten, wurde das Enzym mit verschiedenen, möglichen Chromophoren rekonstituiert. Dazu wurde dem Apoenzym ein 10 molarer Überschuss am zweiten Cofaktor, welcher zuvor in Hep A Puffer resuspendiert wurde, zugegeben und ü.N. bei 4 °C anaerob in der *Glovebox* (Unilab, MBraun) inkubiert. Im Anschluss wurde das rekonstituierte Protein, unter aeroben Bedingungen, vom überschüssigen Cofaktor mittels PD-10 *Desalting columns* (GE) befreit und mit 30 kDa Amicon® Ultra Zentrifugenfiltern (Millipore) auf das gewünschte Volumen aufkonzentriert.

5.4.5 Ermittlung der Bindungskonstanten von F₀

Die Bindungskonstante (K_s) für den zweiten Cofaktor der (6-4) Photolyase aus *D. melanogaster*, wurde durch Titration von jeweils 0.1 eq der Photolyase zu 25 μ L einer 40 μ M F₀-Lösung erhalten. Die Bindung wurde durch die Differenz der Absorptionen, nach Zugabe des Enzyms und 1 h Equilibrierungszeit, bei $\lambda = 420$ nm ($\Delta A_{420\text{nm}}$) bestimmt.

5.4.6 Reparaturassay mit der (6-4) Photolyase

Die Aktivität der Photolyase wurde mit Hilfe eines HPLC-Reparaturassays bestimmt. Dazu wurde Einzel- und Doppelstrang DNA verschiedener Längen, die den T(6-4)T bzw. den T(6-4)C Schaden mittig enthielt, mit dem Enzym in HepA Puffer unter Weislicht (1 x 15 W, Abstand 20 cm), in einem Gesamtvolumen von 100 μ L, inkubiert. Je nach Assay-Typ wurde die Inkubation zwischen 0 und 60 min und bzw. mit unterschiedlichen Enzym/DNA-Verhältnissen durchgeführt. Anschließend wurde die Reaktion bei 95 °C für 5 min abgestoppt und das denaturierte Protein durch Zentrifugation bei 13000 rpm entfernt. Der Überstand wurde auf eine 3 μ m, C₁₈-reversed phase Nucleodur Säule (Machery-Nagel) aufgetragen; die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0-25 % B in 45 min bei einer Flussrate von 0.5 mL/min.

Puffer A	100 mM TEAA in H ₂ O
Puffer B	100 mM TEAA in H ₂ O MeCN 20/80

5.4.7 ^{18}O -Reparaturassay

Reparaturexperimente wurden unter Standardbedingungen (1 h, RT, Weißlicht) durchgeführt (DNA- und Enzymkonzentration: 1.5 mmol/L). Puffer A wurde mit ^{18}O -markiertem Wasser (95 Atom % ^{18}O von *Sigma-Aldrich*) vorbereitet, der reparierte Strang durch analytische RP-HPLC wie beschrieben abgetrennt und die Masse mit FT-ICR-ESI bestimmt (Andreas Glas).

5.5 Kristallisation der (6-4) Photolyase

Für die Kristallisation der (6-4) Photolyase wurde das Protein u.a. mit Selenomethionin markiert. Die Expression fand analog der üblichen Expression in *LeMaster-Medium* (LeMaster und Richards, 1985) statt;⁽¹³⁷⁾ es wurde der Methionin auxotrophe *E. coli* Stamm B824 (DE3) verwendet. Die für die Reinigung verwendeten Puffer wurden alle mit 5 mM DTT versetzt und entgast.

Erste *Screenings* wurden mit *CrystalEX 96 well sitting drop plate* (Corning, New York, USA) und *NeXtal Matrix screens* (Qiagen) durchgeführt. Die 96 well Platten wurden mit dem *Hydra II* Proteinkristallisationsroboter (Matrix Technologies Corporation, Hudson, USA) pipettiert. Das Reservoirvolumen betrug dabei 100 μL , der Kristallisationsansatz 0.2 μL Protein-/DNA-Lösung mit 0.2 μL Reservoirpuffer. Um die Qualität der ersten Kristalle aus dem groben Screening zu verbessern, wurden verschiedene Parameter wie Proteinkonzentration, Konzentrationen der verschiedenen Komponenten des Kristallisationspuffers, pH-Wert, Temperatur, Reservoirvolumen, Tropfengröße, das Verhältnis Protein zu DNA sowie das Verhältnis Protein-/DNA-Lösung zu Reservoirpuffer variiert. Das genauere *Screening* fand in 24 well hanging-drop *Linbro* Platten (Hampton Research) statt.

Die (6-4) Photolyase und deren Mutanten wurde zusammen mit dem T(6-4)T bzw. T(6-4)C Schaden sowie dem T(Dew)T und T(Dew)C mittels der *hanging-drop vapor diffusion* Methode kristallisiert. Dazu wurden 1 μL der Protein/DNA-Lösung mit 1 μL Kristallisationspuffer (0.1 M Hepes pH 7.0, 15-17 % PEG4000 oder 0.1 M MIB pH 8.5, 20-22 % PEG1500) versetzt; das Verhältnis Protein (8.5 mg/mL) zu DNA betrug 1: 1.1. Erste Kristalle waren nach 1-2 Tagen bei 18 °C sichtbar. Für den T(6-4)C Schaden, variierten die Kristallisationsbedingungen leicht. Hier zeigten sich Kristalle nach 5-10 Tagen bei 0.1 M Hepes pH 7.0 und 19 % PEG4000 sowie bei 0.15 M Hepes pH 7.0 und 17 % PEG 3350.

5.5.1 Herstellung eines polyklonalen Antikörpers

Die polyklonalen Antikörper gegen die (6-4) Photolyase aus *D. melanogaster* wurden von der Firma *Eurogentec* hergestellt. Es wurde das *28-day Super Speedy polyclonal antibody protocol* gewählt. Die Immunisierung zweier Kaninchen erfolgte durch vier intradermale Injektionen von je 100 µg Antigen an den Tagen 0, 7, 10 und 18; die Serumgewinnung an den Tagen 0, 21 und 28.

5.5.2 Antikörper-Reinigung mittels Affinitätschromatographie

Puffer A	20 mM Na-Phosphat, pH 7.0
Puffer B	100 mM Glycin-HCl, pH 2.7
Neutralisationspuffer	1 M Tris-HCl, pH 9.0

Zur Isolierung der IgG-Antikörper aus dem Kaninchen-Serum wird die hohe Affinität von Protein A und G für die Fc-Regionen von polyklonalen und monoklonalen IgG-Typ Antikörpern genutzt.

Die Reinigung erfolgte über 1 mL *HiTrap* Protein G HP Säulen (GE) nach Herstellerangaben. 5 mL Serum wurden zunächst von Schwebeteilchen durch Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C befreit. Um restliche Lipide zu entfernen wurde der Überstand über Glaswolle abfiltriert, mit Puffer A verdünnt und auf die Protein G Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Puffer B, pH 2.7. Um eine Schädigung des Antikörpers durch den extremen pH-Wert auszuschließen wurden die Fraktionen in Neutralisationspuffer pH 9.0 aufgefangen (200 µL für 1 mL Fraktionen). Anschließend wurde der Antikörper in den Lagerpuffer überführt.

5.5.3 Immunspezifische Affinitätsreinigung über das Antigen

Durch die in Kapitel 5.5.2 beschriebene Art der Reinigung kommt es häufig zur Verschleppung von Serumbestandteilen sowie der Co-Reinigung von Wirtsspezifischen IgGs. Um eine höhere Reinheit der polyklonalen Antikörper zu erreichen, wurde die gereinigte IgG-Lösung mit Hilfe des Antigens von unspezifischen IgGs und anderen Serumbestandteilen abgetrennt.

Hierfür wurde die gereinigte (6-4) Photolyase zunächst mit *MagBuffer W/I* auf 100 µL verdünnt und an *MagStrep-Beads* (Iba) immobilisiert. Die *Beads* wurden zuvor 3-mal mit 0.1 mL *MagBuffer A* pro mg *Beads* gewaschen und mit 0.05 mL *MagBuffer W/I* pro mg *Beads* equilibriert. Für 500 pmol Protein wurden 5 mg der *Beads* verwendet. Nach 30 min Inkubation bei 16 °C unter gelegentlichem Schütteln wurde der Überstand im Separator entfernt, die *Beads* 3-mal mit 100 µL *MagBuffer W/I* gewaschen. Anschließend wurde die gereinigte IgG-Lösung zu den *Beads* gegeben, analog inkubiert und gewaschen. Der an das Antigen gebundene Antikörper wurde stufenweise mit 30 µL Fraktionen 0.1 M Citratpuffer, pH 3.0 eluiert. Das gebundene Protein mit *MagPuffer E* (2-mal 25 µL) eluiert. Alle Fraktionen wurden zur Kontrolle auf ein SDS-Gel aufgetragen.

5.5.4 Immunpräzipitation

RIPA-Puffer	150 mM NaCl 20 mM Tris-HCl, pH 7.5 1 % NP40 5 mM EDTA
-------------	--

Die Immunpräzipitation isoliert aus einem komplexen Proteinextrakt ein bestimmtes Antigen. In diesem Fall sollte die (6-4) Photolyase aus dem Zellüberstand von *D. melanogaster* über Immunpräzipitation gereinigt werden.

Es wurden ca. 30 g *D. melanogaster* in Flüssigstickstoff schockgefroren, diese mit einem Mörser zerrieben und in RIPA-Puffer aufgenommen. Anschließend wurden die Zellbestandteile durch Zentrifugation im SS34-Rotor (18000 rpm, 30 min, 4 °C) sedimentiert, der Überstand abgenommen und mit dem zuvor gereinigten Antikörper für 1 h bei 4 °C inkubiert. Der Antikörper-Antigen-Komplex wurde mit Protein A Sepharose, die zuvor mit Puffer A equilibriert wurde, für eine weitere Stunde bei 4 °C inkubiert. Der Proteinüberstand wurde mit einer Nutsche entfernt, das Säulenmaterial in eine Säule gepackt, Verunreinigungen und ungebundenes Protein mit Puffer A ausgewaschen und der Komplex mit Puffer B (100 % Puffer B in 0 CV) eluiert. Die Fraktionen wurden anschließend über HPLC und SDS-PAGE analysiert. Zudem wurde das gesuchte Protein mittels tryptischen Verdauung und LC-MS identifiziert.

5.5.5 Western Blot

1 x PBST	1 x PBS 0.1 % Tween 20
MMP-Puffer	1 x PBS 0.1 % Tween 20 4.0 % (w/v) Magermilchpulver

Die am häufigsten verwendete Methode zur Identifikation und Detektion von Proteinen ist die immunologische Detektion mit Antikörpern. Dazu wurden die Proteine zunächst über SDS-PAGE, wie zuvor beschrieben, aufgetrennt und anschließend mit dem *Semi-Dry*-Verfahren (BioRad) auf einer Nitrocellulose Membran (GE) immobilisiert. Das *Extra Thick Blot Paper* (BioRad), die Nitrocellulose Membran und das Gel wurden in 100 mL NuPage® Transfer-Puffer (Invitrogen) getränkt. Der Proteintransfer erfolgte bei 20 V für 35 min. Zur Kontrolle des Transfers wurde die Membran im Anschluss reversibel mit *Ponceau S*-Lösung angefärbt. Freie Bindungsstellen der Membran wurden für 1 h mit MMP-Puffer bei RT abgesättigt, danach die Membran mit dem primären Antikörper für 2 h bei RT oder ü.N. bei 4°C in MMP-Puffer inkubiert, 3-mal 5 min mit MMP-Puffer gewaschen und im Anschluss der

sekundäre Antikörper für 1 h bei RT zugegeben. Der restliche Antikörper wurde durch 3-mal 5 min waschen mit PBST entfernt. Der zweite, mit Peroxidase (HRP) markierte Antikörper, katalysiert die Oxidation des Substrates Luminol, das in einer Chemilumineszenz resultiert.

5.5.6 Strippen der Membran

Stripping-Puffer	62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8 100 mM β -Mercaptoethanol 2 % SDS
TBS-T-Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7.5 150 mM NaCl 0.1 % (v/v) Tween 20

Um die Membran erneut verwenden zu können, ist es nötig die primären und sekundären Antikörper wieder zu entfernen, ohne die dabei an der Membran anhaftenden Proteine zu verlieren. Wird die Membran dauerhaft feucht gehalten, kann diese problemlos beliebig oft mit anderen Antikörpern reinkubiert werden.

Dazu wird der Stripping-Puffer für etwa 5 min auf 60 °C vorgewärmt, die Membran anschließend in den Stripping-Puffer gelegt und 30 min bei 60 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird die Membran 2-mal 10 min in einem großen Überschuss an TBS-T Lösung bei Raumtemperatur gewaschen. Vor erneuter Inkubation mit den Antikörpern muss die Membran erst blockiert werden.

5.6 Analytische Methoden

5.6.1 Tryptischer Peptidverdau

Ammoniumbicarbonatlösung	40 mM NH ₄ HCO ₃ 25 mM NH ₄ HCO ₃
DTT-Lösung	10 mM DTT
Iodacetimidlösung	55 mM Iodacetimid
Trypsinlösung	1 µg/µL Trypsin (Promega) 50 mM Essigsäure

5.6.1.1 Waschen der Gelstücke

Zur Identifizierung der Proteine wurden die Banden aus einem SDS-Gel mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten, 2-mal mit 200 µL ddH₂O und 2-mal mit 200 µL 40 mM Ammoniumbicarbonatlösung für jeweils 30 min bei 37 °C im Thermomixer (600 rpm) gewaschen. Anschließend wurde 2-mal mit 200 µL 40 mM NH₄HCO₃/ Acetonitril 1:1 (v/v) für 5 min bei 37 °C gewaschen. Die Lösung wurde abgenommen und restliches Acetonitril bei RT evaporiert. Im Anschluss wurden die Gelstücke in 100 µL 40 mM NH₄HCO₃-Lösung für 5 min rehydriert, dann 100 µL Acetonitril-Lösung dazugegeben und erneut 5 min inkubiert, die Lösung abgenommen und die Gelstücke für 10 min mit Acetonitril überschichtet. Überschüssiges Acetonitril wurde in der *SpeedVac* entfernt.

5.6.1.2 Reduktion der Disulfidbrücken

Für die Reduktion der Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten wurden die Gelstücke in 100 µL 40 mM NH₄HCO₃-Lösung mit 10 mM DTT bei 56 °C für 45 min inkubiert, anschließend die Lösung auf RT abgekühlt und der Überstand abgenommen.

5.6.1.3 Alkylierung der Cysteinreste

Die freien Cysteinreste wurden im nächsten Schritt in 100 µL frisch angesetzter 55 mM Iodacetamidlösung in 40 mM NH₄HCO₃-Lösung für 30 min bei RT im Dunkeln alkylert. Die Lösung wurde abgenommen und die Gelstücke 2-mal in je 200 µL 40 mM NH₄HCO₃/Acetonitril 1:1 (v/v) für 15 min gewaschen, mit 100 µL Acetonitril für 10 min überschichtet und das Gel in der *SpeedVac* für 10-15 min getrocknet.

5.6.1.4 In-gel Verdau

Im Anschluss wurde 1 µL Trypsinlösung (Promega) auf das Gel pipettiert und 3 min bei 37 °C inkubiert, bevor das Gel mit 40 µL 40 mM Ammoniumbicarbonatlösung überschichtet wurde und ü.N. bei 37 °C und 200 rpm im Thermomixer geschüttelt wurde.

5.6.1.5 Extraktion der Peptide

Am nächsten Tag wurde die Ammoniumbicarbonatlösung abgenommen und bei 4 °C gelagert. Für die Extraktion wurden nacheinander 100 µL 25 mM NH₄HCO₃-Lösung, 100 µL Acetonitril zu den Gelstücken gegeben und jeweils 15 min im Ultraschallbad inkubiert. Die Lösung wurde abgenommen und ebenfalls bei 4 °C aufbewahrt. Dieser Schritt wurde mit 5 %iger Ameisensäure und Acetonitril wiederholt. Der Überstand wurde mit den zuvor bei 4 °C gelagerten Fraktionen vereinigt und in der *SpeedVac* auf ca. 40 µL aufkonzentriert.

5.6.1.6 LC-MS

Die Peptidfragmente des tryptischen Verdau wurden in der Gruppe von Dr. Stephan Sieber gemessen. Dazu wurde die Peptidlösung auf einer *Dionex* C18 Nano Trap Column (100 µm) entsalzt und das Eluat anschließend mit einer *Dionex* C18 PepMap 100 (3 µm) aufgetrennt. Die Peptidfragmente wurden durch Tandem MS sowie hoch-auflösender MS auf einem gekoppeltem *Dionex* Ultimate 3000 LC-ThermoFinnegan LTQ-FT MS System analysiert. (Elutionspuffer A: MeCN/H₂O

und Puffer B: MeCN/H₂O, 5 % Ameisensäure; Gradient: 5 % Puffer B für 5 min, 5-60 % B in 65 min; 60-95 % B in 1 min Gesamtzeit/Lauf: 95 min)

Die MS Daten wurden auf Basis des SEQUEST Algorithmus gegen die entsprechende Datenbank der „bioworks“ Software ausgelesen. Die Suche beschränkte sich dabei auf tryptische Peptide, zweifach überspringende Spaltstellen, monoisotopische Vorläuferionen und eine Peptidtoleranz von <10 ppm. Zur Verfeinerung der Suche wurden zusätzliche Filter gesetzt: Der *Xcorr vs. change state* Filter wurde auf Werte von 1.5, 2.0 und 2.5 für die Ladungszustände +1, +2 und +3 festgelegt. Die Anzahl der unterschiedlichen Peptide musste ≥ 2 sein und der Wahrscheinlichkeitsfilter wurde auf <0.001 gesetzt. Die Filterangaben entsprechen ähnlichen, bereits veröffentlichten Werten der SEQUEST Analyse.

5.6.2 HPL-Chromatographie

Analytische HPLC wurde auf einem *Waters* System, welches mit einer 3 μm C₁₈-*reversed phase* Nucleodur Säule from *Machery-Nagel* ausgestattet war, durchgeführt (Elutionspuffers A: 0.1 M TEAA in H₂O und Puffer B: 0.1 M TEAA in H₂O/MeCN 20/80). Gradient: 0-25 % B in 45 min mit einer Flussrate von 0.5 mL/min. Die präparative HPLC wurde ebenfalls auf einem *Waters* System mit einer Nucleodur Säule (C18ec, 250 * 10 mm, 5 μm Partikelgröße) C₁₈-*reversed phase* von *Machery-Nagel*, durchgeführt. Gradient: 4-18 % B in 45 min mit einer Flussrate von 5 mL/min. Die Elution wurde bei 260 nm und 325 nm überwacht.

5.6.3 Fluoreszenz- und UV/VIS-Spektroskopie

Absorption- and Fluoreszenz-Messungen wurden mit einem *Carey 100 Bio* (Varian) Spektrophotometer und einem *FP-750* (Jasco) Spektrofluorometer durchgeführt. Alle Messungen wurden unter aeroben Bedingungen bei RT durchgeführt.

Die Absorptions- und Fluoreszenz-Spektren ($\lambda_{\text{ex}}=370$ nm, $\lambda_{\text{em}}=400$ nm) des gereinigten Enzyms wurden direkt nach der *Strep-TagII* Reinigung in Puffer B (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2.5 mM Desthiobiotin), nach Hitzedenaturierung und Reduktion mit 10 mM Na-Dithionit, aufgenommen.

5.7 Chemische Synthese des F₀-Cofaktors

5.7.1 Analytik und verwendete Geräte

Alle ¹H-Kernresonanzspektren (¹H-NMR) wurden bei Raumtemperatur mit den Geräten *Varian INOVA 400*, *Bruker ARX 300* und *Bruker ARX 600* aufgenommen. In Klammern sind jeweils die Messfrequenzen in MHz und das Lösungsmittel angegeben. Die chemische Verschiebung δ wird in parts per million (ppm) relativ zu TMS angegeben. Als interner Standard dienten die Lösungsmittelsignale von CDCl₃ ($\delta = 7.26$ ppm) und [D₆]DMSO ($\delta = 2.50$ ppm). Die Kopplungskonstante J wird in Hz angegeben. Die Signalmultiplizitäten werden mit den Symbolen s (Singulett, bzw. *br* s für breites Singulett), d (Dublett), dd (Dublett eines Dubletts), ddd (Dublett eines Dubletts eines Dubletts) und m (Multiplett) beschrieben. Die Peakzuordnungen erfolgten teilweise mit Hilfe von COSY-, HMBC- und HSQC-Spektren.

Alle ¹³C-Kernresonanzspektren (¹³C-NMR) wurden bei Raumtemperatur mit den Geräten *Varian INOVA 400*, *Bruker AMX 600* und *Bruker ARX 300* ¹H-Breitbandentkoppelt aufgenommen. In Klammern sind jeweils die Messfrequenzen in MHz und das Lösungsmittel angegeben. Die chemische Verschiebung δ wird in parts per million (ppm) relativ zu TMS angegeben. Als interner Standard dienten die Lösungsmittelsignale von CDCl₃ ($\delta = 77.00$ ppm) und [D₆]DMSO ($\delta = 39.43$ ppm). Die Peakzuordnungen erfolgten teilweise mit Hilfe von HSQC- und DEPT-Spektren.

Massenspektren (MS) wurden auf einem *Finnigan LTQ-FT (ESI)* gemessen. Bei allen Massenspektren wurden der wichtigste Molekülpeak in *m/z* Einheiten angegeben.

5.7.2 Allgemeine Arbeitsmethoden

Analytische und semipräparative RP-HPLC wurden auf Anlagen der Firma *Waters* durchgeführt (für die analytische Anlage 2996 *Photoiode Array Detector* und 2695 *Seperations Modul*, sowie für die präparative Anlage 2487 *Dual λ Absorbance Detector* und 1525 *Binary HPLC Pump*). Für die analytische Trennung wurde eine *Nucleodur 100-3 C₁₈* Säule und für die präparative Trennung eine *Nucleodur 100-5 C₁₈* Säule verwendet. Beide Säulen stammen von der Firma *Machery-Nagel*. Puffersystem: Puffer A 0.1 M TEAA in H₂O und Puffer B 0.1 M TEAA in H₂O/MeCN 20/80. Analytische Trennung: Gradient: 0–25 % Puffer B in 45 min, Fluss 0.5 mL/min; präparative Trennung: Gradient: 0–25 % Puffer B in 45 min, Fluss 5 mL/min.

Fluoreszenz- und UV/Vis-Spektroskopie wurde an einem *Jasco®* UV/Vis-Spektrofluorometer FP-750 sowie einem *Carey Bio-100* (*Varian*) UV-Spektrometer durchgeführt.

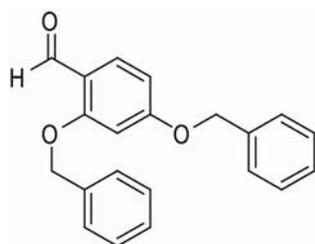
Ionenaustauschchromatographie wurde mit *Dowex 1-X8* (Cl⁻ Form, 50 – 100 mesh), der Firma *Fluka* durchgeführt.

Chemikalien und Lösungsmittel wurden von den Firmen *Acros*, *Fluka* und *Merck* in den üblichen Qualitäten *puriss.*, *p.a.* und *purum* bezogen. Lösungsmittel für die HPLC waren von der Qualität *Chromasolv®*. Wurde eine Reaktion unter Stickstoffschutzgasatmosphäre durchgeführt, so wurde die Apparatur zuvor ausgeheizt, wobei ein Ölpumpen-Vakuum von 10⁻²-10⁻³ mbar angelegt wurde. Zum

Einengen *in vacuo* wurde ein Rotationsverdampfer verwendet, wobei das Vakuum mit einer Membranpumpe erzeugt worden ist. Reaktionsprodukte wurden am Hochvakuum (10^{-2} - 10^{-3} mbar) oder am Lyophilisator getrocknet.

5.7.3 Synthese von F₀

2,4-Bisbenzyloxybenzaldehyd **12**

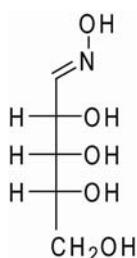


2,4-Dihydroxybenzaldehyd (5.0 g, 36.2 mmol, 1.0 eq), Benzylbromid (12.9 g, 75.6 mmol, 2.0 eq) und K_2CO_3 (15.0 g, 108.5 mmol, 3.0 eq) wurden in 60 mL Aceton 8 h unter Rückfluss erhitzt, das Reaktionsgemisch anschließend über Celite abfiltriert und das Filtrat eingengt. Das Konzentrat wurde in 40 mL Ethylacetat gelöst, mit je 50 mL Na_2CO_3 , 3 % HCl und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, die organische Phase über $MgSO_4$ getrocknet und eingengt. Der Rückstand wurde aus einem Gemisch Chloroform/Ether 1:1 umkristallisiert. Das Produkt wurde in Form von hellgelben Kristallen erhalten (5.0 g, 15.6 mmol, 43 %).

1H -NMR: (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 5.09, 5.12 (2 s, 4 H, CH_2), 6.58, 6.64 (2 s, 2 H, $CH_{arom.}$), 7.31-7.43 (m, 10 H, $CH_{arom.}$), 7.83 (d, J = 9.0 Hz, 1 H, $CH_{arom.}$), 10.38 (s, 1 H, CHO).

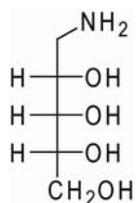
^{13}C -NMR: (300 MHz, $CDCl_3$): δ = 70.61, 70.68, 100.39, 107.23, 119.75, 127.49, 127.75, 128.51, 128.96, 130.71, 136.12, 136.14, 162.96, 165.37, 188.44.

HRMS (ESI, $[M+H]^+$): berechnet für $[C_{21}H_{18}O_3+H]^+$: 319.1334, gefunden: 319.1327.

D-Ribose-Oxim **11**

Unter Stickstoffatmosphäre wurde in einem ausgeheizten Kolben Hydroxylaminhydrochlorid (8.7 g, 125.2 mmol, 1.5 eq), Ethanol absolut (58 mL) und Triethylamin (18 mL, 130 mmol, 1.5 eq) gegeben und das Gemisch auf 75 °C erwärmt. Nach dem lösen des Hydroxylaminhydrochlorids wurde D-Ribose (12.0 g, 85.0 mmol, 1.0 eq) dazugegeben und weitere 20 min bei 75 °C gerührt. Das in Form von farblosen Kristallen ausgefallene Oxim wurde abfiltriert, aus absoluten Ethanol umkristallisiert und am HV getrocknet. Das Oxim wurde (4.4 g, 26.7 mmol, 31%) als ein farbloses Pulver erhalten.

HRMS (ESI, $[M+H]^+$): berechnet für $[C_5H_{11}NO_5+H]^+$: 166.0715, gefunden: 166.0710.

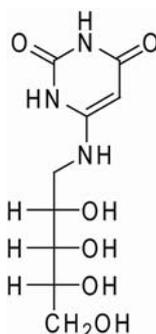
Ribitylamin **10**

Zu einer Suspension aus Ribose-Oxim (4.4 g, 26.7 mmol, 1.0 eq) in 100 mL Eisessig wurden 1.7 g Pd/C(10%)-Katalysator gegeben, das Gemisch 20 h bei RT unter H₂-Atmosphäre stark gerührt und anschließend über Celite filtriert. Das Filtrat wurde zweimal mit je 50 mL Wasser gewaschen und im Anschluss jeweils eingengt. Das

gelbliche Öl wurde in 25 mL Wasser gelöst und mittels Ionenaustauschchromatographie (Dowex 1-X8, Hydroxidform, 80 g) gereinigt. Dazu wurde das Säulenmaterial zunächst mit OH⁻-Ionen beladen und mit Wasser ein pH-Wert von 6-7 eingestellt. Die Fraktionen wurden ab dem Zeitpunkt gesammelt, als das Eluat alkalisch wurde, dann eingengt und am HV getrocknet. Das Amin wurde als gelbes Öl erhalten (2.0 g, 13.2 mmol). Um die genaue Ausbeute des Amins **10** zu bestimmen wurde das erhaltene Produkt mit 0.1 molarer HCl-Lösung titriert, wobei die daraus bestimmte Menge an Amin 60 % betrug (1.2 g, 7.1 mmol).

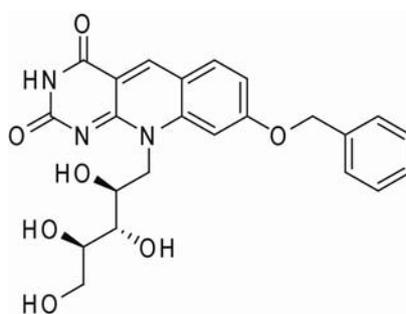
HRMS (ESI, [M+H]⁺): berechnet für [C₅H₁₃NO₄+H]⁺: 152.0917 gefunden: 152.0918.

4-Ribitylamino-2,6-dihydroxypyrimidin **9**



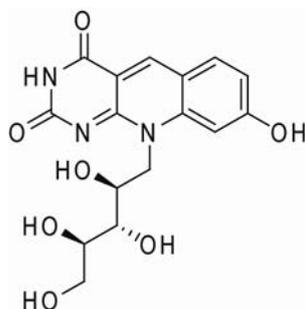
In einem Druckrohr wurde **10** (1.8 g, 11.9 mmol, 4.0 eq; davon 60 % Ribitylamin) und 6-Chloruracil (0.3 g, 1.8 mmol, 1.0 eq) in 10 mL Wasser gelöst und für 3 h bei 128 °C erhitzt. Nach Abkühlen wurde das Wasser am HV entfernt und das Rohprodukt (2.0 g, 7.7 mmol) ohne weiteren Reinigungsschritt in der nächsten Reaktion eingesetzt.

HRMS (ESI, [M-H]⁻): berechnet für [C₉H₁₅N₃O₆-H]⁻: 260,0888, gefunden: 260,0899

8-Benzyloxy-10-*D*-ribityl-5-deazaflavin **8**

In einem ausgeheizten Kolben wurde **9** (2.0 g, 7.7 mmol, 1.34 eq) und 2,4-Dibenzyloxybenzaldehyd (1.8 g, 5.6 mmol, 1.0 eq) in 20 mL trockenem DMF 3.5 h refluxiert. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch langsam auf 1 L Eiswasser gegeben und der ausgefallene gelbe Niederschlag abzentrifugiert (12 000 rpm, 15 min). Das Präzipitat wurde 2 mal mit 100 mL Methanol gewaschen und am HV getrocknet. Das Deazariboflavin **8** wurde in Form eines gelben Pulvers erhalten (0.5 g, 1.1 mmol, 20 %).

HRMS (ESI, $[M+H]^+$): berechnet für $[C_{23}H_{23}N_3O_7+H]^+$: 454.1609, gefunden: 454.1618.

8-Hydroxy-10-*D*-ribityl-5-deazaflavin **1**

Unter Stickstoffatmosphäre wurde **8** (0.1 g, 0.2 mmol, 1.0 eq) und 50 mg Pd/C(10%)-Katalysator in 30 mL Eisessig gegeben. Nach Ersetzen der

Stickstoffatmosphäre gegen eine Wasserstoffatmosphäre wurde der Reaktionsansatz für 5 h bei RT gerührt. Der Katalysator wurde durch Filtration über Kieselgur abfiltriert, mit 50 mL Methanol gewaschen und das Lösungsmittel anschließend *in vacuo* entfernt. Der Rückstand wurde mit 0.2 mL Trifluoressigsäure und 5 mL eiskaltem Diethylether versetzt. Der ausgefallene gelbliche Niederschlag wurde dreimal gewaschen (4000 rpm, 10 min, 4 °C) und dabei jeweils in 5 mL Diethylether im Ultraschallbad resuspendiert. Das Rohprodukt wurde anschließend mittels RP-HPLC aufgereinigt (0.027 g, 0.074 mmol, 37 %).

6 Ergebnisse und Diskussion

6.1 Charakterisierung der (6-4) Photolyase

6.1.1 Homologievergleich der Photolyase/Cryptochrom Superfamilie

Neben der (6-4) Photolyase aus *Drosophila melanogaster*^(52, 88, 90) konnten bisher sieben weitere (6-4) Photolyasen eindeutig identifiziert werden. Dazu gehören die (6-4) Photolyasen aus *Arabidopsis thaliana*,^(89, 138, 139) *Crotalus atrox*,⁽¹⁴⁰⁾ *Danaus plexippus*,⁽¹⁴¹⁾ *Danio rerio*,⁽¹⁴²⁾ *Dunaliella salina*,⁽¹⁴³⁾ *Halobacterium salinarium*⁽¹⁴⁴⁾ und *Xenopus laevis*.^(92, 140) Die Konsensusidentität beträgt dabei 73 %, die Sequenzidentität dagegen lediglich 25 % (Abb. 6-1), was die Abgrenzung der (6-4) Photolyasen von den CPD Photolyasen und den Cryptochromen aufgrund der Primärstruktur deutlich erschwert. Der phylogenetische Vergleich in Abb. 6-3 B zeigt die extrem enge Verwandtschaft der eukaryotischen (6-4) Photolyasen und der Cryptochrome. Allgemein beträgt die Sequenzidentität zwischen (6-4) und CPD Photolyasen 13-30 % (Konsensusidentität: 24 %), zwischen (6-4) Photolyasen und Cryptochromen sogar 44-53 %. Die Konsensusidentität zwischen (6-4) Photolyase und Cryptochromen liegt z.T. bei bis zu 84 %. Die C-terminale Region der (6-4) und CPD Photolyasen ist, im Vergleich zur Gesamtsequenz, hoch-konserviert. Die Identität steigt hier beispielsweise zwischen *Xenopus laevis* (6-4) Photolyase und *E. coli* CPD Photolyase auf 36 %; die Identität der vollen Sequenz beträgt dagegen nur 24 %.⁽⁹⁴⁾ In der C-terminalen Region befinden sich neben dem aktiven Zentrum auch ein Großteil der Aminosäuren, welche an der Bindung des FAD-Cofaktors beteiligt sind. Trotz der hoch-konservierten Reste im C-terminalen Ende und großer struktureller Ähnlichkeit unterscheiden sich (6-4) und CPD Photolyasen sowie Cryptochrome erheblich in DNA-Bindung, katalytischer Aktivität und Substratspezifität.

Todo et al. identifizierte in Mutationsstudien zwei konservierte Histidinreste, His354 und His358 (Abb. 6-2, rot markiert), im aktiven Zentrum der (6-4) Photolyase aus *Xenopus laevis* (His365 und His369 für *D. melanogaster*), die essentiell für deren katalytische Aktivität sind.⁽⁹⁴⁾ Auf der Suche nach weiteren potentiellen (6-4) Photolyasen wurden die Ergebnisse des *BLAST search* (NCBI) insbesondere auf das Vorhandensein der beiden konservierten Histidine hin geprüft (Abb. 6-2), welche die (6-4) Photolyasen von den Cryptochromen bzw. CPD Photolyasen abgrenzen. Letztere weisen anstelle der Histidine ebenfalls zwei hoch-konservierte Reste, Asparagin und Methionin (Abb. 6-2, rot markiert), auf.

<i>CPD Anacystis</i>	(344)	GWMHNRC	MI	V	A	S	F	L	T	K	-DL	(404)	R	I	F	N	P	A	S	Q	A	K	K	F	D										
<i>CPD E. coli</i>	(338)	GWMHNRL	R	M	I	T	A	S	F	L	V	K	-DL	(398)	R	I	F	N	P	T	T	Q	E	K	F	D									
(6-4) <i>Danio rerio</i>	(350)	G	W	I	H	H	L	A	R	H	A	V	A	C	F	L	T	R	G	D	L	(410)	R	V	Y	S	P	I	A	F	G	K	K	T	D
(6-4) <i>Xenopus laevis</i>	(350)	G	W	I	H	H	L	A	R	H	A	V	A	C	F	L	T	R	G	D	L	(410)	R	V	Y	S	P	V	A	F	G	K	K	T	D
(6-4) <i>Drome</i>	(361)	G	W	I	H	H	L	A	R	H	A	V	A	C	F	L	T	R	G	D	L	(421)	R	V	Y	S	P	V	A	F	G	K	K	T	D
(6-4) <i>Ostreococcus tauri</i>	(404)	G	W	L	H	H	L	A	R	H	A	V	A	C	F	L	T	R	G	D	L	(464)	R	V	Y	S	P	T	A	F	A	K	K	Y	D

Abbildung 6-2: Sequenzalignment zwischen dem vermuteten aktiven Zentrum einiger (6-4) Photolyasen und CPD Photolyasen. Gelb hinterlegt: identische Reste; grau hinterlegt: konservierte Reste. Die für die katalytische Aktivität essentiellen Aminosäuren sind rot gekennzeichnet. Im Vergleich dazu, die Aminosäuren in der entsprechenden Position in den CPD Photolyasen.

Bei der Suche konnte eine potentielle, bisher nicht bekannte eukaryotische (6-4) Photolyase aus dem Organismus *Ostreococcus tauri* OTH95 (Abb.6-3 A)⁽¹⁴⁵⁻¹⁴⁷⁾ identifiziert werden. Diese winzige, einzellige Grünalge (*Prasinophyceae*) gehört einer der ältesten Gruppen innerhalb der photosynthetisch aktiven Eukaryoten an und ist Vorläufer des heutigen Pflanzenreichs. *O. tauri* zeigt eine minimale zelluläre Organisation: Eine nackte, fast einen Mikrometer große Zelle; kokkoidal mit einem einzigen Mitochondrium und einem Chloroplasten. Aufgrund ihrer Lichtanpassung haben sich drei Ecotypen entwickelt. *O. lucimarinus*, der in den

Oberflächengewässern zu finden ist und an hohe Lichtintensitäten adaptiert ist; *RCC141*, der in tieferen Wasserschichten lebt und sich an niedrige Lichtintensitäten angepasst hat sowie *O. tauri*, der in Meeresbuchten zu finden ist und sich an unterschiedliche Lichtverhältnisse adaptiert hat.

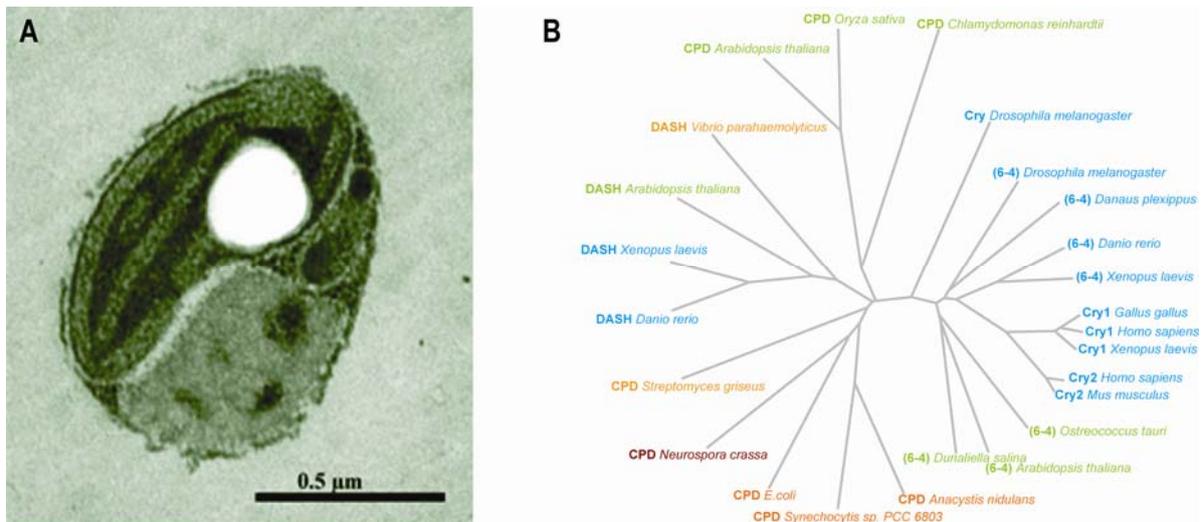


Abbildung 6-3: (A) *Ostreococcus tauri* OTH95. Foto: Hervé Moreau, Laboratoire Arago. (B) Phylogenetische Analyse einiger (6-4) und CPD Photolyasen sowie Cryptochrome. Blau, eukaryotische Enzyme; grün: Pflanzen; orange: Bakterien; rot: Pilze.

Die Sequenzidentität zwischen der (6-4) Photolyase aus *D. melanogaster* und der potentiellen Photolyase aus *O. tauri* beträgt 43 % (Konsensusidentität: 53 %), wobei die katalytisch wichtigen Histidinreste (His408 und His412) ebenfalls vorhanden sind. Die Sequenzhomologie beträgt im C-terminalen Rest (AS 210 bis Ende) 45 %. Verglichen mit anderen (6-4) Photolyasen sinkt die Identität der gesamten Sequenz auf lediglich 21 %. Phylogenetisch zeigt die Photolyase aus *O. tauri* eine nahe Verwandtschaft zu den pflanzlichen (6-4) Photolyasen aus *Arabidopsis thaliana* und *Dunaliella salina* auf (Abb. 6-3 B). Um die Vermutung zu bestätigen, dass es sich dabei um eine potentielle (6-4) Photolyase handelt, wurde im Rahmen einer Diplomarbeit von *Emine Kaya* die potentielle (6-4) Photolyase kloniert, überexprimiert und mit dem gereinigten Enzym Aktivitätsstudien durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich aufgrund der

Substratspezifität und katalytischen Aktivität tatsächlich um eine (6-4) Photolyase handelt.⁽¹⁴⁸⁾

6.1.2 Klonierung und Expression der (6-4) Photolyase aus *D. melanogaster*

Die Klonierung und Expression der (6-4) Photolyase aus *D. melanogaster* wurde erstmals von *Todo et al.* 1996 beschrieben.⁽⁹⁰⁾ Das dabei verwendete Expressionssystem wurde aufgrund geringer Ausbeuten und schlechter Reinigungsmöglichkeiten nicht weiter verfolgt und anstelle dessen ein völlig neues Expressionssystem verwendet, welches sich hinsichtlich Ausbeute und Reinheit leicht optimieren ließ. *Dr. Carsten Pieck* verwendete deshalb für das ursprüngliche Konstrukt der (6-4) Photolyase das *Gateway®-System* (Invitrogen) mit dem Expressionsvektor *pDest007*, der einen N-terminalen *Strep-TagII* beinhaltet. Erste Expressionsversuche und Reinigungen zeigten allerdings, dass das Protein am C-terminalen Ende proteolytisch verdaut wurde. In Abbildung 6-4 ist die Doppelbande bei 63 und 60 kDa ersichtlich.

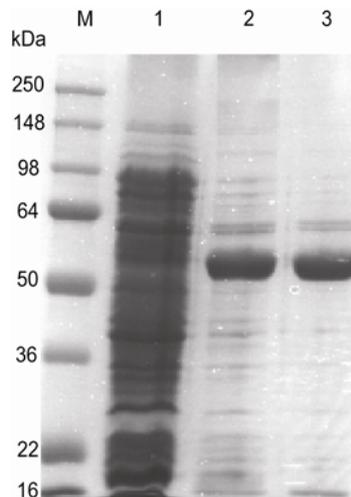


Abbildung 6-4: SDS-PAGE der Reinigung der (6-4) Photolyase. Spur M: Proteinmarker, Spur 1: Zellextrakt nach Aufschluss, Spur 2: gereinigte (6-4) Photolyase nach *Strep-TagII* Chromatographie, Spur 3: gereinigte (6-4) Photolyase nach Gelfiltration.

Da eine heterogene Proteinlösung für spätere Kristallisationsversuche problematisch ist, wurde zunächst versucht die Proteaseschnittstelle zu finden. Dazu wurde ein Verdau der Proteinsequenz über das Programm *PeptideCutter* der *expasy* Internetseite simuliert. Hierbei konnte jedoch mit den in der Datenbank vorhandenen Proteasen die Schnittstelle nicht identifiziert werden. Da beide Formen der (6-4) Photolyase an die *Strep-TagII* Säule gebunden hatten, wurde vermutet, dass sich die Schnittstelle im C-terminalen Bereich des Proteins befinden musste. Versuche das C-terminale Ende durch einen His₆-Tag vor dem Verdau zu schützen gelangen nicht. Ein Blick auf das Sequenzalignment der (6-4) Photolyasen in Abb. 6-1 zeigt, dass die letzten 50 Aminosäuren am C-Terminus wenig Homologie besitzen. Dies weist auf eine geringe Funktionalität dieser Region hin. Aufgrund dessen wurde die Sequenz um die letzten 20 Aminosäuren gekürzt. Für die Herstellung des Expressionsvektors wurde das *Gateway®-System* (Invitrogen) verwendet. Es ermöglicht eine zeiteffiziente Klonierung und gleichzeitig erleichtert es, durch die Herstellung eines *Entry-Vektors* (*pEntry201-phr64-520*, Abb. 6-5 A), das Einbringen des Genprodukts in unterschiedliche Expressionsvektoren.

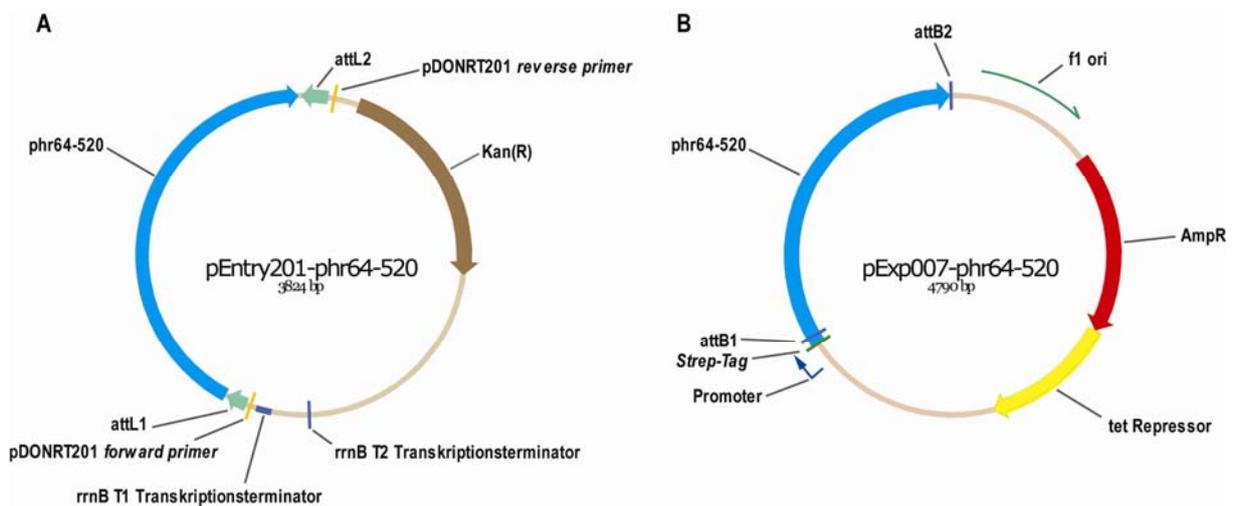


Abbildung 6-5: Darstellung der Gateway®-Plasmide *pEntry201-phr64-520* und *pExp007-phr64-520* für die Expression der (6-4) Photolyase.

Die verkürzte Version der (6-4) Photolyase wurde in den Vektor *pDest007* kloniert (*pExp007-phr64-520*, Abb. 6-5 B), wobei ein Fusionsprotein mit einem N-terminalen *Strep-TagII* erzeugt wurde. Der Vorteil des *Strep-Tags* besteht in der geringen Größe von nur 8 Aminosäuren was, im Gegensatz zum *GST-Tag*, wenig Probleme bei der Kristallisation bereitet. Zudem ist die Affinitätsreinigung mittels *Strep-Tag* hinsichtlich der Reinheit dem *His₆-Tag* zu bevorzugen. Das Fusionsprotein wird dabei unter physiologischen Bedingungen eluiert und verliert nicht an Aktivität. Um die Expressionsausbeute zu verbessern, wurden neben verschiedenen *E. coli* Stämmen auch Medien sowie Temperatur und Dauer der Expression variiert. Die besten Ergebnisse wurden mit *E. coli* Rosetta™ (DE3) in TB-Medium erzielt. Der *E. coli* Stamm Rosetta™ DE3 (Novagen) codiert sieben zusätzliche, in *E. coli* kaum verwendete, tRNAs, wodurch die Effizienz der Translation und somit der Expression von eukaryotischen Proteinen deutlich gesteigert wird. Die Zellen wurden bei 37 °C inkubiert und das lösliche Protein nach Induktion bei 16 °C für 12 h exprimiert (Tabelle 6-1). Nachdem die Zellen mittels Hochdruckhomogenisator oder *French Press* aufgeschlossen und restliche Zellbestandteile abzentrifugiert wurden, konnte das Protein über Affinitätschromatographie gereinigt werden. Trotz hoher Reinigungseffizienz der *Strep-Tag* Säule konnten hierbei nicht alle Verunreinigung abgetrennt werden, so dass ein weiterer Reinigungsschritt vorgenommen wurde. Die Verwendung der *HiLoad* Superdex S200 pg Gelfiltrationssäule zeigte, dass das Protein (Abb. 6-6 blau) mit dem Ausschlussvolumen der Säule eluierte. Dies entspricht einer Größe von etwa 670 kDa.

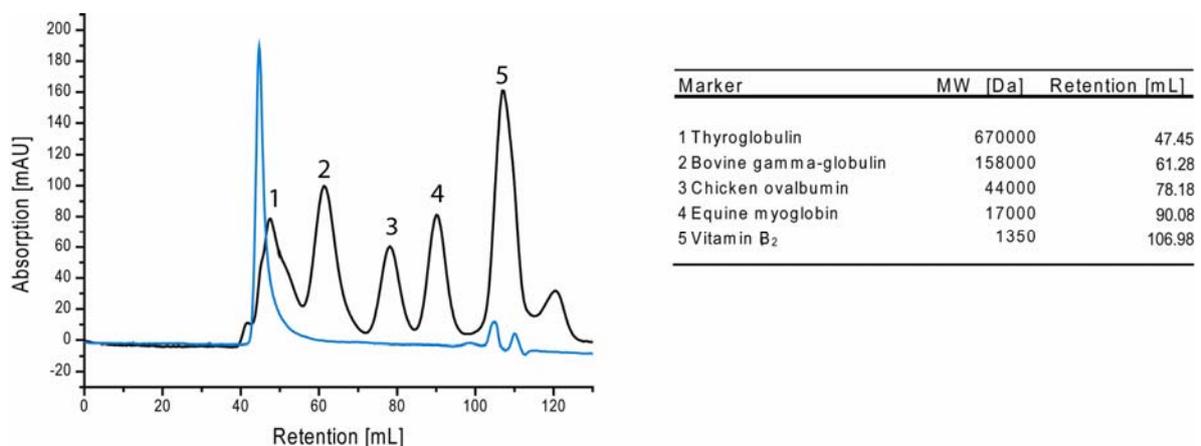


Abbildung 6-6: Chromatogramm des Gelfiltrationslaufs (S200 pg).

Im Chromatogramm des Gelfiltrationslaufs waren ansonsten, im Vergleich zu dem SDS-Gel, auffällig wenige Verunreinigungen zu sehen. Da es sich bei der (6-4) Photolyase um ein DNA-bindendes Protein handelt, wurde vermutet, dass das Enzym mit weiteren Proteinen an die genomische DNA der *E. coli* Zellen bindet und diese bei der Affinitätsreinigung mit co-gereinigt werden. Dies würde erklären, warum die restlichen Verunreinigungen nicht abzutrennen waren und im Chromatogramm des Gelfiltrationslaufs lediglich ein markanter Peak im Säulenausschluss zu sehen ist.

Tabelle 6-1: Expressionsbedingungen der (6-4) Photolyase aus *Drosophila melanogaster*.

<i>E. coli</i> Stamm	Rosetta™ (DE 3)
Umdrehung	200 rpm
Medium	TB
Wachstumstemperatur v. Induktion	37 °C
OD ₆₀₀ zum Zeitpunkt der Induktion	1.0-1.2
Enkonzentration Induktor (AT)	0.4 mM
Dauer der Expression	12 h
Temperatur während der Expression	16 °C

Um die Reinheit es Proteins zu verbessern und die genomische DNA zu entfernen, wurde die Proteinlösung nach abzentrifugieren der Zellbestandteile mit DNase I (Sigma) behandelt. Die Endonuklease spaltet unter Anwesenheit von Mg²⁺ und Ca²⁺-Ionen einzel- und doppelsträngige DNA unspezifisch in Di-, Tri- und Oligonukleotide. Nach Inkubation bei 4 °C für 1 h wurde der Proteinextrakt zunächst wie gewohnt über eine *Strep-Tag* Säule und anschließend über eine Heparin Säule gereinigt. Heparin fungiert als Kationentauscher und imitiert die polyanionische Struktur der Nukleinsäure, wodurch es ein hervorragendes Material zur Reinigung DNA-bindender Proteine ist.

6 Ergebnisse und Diskussion

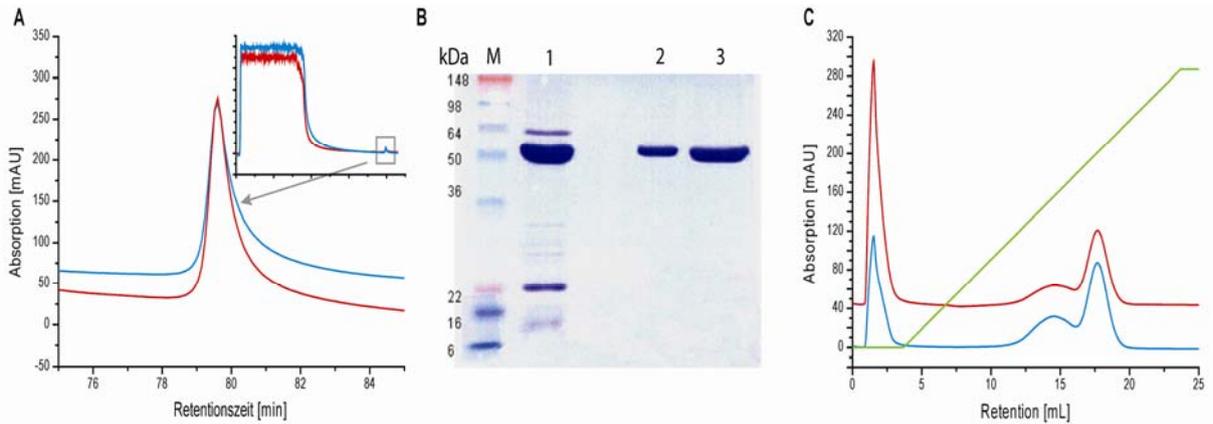


Abbildung 6-7: (A) Chromatogramm der *Strep-TagII* Reinigung; (B) SDS-PAGE: Spur M: Proteinmarker; Spur 1: gereinigte (6-4) Photolyase nach *Strep-TagII* Chromatographie; Spur 2/3: gereinigte Photolyase nach Heparin-Affinitätschromatographie. (C) Chromatogramm der Heparin-Affinitätsreinigung. DNA und Verunreinigungen befinden sich im Durchlauf. (blaue Linie: Absorption bei 280 nm; rote Linie: Absorption bei 260 nm; grüne Linie: NaCl-Gradient).

DNA-Verunreinigungen können unter optimalen pH-Wert Bedingungen im Durchlauf leicht abgetrennt und das Protein an den Ionentauscher gebunden werden. Der theoretische pI von 8.96 (berechnet mit Vektor NTI) erlaubt die Bindung des Proteins unter physiologischen Bedingungen an die Säule. Allerdings zeigte sich in der Praxis, dass das Protein nur bei pH-Werten von 7.5 bzw. 7.6 an die Säule bindet. In Abbildung 6-7 sind das analytische SDS-Gel der Reinigung sowie die dazugehörigen Chromatogramme zu sehen. Die verbliebenen Verunreinigungen der *Strep-Tag* Reinigung konnten problemlos mit der Heparin Säule entfernt werden, wobei die monomere Form der (6-4) Photolyase (~ 60.3 kDa) (Abb. 6-7 C) eine Reinheit von > 95 % aufwies. Der in der Photolyase enthaltene FAD-Cofaktor liegt nach dem Aufschluss und dem ersten Reinigungsschritt in oxidiert Form vor, was sich in einer gelblichen Färbung des Proteins äußert (Abb. 6-8). Diese Beobachtung stimmt auch mit früheren Daten überein bei denen das FAD während, oder nach der Reinigung entweder in seiner oxidierten oder radikalischen Form vorlag.^(71, 122)



Abbildung 6-8: (6-4) Photolyase nach *Strep-TagII* Reinigung.

Für die Heparinsäule wurde das Protein anschließend in HepA umgepuffert, wobei das darin enthaltene Reduktionsmittel DTT den Cofaktor reduziert, der dadurch seine Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften verliert. Im SDS-Gel sind zwei Elutionsfraktionen der Heparin Säule zu sehen (Abb. 6-7 B/C), die sich jedoch nicht in ihrer Reinheit unterscheiden. Analysen ergaben, dass der Gehalt an FAD in der ersten Fraktion deutlich niedriger ist und noch DNA Verunreinigungen vorhanden sind, wodurch offensichtlich die Bindung des Enzyms an die Säule gestört wird. Zur eindeutigen Identifizierung der (6-4) Photolyase wurde ein Aktivitätsassay (Kapitel 6.3.3) unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Ausbeute pro Liter Expression betrug zwischen 0.5 und 1.0 mg. Aufgrund der geringen Stabilität der gereinigten Photolyase bei 4 °C oder auf Eis, wurde das Enzym möglichst am Tag der Reinigung oder am darauf folgenden Tag für anschließende Kristallisationsexperimente und Reparaturstudien verwendet. Restliches Protein wurde ausschließlich bei -20 °C in HepA Puffer mit 50 % Glycerin gelagert.

6.1.3 Analytische Größenausschlusschromatographie

Nach der Reinigung der (6-4) Photolyase wurde ein analytischer Gelfiltrationslauf mit einer S200 10/30 GL Säule (GE) durchgeführt um Reinheit und Bildung möglicher Aggregate zu kontrollieren. Die verkürzte Version des Proteins, welches mittels DNA-Verdau, *Strep-TagII* und Heparin Säule aufgereinigt wurde, zeigte einen einzigen Peak bei 14.54 mL, d.h. das Protein liegt sauber in seiner monomeren Form

vor (Abb. 6-9). Der bei den ersten Reinigungen auftretende Peak im Ausschlussvolumen war nicht mehr vorhanden, d.h. DNA-Verunreinigungen konnten erfolgreich abgetrennt werden.

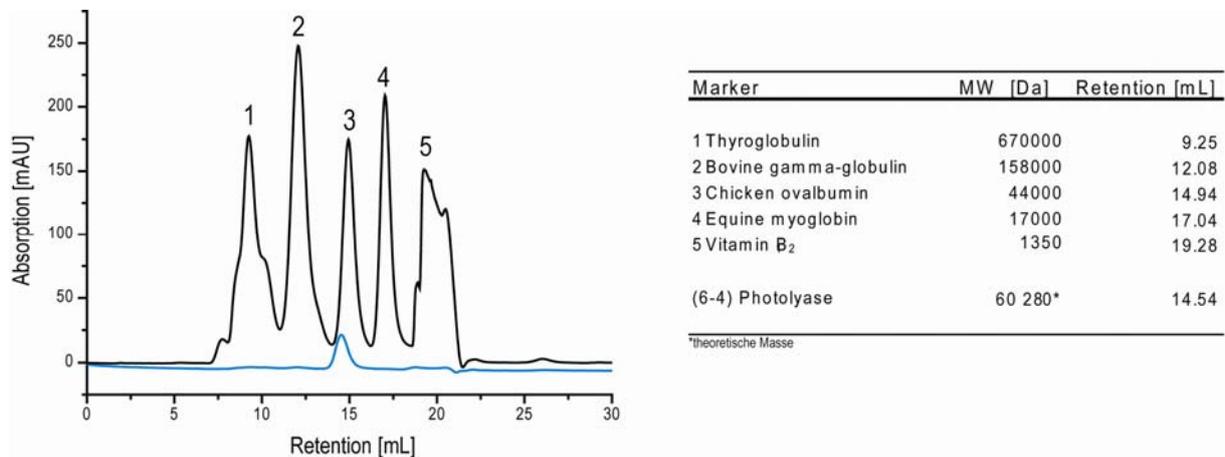


Abbildung 6-9: Analytische Gelfiltrationssäule (S200 10/30 GL) der (6-4) Photolyase nach Reinigung.

6.1.4 Spektroskopische Eigenschaften der gereinigten (6-4) Photolyase

Um mögliche Cofaktoren der (6-4) Photolyase zu identifizieren und deren Redoxstatus zu bestimmen, wurde das Enzym spektroskopisch analysiert. Das UV-Spektrum des gereinigten Enzyms zeigt nach der *Step-TagII* Säule Absorptionsbanden bei 365 nm und 450 nm (Abb. 6-10 A) sowie eine Fluoreszenzemission um 490 nm (Abb. 6-10 B). Diese Ergebnisse sind typisch für die vollständig oxidierte Form des Flavins. Nach Hitzedenaturierung des Enzyms wurden die gleichen, charakteristischen Banden erhalten. Die Zugabe des Reduktionsmittels Natriumdithionit führte aufgrund der vollständigen Reduktion des Enzymgebundenen FADs zu FADH⁻ dagegen zu einem sofortigen Verlust der UV- und Fluoreszenzmaxima. Deutlich ist dafür jedoch die Eigenabsorption des Natriumdithionits unterhalb von 400 nm zu erkennen (Abb. 6-10 A). Die radikalische, semiquinone Form, FADH[•], dessen Absorptionsbereich zwischen 550 nm und 600 nm liegt, konnte nicht detektiert werden.

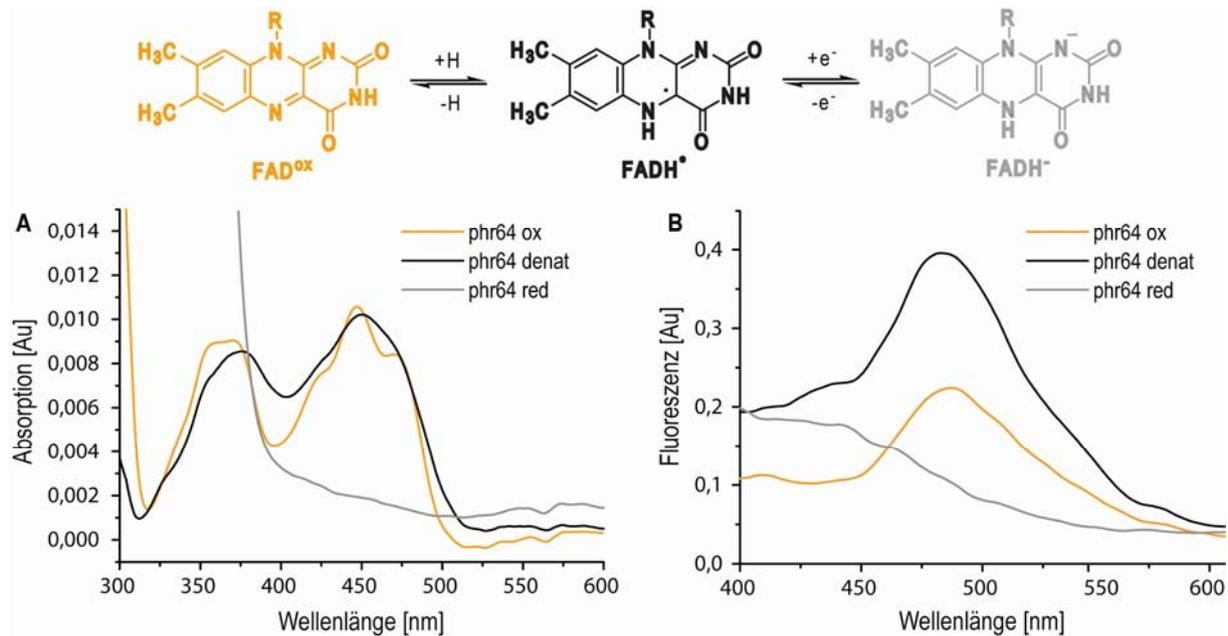


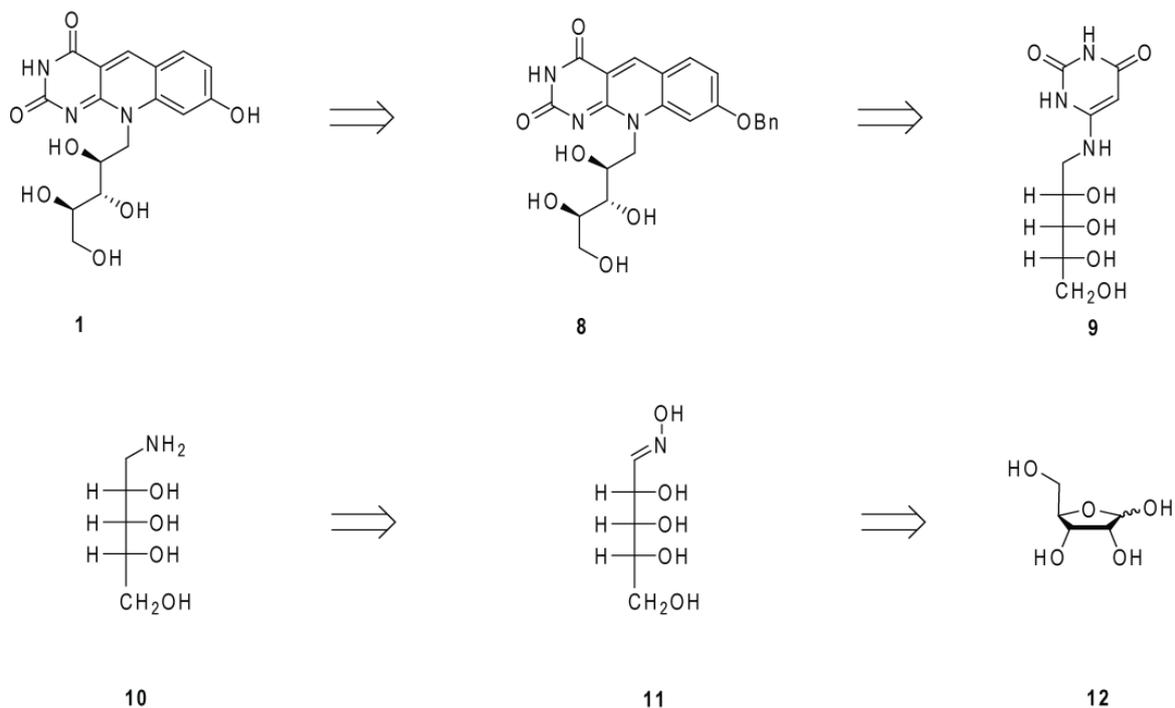
Abbildung 6-10: Spektroskopische Daten der (6-4) Photolyase. (A) UV- und (B) Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{\text{ex}} = 370 \text{ nm}$) der gereinigten und oxidierten (6-4) Photolyase (phr64 ox) vor und nach Hitzedenaturierung (phr64 denat) und Reduktion (phr64 red) des Enzyms.

Zusätzlich zu dem katalytisch wichtigen FAD Chromophor besitzen bakterielle Klasse I CPD Photolyasen einen weiteren Cofaktor. Bei dem als Lichtantenne fungierenden Cofaktor handelt es sich größtenteils entweder um ein Methenyltetrahydrofolat (MTHF)^(77, 149) oder ein 8-Hydroxydeazaflavin (8-HDF, F₀)^(64, 119) welcher die Lichtenergie gebündelt an das FADH⁻ überträgt und letzteres den Reparaturprozess durch Elektronentransfer auf den Schaden initiiert. In wenigen Fällen konnte auch ein weiteres FAD bzw. FMN als zweiter Cofaktor nachgewiesen werden.^(78, 79) Die Frage nach einem weiteren Cofaktor in anderen Photolyasen, speziell die höherer Organismen und (6-4) Photolyasen, war bisher noch nicht geklärt. Die spektroskopischen Daten des Proteins nach der *Strep-TagII* Reinigung gaben allerdings auch keinen weiteren Hinweis auf das Vorhandensein eines zweiten Cofaktors.

6.2 Rekonstitution der (6-4) Photolyase

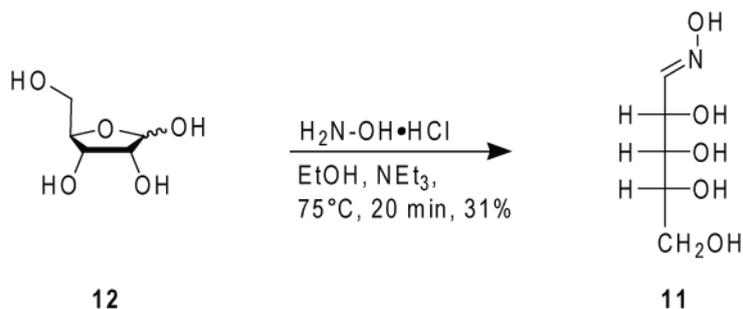
6.2.1 Synthese des F₀-Coenzym

Um weitere Informationen über einen möglichen zweiten, lichtsammelnden Cofaktor in der (6-4) Photolyase aus *Drosophila melanogaster* zu erhalten, muss neben dem Enzym auch der Chromophor in ausreichender Menge bereit gestellt werden. Da kein weiterer Cofaktor als das FAD nach der Reinigung in spektroskopischen Messungen nachgewiesen werden kann (Abb. 6-10 A/B) und das Protein in *E. coli* Zellen überexprimiert wurde, die nicht in Lage sind das F₀ zu synthetisieren, sollten Rekonstituierungsexperimente mit verschiedenen, in Frage kommenden Cofaktoren, durchgeführt werden. Da das für diese Studien benötigte F₀ nicht kommerziell erhältlich ist, war es zunächst notwendig, den Cofaktor auf dem Weg der chemischen Synthese herzustellen. Schema 1 zeigt eine Übersicht der Retrosynthese des F₀ Cofaktors.



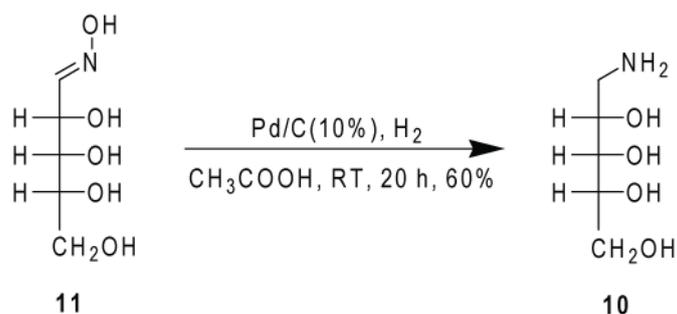
Schema 4: Retrosynthese des 8-Hydroxy-5-deazaflavins.

Als Ausgangspunkt der Synthese des 8-Hydroxy-5-deazaflavins dient D-Ribose. Diese wurde zunächst mit Hydroxylaminhydrochlorid und Triethylamin in Ethanol zu D-Ribose-Oxim umgesetzt.⁽¹⁵⁰⁾ Nach Umkristallisation wurde das Produkt als farbloses, kristallines Pulver in einer Aubeute von 31 % erhalten.



Schema 5: Umsetzung der D-Ribose **12** zum D-Ribose-Oxim **11**.

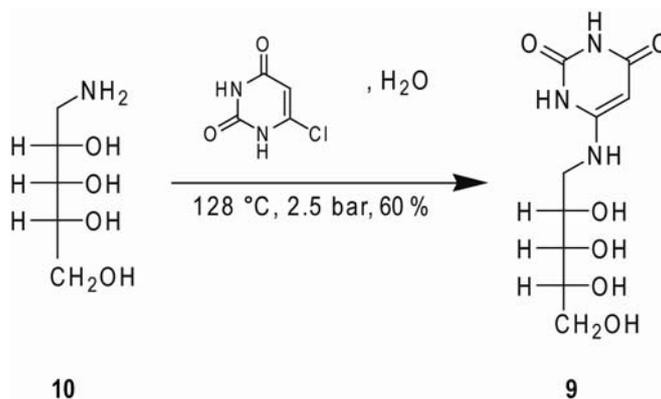
Die katalytische Hydrierung des Oxims in Essigsäure nach *Maley* und *Plaut* ergab das Ribitylamin **10**, welches, zur Abtrennung der Essigsäure, mit Wasser versetzt und die Flüssigkeit anschließend *in vacuo* entfernt wurde.⁽¹⁵¹⁾



Schema 6: Katalytische Hydrierung des Oxims **11** zu Ribitylamin **10**.

Verbindung **10** wurde mittels Ionenausterschromatographie (Dowex 1-X8, Hydroxidform) als gelbes Öl erhalten. Es zeigte sich, dass das so erhaltene Produkt nicht völlig rein vorlag. Diese Beobachtung ist auch literaturbekannt.⁽¹⁵¹⁾ Deshalb

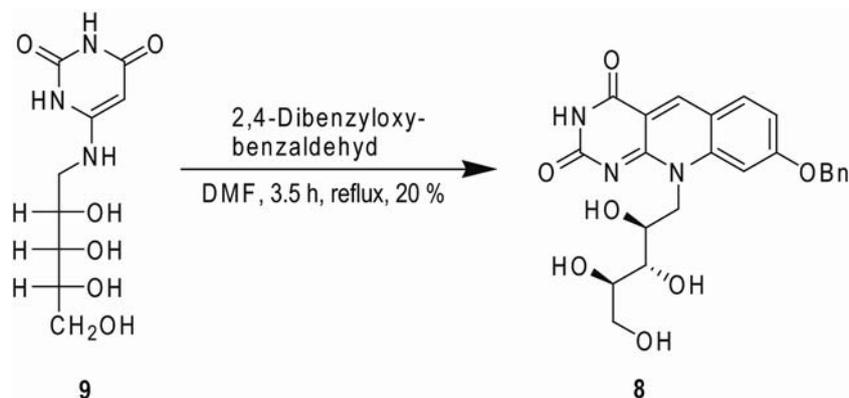
wurde zur genauen Bestimmung des Gehalts an Ribitylamin eine Titration mit 0.1 M HCl-Lösung durchgeführt, die eine Ausbeute von 60 % ergab.



Schema 7: Umsetzung des Amins **10** mit 6-Chloruracil zu Ribitylaminouracilderivat **9**.

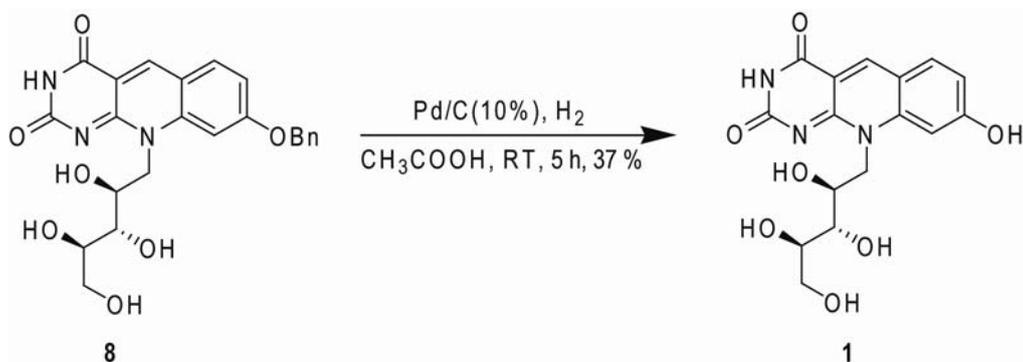
In einem Druckrohr wurde Verbindung **10** und 6-Chloruracil in Wasser gelöst und erhitzt. Nach Abkühlen wurde das Wasser am HV entfernt und das Rohprodukt ohne weiteren Reinigungsschritt in der nächsten Reaktion eingesetzt.

Das Ribitylaminouracilderivat/Amin-Gemisch wurde unter Zugabe eines geringen Überschusses an 2,4-Dibenzoyloxybenzaldehyd in DMF unter Rückfluss erhitzt.⁽¹⁵²⁾ Es konnte eine starke Fluoreszenz der braunen Reaktionslösung beobachtet werden. Das schwerlösliche Deazariboflavin wurde durch Eingießen der Reaktionslösung in Eiswasser und anschließendes Abzentrifugieren als gelber Niederschlag erhalten.



Schema 8: Umsetzung des Ribitylamino uracilderivat **9** zum geschützten Deazariboflavin **8**.

Das Deazariboflavin **8** wurde mit Pd/C(10%) in Eisessig entschützt. Um das überschüssige, schwerlösliche benzylgeschützte Edukt **8** nach der Abtrennung des Katalysators besser zu entfernen, wurde der Rückstand mit Trifluoressigsäure versetzt. Nach Zugabe von eisgekühltem Diethylether fiel ein hellgelber Niederschlag aus, der durch Zentrifugation abgetrennt wurde. Der Rückstand wurde dreimal mit Diethylether gewaschen und mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt.



Schema 9: Entschützung des Deazaflavins **8** unter Bildung von **1**.

Das synthetisch erhaltene F₀ wurde im Anschluss auf seine Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften hin untersucht und als 1 mM Stocklösung in den entsprechenden Puffern gelöst.

6.2.2 Rekonstituierung des zweiten Cofaktors der (6-4) Photolyase

Die Rekonstitution wurde ähnlich wie bereits von *Jorns et al.* durchgeführt.⁽¹⁴⁹⁾ Zu dem gereinigtem Enzym wurde ein 10-facher Überschuss an den Cofaktoren F₀, MTHF, FMN sowie FAD gegeben. Im Fall von MTHF, welches bei neutralen pH-Werten instabil ist, wurden neben dem HepA Puffer pH 7.6, ebenfalls Rekonstituierungsversuche in Citratbuffer pH 6.0 durchgeführt.⁽¹⁵³⁾ Die Inkubation erfolgte ü.N. in der *Glovebox* bei 4 °C, überschüssiger Cofaktor wurde durch eine PD10-Säule (GE) vor der Messung entfernt. Die Rekonstitution der (6-4) Photolyase aus *D. melanogaster* mit FMN, FAD und MTHF zeigten keine Veränderung der Spektren. Auch ergaben sich Stabilitätsprobleme bei Pufferbedingungen von pH-Werten kleiner 6.5, bei denen das Protein leicht zur Aggregation neigt, insbesondere während der Abtrennung des Chromophors auf der Säule. Nach Zugabe von F₀ konnte jedoch die Bindung des Cofaktors an das Protein durch eine starke Rotverschiebung des Absorptionsspektrums des Chromophors von 420 nm zu 440 nm beobachtet werden (Abb. 6-11 A). Bestätigt wurden dieses Ergebnis zusätzlich durch Fluoreszenzmessungen bei $\lambda_{\text{Ex}}=400$ nm (Abb. 6-11 B). Auch hier tritt, wie bei bakteriellen CPD Photolyasen, eine Emission bei 475 nm auf, die charakteristisch für die deprotonierte, „chinoide“ Form des Chromophors ist. Die Deprotonierung ist essentiell für die Unterdrückung der Redoxeigenschaften des Cofaktors, so dass dieser seiner Rolle als Lichtantenne einnehmen kann. Des Weiteren führte die Zugabe von AcOH zum Überstand des hitzedenaturierten Proteins zu einer Verschiebung des Fluoreszenzmaximums hin zu 420 nm, was charakteristisch für die „hydroxy“ Form des Deazaflavins ist (Abb. 6-11B, blau). Die Zugabe von NEt₃ hingegen verursachte, wie zu erwarten, keine Veränderung des Spektrums (Abb. 6-11 B, grau).

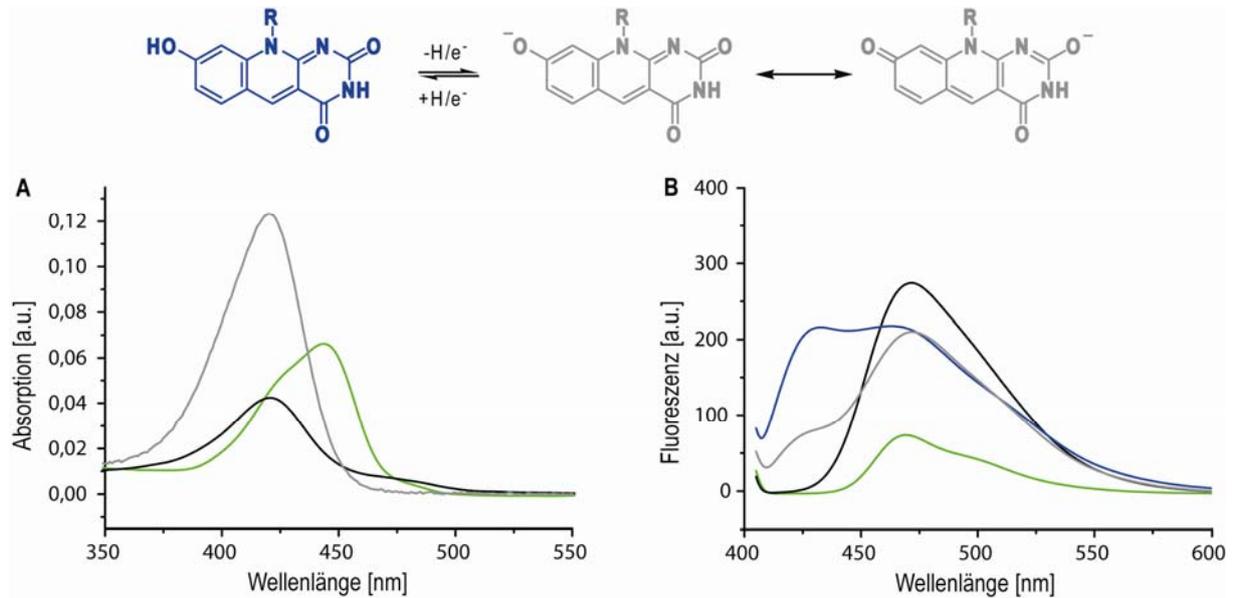


Abbildung 6-11: Spektroskopische Daten der (6-4) Photolyase. (A) UV-Spektrum der gereinigten, reduzierten und mit F_0 rekonstituierten (6-4) Photolyase (grün) vor und nach Hitzedenaturierung (schwarz) des Enzyms. Zum Vergleich F_0 pH 7.6 (grau). (B) Fluoreszenzspektrum ($\lambda_{\text{ex}}=400$ nm) des reduzierten und mit F_0 rekonstituierten Enzyms (grün); das denaturierte Enzym (schwarz) und nach Behandlung mit Essigsäure (blau) oder Triethylamin (grau).

6.2.3 Bestimmung der Bindungskonstanten von F_0

Um die Bindungskonstante des zweiten Chromophors zu bestimmen, wurden zu einer definierten F_0 -Lösung steigende Mengen an (6-4) Photolyase titriert und dabei die Änderung der UV-Absorption bei 420 nm gemessen (Abb. 6-12 A/B). Die Bindungskonstante für F_0 der *D. melanogaster* (6-4) Photolyase wurde mit $K_s = 8.6 \mu\text{M}$ ermittelt und ist damit vergleichbar mit der Bindungskonstanten des FADs in der *E. coli* apo-CPD Photolyase ($K_s = 1.5 \mu\text{M}$).⁽¹⁴⁹⁾

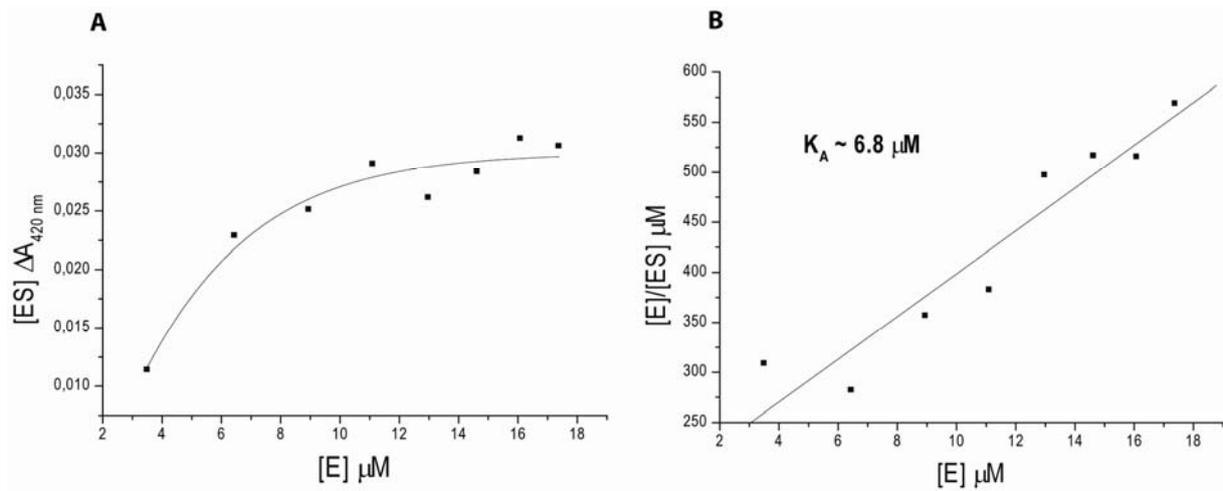


Abbildung 6-12: (A) Graphische Darstellung der Bindungsdaten. (B) Hanes-Plot der Daten aus (A).

6.3 Reparatur des (6-4) Photoprodukts

Die direkte Belichtung kurzer Oligonukleotide (maximal 11mer für T(6-4)T und 12mer für T(6-4)C) war lange Zeit die Standardmethode zur Erzeugung des (6-4) Photoprodukts.^(30, 154) Allerdings entstehen dabei eine Reihe von Neben- und Abbauprodukten, die die Reinigung erschweren und zu einer sehr geringen Ausbeute führen. Vorarbeiten von *Todo* sowie *Sancar* und Mitarbeiter zeigten, dass auch sehr kurze (6mer), (6-4) bzw. CPD Schaden enthaltende Einzelstrang-DNA problemlos repariert wird.^(91, 135) Durch Verbesserung der Belichtungsbedingungen und der Sequenzauswahl konnten *Dr. Ulrich Hennecke* und *Andreas Glas* die Herstellung des (6-4) Schadens in kurzen Einzelstrang-Oligonukleotiden enorm verbessern. Das Ergebnis ist eine selektive Erzeugung des Schadens mit vergleichsweise guter Ausbeute und wenigen Nebenprodukten. *Iwai et al.* stellte die Oligonukleotide hingegen durch Festphasensynthese dar.^(93, 155, 156)

Zur Optimierung der Assaybedingungen und Etablierung eines einfachen, standardisierten Reparaturassays wurde der Substratumsatz in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration und der Belichtungszeit, sowie das pH-Optimum der Reaktion bestimmt.

6.3.1 Bestimmung des pH-Optimums

Wie die CPD Photolyasen weisen auch die (6-4) Photolyasen eine ausgeprägte pH-Abhängigkeit auf. *Todo* und Mitarbeiter zeigten beispielsweise, dass die (6-4) Photolyase aus *X. laevis* ihre höchste Effizienz bei einem pH-Wert von 8.5 besitzt; bei einem Wert von 6.5 sank die Aktivität um das 2.4-fache ab.⁽⁹⁴⁾ Dabei vermutete *Todo*, dass zwei hoch-konservierte Histidinreste als Säure bzw. Base für die katalytische Aktivität verantwortlich sind und diese insbesondere durch pH-Wert Änderungen beeinflusst werden.

Experimente zur Bestimmung des pH-Optimums der (6-4) Photolyase aus *D. melanogaster* wurden mit 100 pmol des **ODN3** DNA-Einzelstranges (Tabelle 9-2, Anhang) und 30 pmol Enzym durchgeführt. Der gemessene pH-Bereich umfasste Werte von 6.0 bis 8.6. Wie im Balkendiagramm (Abb. 6-13) ersichtlich ist, ist auch bei der (6-4) Photolyase aus *D. melanogaster* eine starke pH-Abhängigkeit zu verzeichnen, allerdings liegt hier, im Gegensatz zur (6-4) Photolyase aus *X. laevis*, das pH-Optimum bei 7.6. Die Aktivität steigt um das 1.5-fache von pH 6.0 bis pH 7.6 an und sinkt bei pH 8.6 wieder deutlich ab. Alle weiteren Aktivitätsassays wurden deshalb bei pH 7.6 durchgeführt.

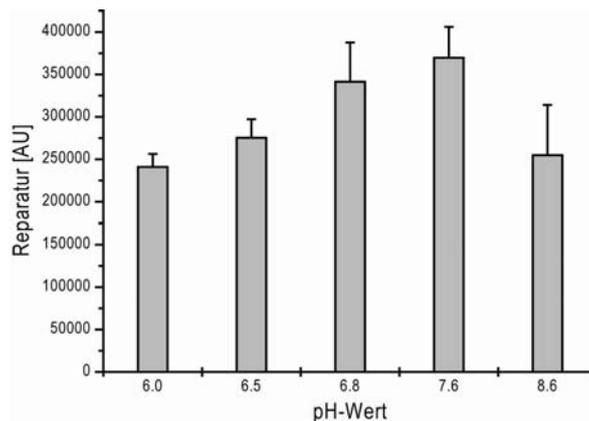


Abbildung 6-13: Vergleich der Reparatur der (6-4) Photolyase bei verschiedenen pH-Werten.

6.3.2 Bestimmung der optimalen Enzymmenge und der Belichtungszeit

Die Messungen wurden mit gereinigtem Enzym und einem (6-4)-Schaden enthaltenden DNA-Einzelstrang (**ODN3**) durchgeführt. Für die Messungen wurden zunächst je 100 pmol der DNA mit unterschiedlichen Enzymmengen von 12 bis 100 pmol in HepA Puffer pH 7.6 unter Weißlicht für 1 h bei RT inkubiert. Die Proben wurden anschließend hitzedenaturiert, abzentrifugiert und auf der HPLC analysiert. Die erhaltenen Chromatogramme sind in Abbildung 6-14 A und B dargestellt. Deutlich ist der Umsatz des Substrates (dunkelblau) zum ungeschädigten Strang (hellblau) mit ansteigender Enzymmenge zu erkennen. Die vollständige Reparatur tritt erst bei 100 pmol (6-4) Photolyase und einer Belichtungsdauer von 60 min ein.

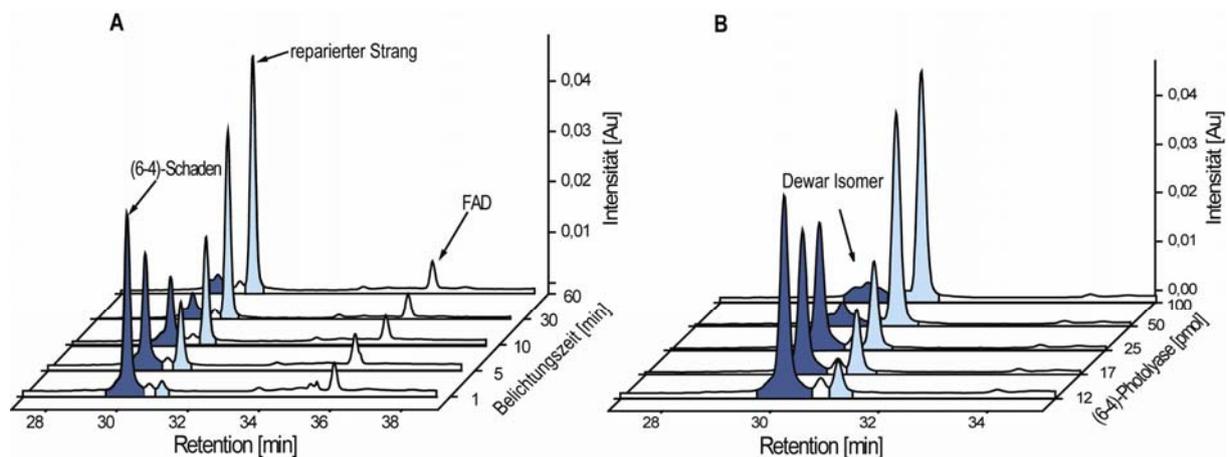


Abbildung 6-14: (A) Zeit- und (B) konzentrationsabhängige Reparatur des (6-4) Photoprodukts.

Für das folgende Experiment, der Bestimmung der Belichtungszeit, wurde nun die aus dem vorangegangenen Experiment bestimmte Menge an Enzym (100 pmol) bei dem ein vollständiger Umsatz zu verzeichnen war, mit 100 pmol DNA über einen Zeitraum von 1 bis 60 min belichtet. Auch hier ist deutlich die Abnahme des Schadens (dunkelblau) und die gleichzeitige Zunahme des intakten Stranges (hellblau) mit steigender Belichtungszeit zu sehen. Der vollständige Umsatz ist erst nach einer Belichtungszeit von 60 min erreicht.

6.3.3 Standard-Aktivitätsassay für die (6-4) Photolyase

Zur Kontrolle der Identität und Aktivität wurden mit dem gereinigten Enzym Photoreaktivierungsassays unter den zuvor bestimmten optimalen Bedingungen durchgeführt.

Für die Standard-Aktivitätsassays wurden äquimolaren Mengen an Oligonukleotiden **ODN 3** und **ODN 9** sowie der (6-4) Photolyase in einem Endvolumen von 100 µL HepA Puffer pH 7.6 für 1 h bei Raumtemperatur mit einer Weißlichtlampe belichtet, im Anschluss das Protein hitzedenaturiert, abzentrifugiert und der Überstand mittels HPLC analysiert. Deutlich ist in Abbildung 6-15 die Reparatur des T(6-4)T Schadens (6-15 A) und des T(6-4)C Schadens (6-15 B) ersichtlich. Die untere Linie bei 325 nm zeigt jeweils die charakteristische Absorption des T(6-4)T Schadens, die obere Linie dagegen die für DNA typische Absorption bei 260 nm. In beiden Chromatogrammen ist nach der Belichtung der DNA-Stränge mit Photolyase der Schaden vollständig verschwunden und anstelle dessen tritt eine Absorption an der Stelle des ungeschädigten Oligonukleotids auf. Zum Vergleich wurden das Chromatogramm des Schadens (orange) und des intakten Stranges (schwarz) ebenfalls dargestellt.

Neben dem geschädigten und reparierten Strang ist auch das Dewar-Valenz Isomer bei einer Retentionszeit von 30 min in Abb. 6-15 A zu erkennen. Das Dewar-Valenz Isomer entsteht durch die anhaltende Belichtung des entsprechenden (6-4) Photoprodukts im UV-A/B Bereich, wodurch es zur photochemischen Isomerisierung kommt. Bei dem Reparaturassay in dem T(6-4)C als Substrat eingesetzt wird, ist kein Dewar-Isomer ersichtlich (Abb. 6-15 B). Experimente von Andreas Glas stützen die Beobachtung von Sage,⁽¹⁵⁷⁾ dass der Umsatz des T(6-4)C Photoprodukts in das T(Dewar)C etwa 3-mal langsamer ist als bei T(6-4)T. Somit reicht die Belichtungszeit des Reparaturassays offensichtlich nicht aus, um den T(6-4)C Schaden zu isomerisieren.

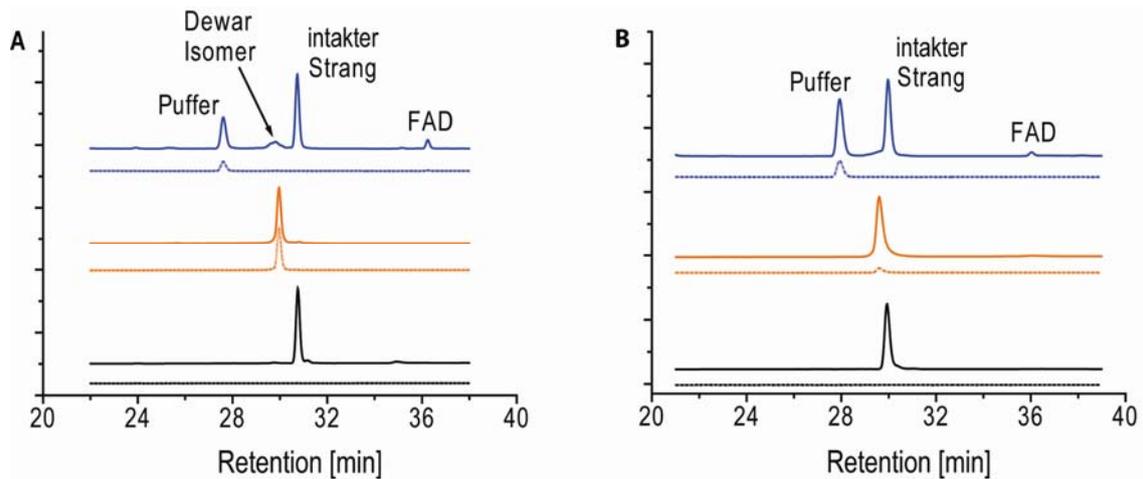


Abbildung 6-15: (A) Reparatur der T(6-4)T (**ODN 3**) und (B) der T(6-4)C (**ODN 9**) Schäden durch die (6-4) Photolyase. (blau) Reversed phase HPLC Chromatogramm der (6-4) Photolyase Reparatur. (orange) Chromatogramm von **ODN 3** und **ODN 9**, die zentral das (6-4) Photoprodukt aufweisen. (schwarz) Chromatogramm von **ODN 3** und **ODN 9** ohne (6-4) Photoprodukt. Die Elution wurde bei 260 nm (durchgezogene Linie) und 325 nm (gestrichelte Linie) beobachtet.

Durch diesen einfachen HPLC-Assay ist es möglich, die (6-4) Photolyase schnell und zuverlässig auf ihre Aktivität hin zu untersuchen, bevor sie für weitere Studien oder für Kristallisationsexperimente eingesetzt wird. Zusätzlich zur Kontrolle des frisch gereinigten Enzyms, wurde die Photolyase nach Lagerung bei -20 °C mit dem Assay überprüft.

6.3.4 Vergleich der Aktivität vor und nach Rekonstitution mit F_0

Die Hinweise auf das F_0 als möglichen zweiten Cofaktor, basierend auf den Ergebnissen der UV- und Fluoreszenzmessungen, sollten sich ebenfalls in der Änderung der katalytischen Effizienz der Reparatur bemerkbar machen. Durch Erweiterung des Absorptionsspektrums der Photolyasen hin zu längeren Wellenlänge (> 400 nm) sollte folglich auch die Quantenausbeute gesteigert werden.^(64, 149)

Reparaturstudien unter den Standardbedingungen (100 pmol DNA, Belichtung: 1 h, RT) in Abhängigkeit von der Enzymmenge ergaben eine deutliche Steigerung

6 Ergebnisse und Diskussion

der Aktivität der rekonstituierten Form der (6-4) Photolyase. Die schnelle und kontinuierliche Abnahme der Aktivität mit sinkender Proteinmenge ist bei dem nicht rekonstituierten Enzym deutlich ersichtlich (Abb. 6-16 A/B/C). Der komplette Umsatz des T(6-4)C Substrates ist nur bei 100 pmol Enzym gewährleistet, unterhalb von 10 pmol Enzym ist kein Substratumsatz mehr erkennbar. Das rekonstituierte Protein dagegen zeigt volle Aktivität bis zu einem Wert von 20 pmol, erst dann fallen auch hier die Werte kontinuierlich ab, wobei selbst bei 1 pmol Enzym noch Substratumsatz zu verzeichnen ist.

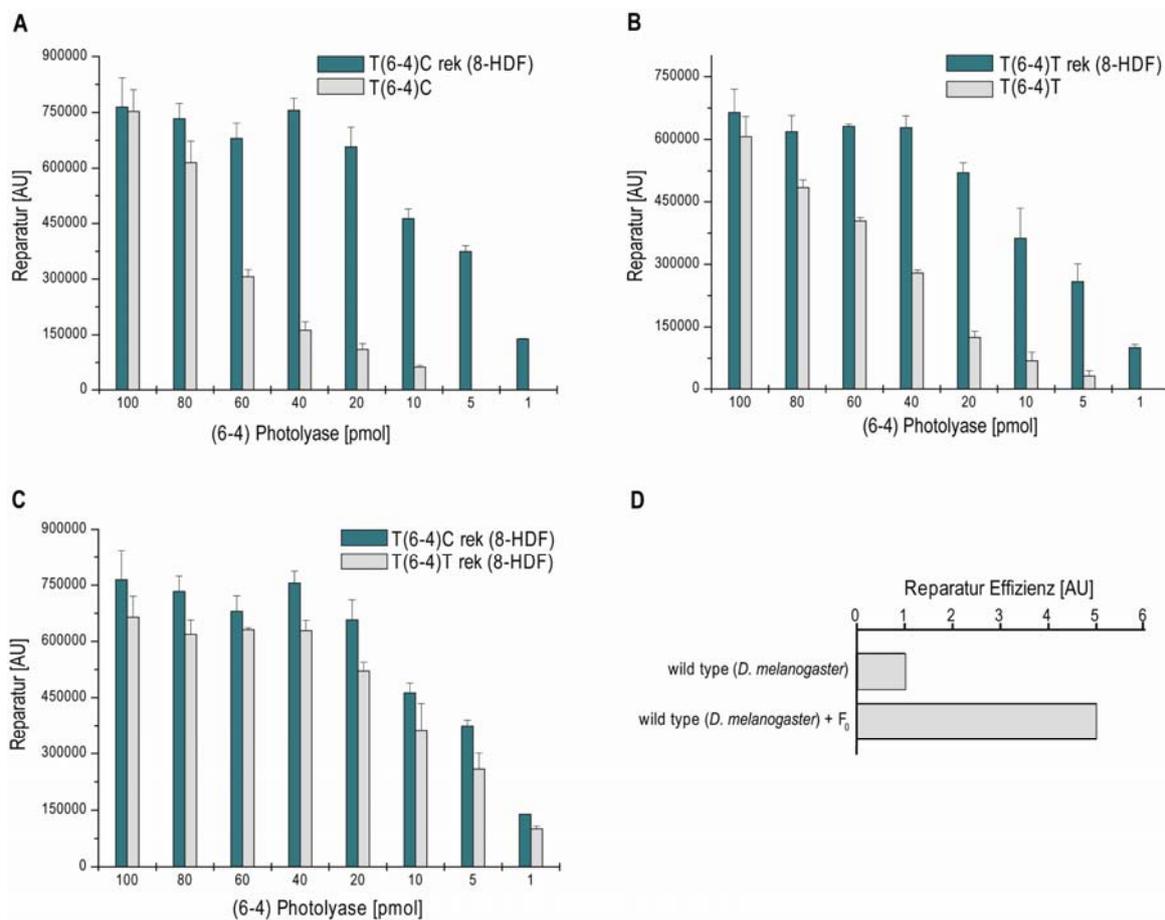


Abbildung 6-16: (A) Vergleich der Reparatur des T(6-4)C Schadens und (B) des T(6-4)T Schadens mit rekonstituierter (dunkelgrün) und nicht-rekonstituierter (grau) (6-4) Photolyase in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration. (C) Vergleich der Reparaturaktivität zwischen T(6-4)T und T(6-4)C Schaden mit rekonstituierter Photolyase. (D) Darstellung der relativen Reparatur zwischen wildtyp und rekonstituierter Photolyase.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei dem T(6-4)T Substrat erhalten. Im Vergleich der Reparatur der beiden Substrate mit dem rekonstituierten Enzym fällt auf, dass die Aktivität im Fall des T(6-4)C Schadens leicht erhöht ist, was auf die schnellere Bildung des Dewar Isomers bei T(6-4)T während des Assays zurück zu führen ist (Abb. 6-16 C). Insgesamt ist ein Aktivitätsanstieg um das 5-fache zu verzeichnen (Abb. 6-16 D). Dieses Ergebnis beweist, dass F_0 die absorbierte Lichtenergie gebündelt auf das $FADH^+$ weitergibt.

6.4 Nachweis des F_0 Cofaktors *in vivo*

Um sicher zu gehen, dass es sich bei den Ergebnissen der Rekonstituierungsversuche nicht um Artefakte handelt bzw. die F_0 Bindetasche ein evolutionäres Relikt darstellt, sollte das Chromophor direkt aus *Drosophila melanogaster* extrahiert werden.

Dazu wurde zunächst versucht, die (6-4) Photolyase nativ aus *D. melanogaster* Zellextrakt durch Immunpräzipitation zu reinigen und im Anschluss das gereinigte Enzym zu charakterisieren. Da noch keine mono- bzw. polyklonalen Antikörper gegen die (6-4) Photolyase kommerziell erhältlich sind, wurden im ersten Schritt polyklonale Antikörper gegen das Enzym hergestellt. Für die Immunisierung wurden 800 μ g Protein benötigt, welches analog dem üblichen Reinigungsverfahren hergestellt wurde. Allerdings erfolgte ein weiterer Reinigungsschritt über einen Anionentauscher bei pH 8.0, der die Proteinlösung möglichst vollständig von Endotoxinen befreit. Die Photolyase bindet, im Unterschied zu den Endotoxinen, unter diesen Bedingungen nicht an das Säulenmaterial und kann somit leicht abgetrennt werden. Die Herstellung der polyklonalen Antikörper wurde von der Firma *Eurogentec* übernommen. Das schließlich erhaltene Kaninchen-Serum wurde mittels Protein G und immunspezifischer Affinitätschromatographie gereinigt. Da bei der immunspezifischen Affinitätsreinigung die spezifische Bindung der Antikörper gegen das Antigen genutzt wird und diese Bindung unter Umständen nur unter sehr harschen Bedingungen wieder zu trennen ist, musste bei der Verwendung der

Strep-Magnetic-Beads darauf geachtet werden, dass das Antigen während der Elution nicht mit dem Antikörper zusammen eluiert und es damit zu einer Verunreinigung der Antikörperlösung kommt. Es zeigte sich, dass die spezifische Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper erst bei pH-Werten < 3.0 gestört werden kann. Die Elution des Antikörpers erfolgte in mehreren Fraktionen und wurde mit SDS-PAGE kontrolliert. Zur Neutralisation wurde das Eluat in Tris-Puffer pH 9.0 aufgefangen, die Antikörper enthaltenen reinen Fraktionen aufkonzentriert und anschließend für *Western Blot* und Immunpräzipitationsversuche verwendet.

Um die Spezifität des Antikörpers vorab in Zellextrakten zu überprüfen, wurden *Western Blots* mit *E. coli* Zellextrakt der (6-4) Photolyase als auch *E. coli* Zellextrakt der CPD Photolyase (*E. coli*) nach Induktion sowie mit dem gereinigten Protein durchgeführt. Dabei wurden die verwendeten Antikörper lediglich über die Protein G Säule gereinigt und somit nicht nur polyklonale Antikörper gegen die (6-4) Photolyase enthalten, sondern alle im Kaninchen-Serum auftretenden IgGs. Abbildung 6-17 A zeigt das Chromatogramm des Protein G Reinigungsschrittes; Verunreinigungen der IgGs aus dem Serum konnten hervorragend abgetrennt werden. Deutlich ist der monomere Antikörperpeak mit einer ungefähren molekularen Masse von 150 kDa in der anschließenden analytischen Gelfiltration zu erkennen.

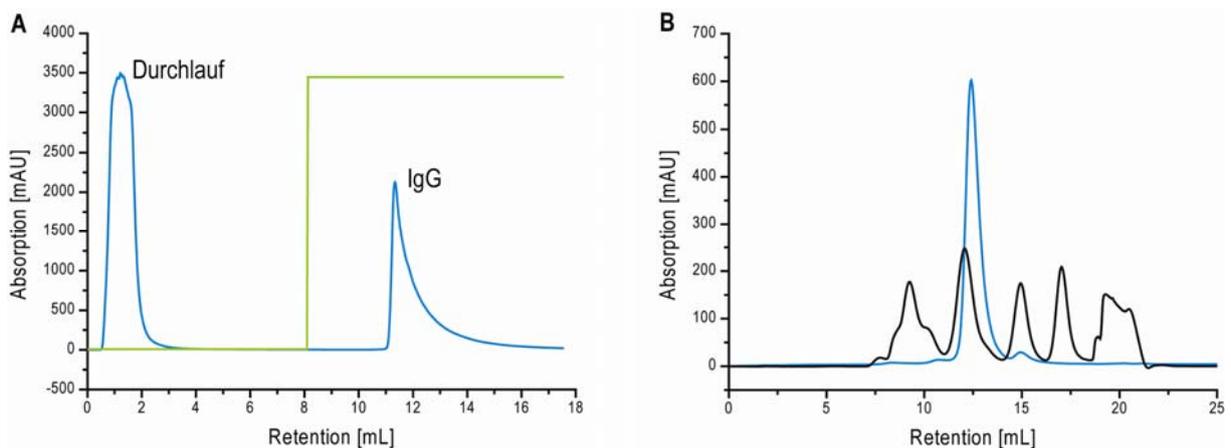


Abbildung 6-17: (A) Reinigung des Kaninchenserums mittels Protein G-Säule. (B) Analytischer Gelfiltrationslauf (S200 10/30 GL) der über Protein-G gereinigten Antikörper.

Erste *Western Blots* mit der erhaltenen Antikörperlösung waren wenig erfolgreich, da die Antikörper nicht in der Lage waren die (6-4) Photolyase zu detektieren. Stattdessen zeigte sich eine hohe Unspezifität in den erhaltenen *Western Blots* (Abb. 6-18).

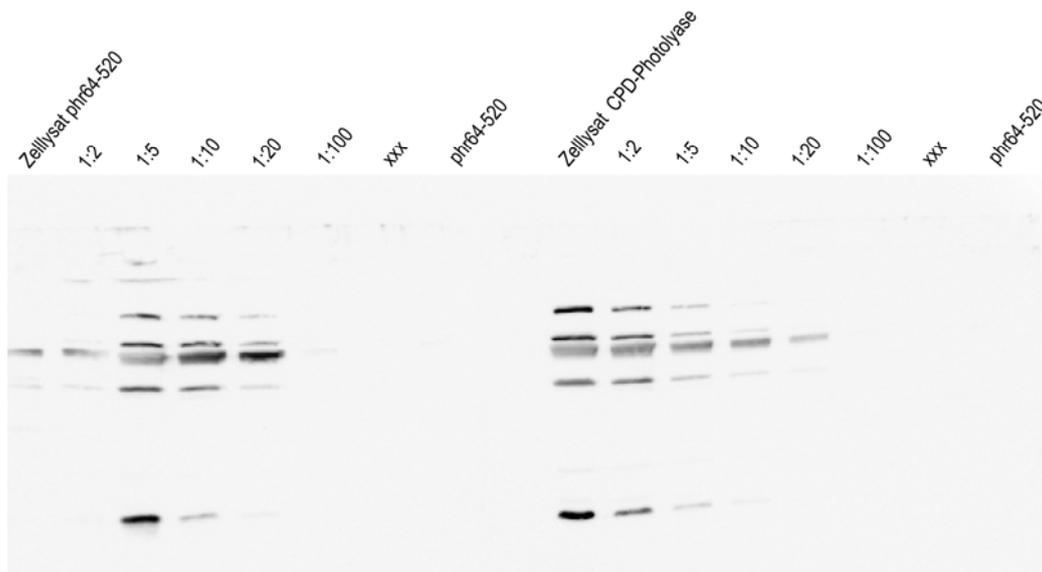


Abbildung 6-18: *Western Blot* von (6-4) Photolyase und CPD Photolyase Zellextrakten sowie der gereinigten Photolyase. Detektion mit Protein G gereinigtem Antikörper aus Kaninchen-Serum und Anti-Rabbit-HRP Antikörper.

Die Einführung eines zweiten, immunspezifischen Reinigungsschrittes, unter Verwendung der (6-4) Photolyase, führte zu einer deutlichen Reduktion der unspezifischen IgG Verunreinigung. Jedoch war auch hier im *Western Blot* keine spezifische Erkennung des Antigens durch den gereinigten Antikörper nachzuweisen (Abb. 6-19).

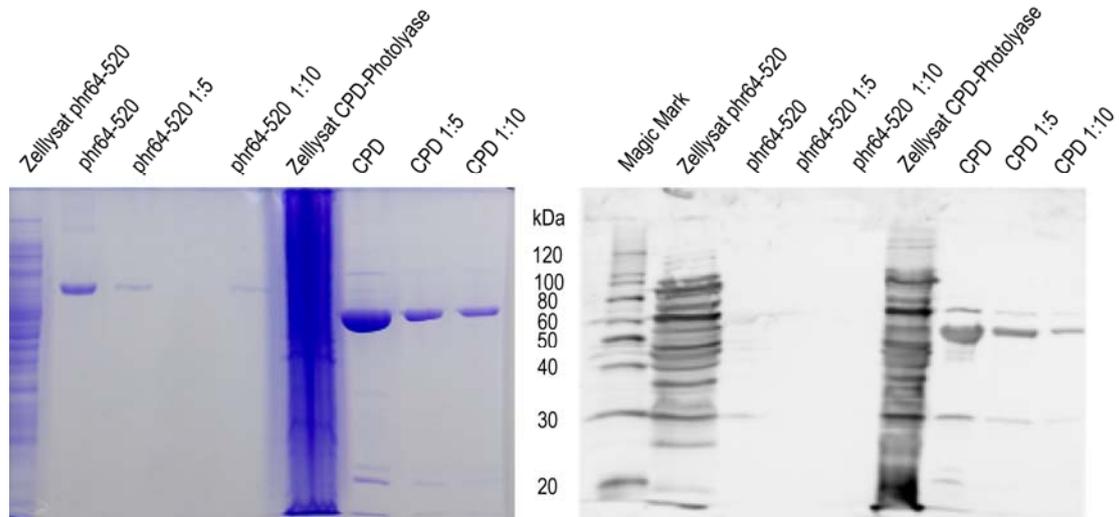


Abbildung 6-19: SDS-PAGE (links) und dazugehöriger *Western Blot* (rechts) mit Zellextrakt sowie gereinigter (6-4) und CPD Photolyase. Detektion mit affinitätsgereinigtem primärem Antikörper und Anti-Rabbit-HRP Antikörper.

Da während der immunspezifischen Reinigung der Antikörper offensichtlich an die Photolyase bindet, die in diesem Fall in nativer Form vorliegt, wurde vermutet, dass der spezifische Antikörper das Antigen nur im aktiven Zustand erkennt und die Epitopbindestellen an der Oberfläche des nativen Proteins liegen. Denaturiertes Protein, das für die SDS-PAGE verwendet wird, schien nicht erkannt zu werden. Tatsächlich konnte in Immunpräzipitationsexperimenten mit der gereinigten (6-4) Photolyase, die Bindung des Antikörpers an das Enzym über SDS-PAGE nachgewiesen werden. Das Protein wurde nach Inkubation mit dem Antikörper mittels der *Magnetic-Beads* vom restlichen Überstand gereinigt, gründlich gewaschen und die *Beads* anschließend in SDS-Auftragspuffer aufgekocht, um die Bindung zwischen *Strep-TagII* und Protein-Antikörperkomplex zu unterbinden. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, wobei nach Coomassie-Färbung die Antikörperfragmente bei 50 kDa und schwach bei 25 kDa sowie die Bande der (6-4) Photolyase zu erkennen ist (Abb. 6-20).

6 Ergebnisse und Diskussion

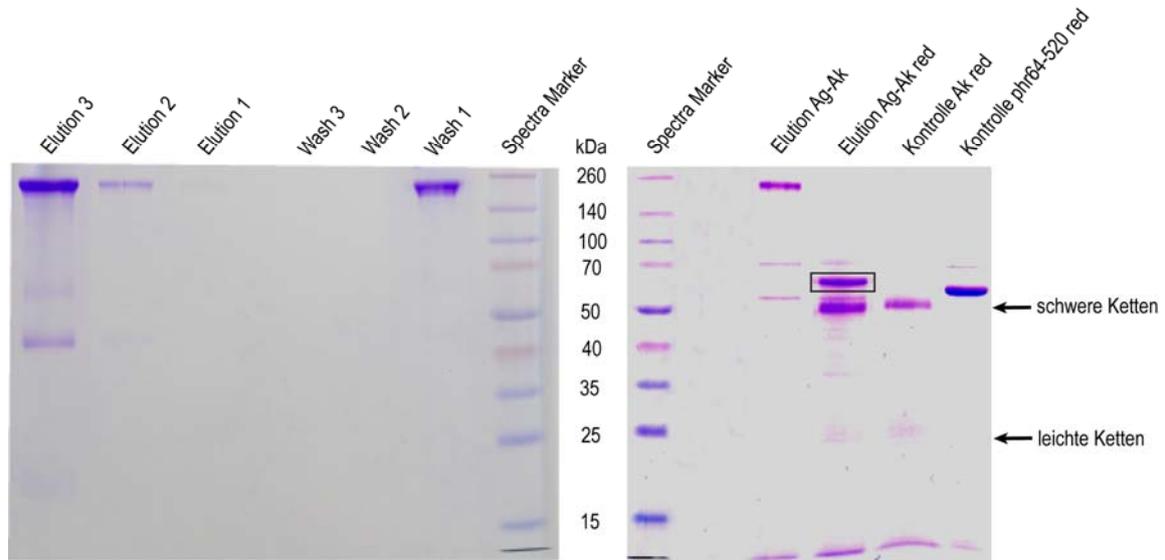


Abbildung 6-20: Darstellung der immunspezifischen Affinitätsreinigung des (6-4) Photolyase Antikörpers (links) und der Immunpräzipitation (rechts) mit gereinigtem Enzym. Die präzipitierte Photolyase ist schwarz umrahmt.

Zur eindeutigen Identifizierung des Proteins wurde die betreffende Gelbande ausgeschnitten, tryptisch verdaut und mittels LC-MS analysiert. Anhand der Peptidfragmente, die eine Sequenzabdeckung von 31 % ergaben, konnte die (6-4) Photolyase identifiziert werden. Die übereinstimmenden Peptide sind rot in der unten dargestellten Sequenz der Photolyase hervorgehoben.

```

1      MDSQRSTLVH WFRKGLRLHD NPALSHIFTA ANAAPGKYFV RPIFILDPGI
51     LDWMQVGANR WRFLQQTLED LDNQLRKLNS RLFVVRGKPA EVFPRIFKSW
101    RVEMLTFETD IEPYSVTRDA AVQKLAKAEG VRVETHCSHT IYNPELVIK
151    NLGKAPITYQ KFLGIVEQLK VPKVLGVPEK LKNMPTPPKD EVEQKDSAAY
201    DCPTMKQLVK RPEELGPNKE PGGETEALRR MEESLKDEIW VARFEKPNTA
251    PNSLEPSTTV LSPYLKFGCL SARLFNQKLK EIIKRQPKHS QPPVSLIGQL
301    MWREFYYTVA AAEPNFDRLM GNVYCMQIPW QEHPDHLEAW THGRTGYPFI
351    DAIMRQLRQE GWIHHLARHA VACFLTRGDL WISWEEGQRV FEQLLLDQDW
401    ALNAGNWMWL SASAFFHQYF RVYSPVAFGK KTDQPQGHYIR KYVPELSKYP
451    AGCIYEPWKA SLVDQRAYGC VLGTDYPHRI VKHEVVHKEN IKRMGAAYKV
501    NREVRTGKEE ESSFEKSET
  
```

Organismus	<i>Drosophila melanogaster</i>
Protein	phr(6-4)
Protein ID	NP_477188
MW	62488.6
max. p Wert	6.7×10^{-15}
max. Xcorr	4.99
Anzahl Peptide	15

Abbildung 6-21: Identifizierung der (6-4) Photolyase durch LC-MS. Die rot dargestellten Peptidfragmente konnten eindeutig den theoretischen Massen eines simulierten Trypsin-Verdaus zugeordnet werden.

Im Anschluss wurden kommerziell erhältliche Fliegen zunächst gründlich in 1 x PBS-Puffer gewaschen, in Flüssigstickstoff weggefroren und mit dem Pistill zermahlen, anschließend mit RIPA-Puffer in der Kugelmühle erneut aufgeschlossen und der Überstand zunächst durch Immunpräzipitation auf das Vorhandensein der (6-4) Photolyase untersucht. Es war jedoch nicht möglich, aus dem komplexen Zellextrakt das Protein über Präzipitation zu isolieren. Dies lag vermutlich an der geringen Menge an (6-4) Photolyase in dem großen Volumen des Proteinextraktes und der möglichen Denaturierung des Enzyms während des Aufschlusses. Deshalb wurde, nach einem Protokoll zur Isolation von Riboflavinderivaten aus Pilzen, in einem weiteren Schritt versucht, den Cofaktor direkt aus den Fliegen zu extrahieren.⁽¹⁵⁸⁾

Überschüssige Proteine wurden zunächst durch Hitzedenaturierung gefällt und abzentrifugiert. Die Grobreinigung des Überstandes erfolgte über eine Sephadex-Säule, wobei hier nur die fluoreszierenden Fraktionen gesammelt, konzentriert und danach mittels präparativer HPLC getrennt wurden. Im Anschluss wurden die einzelnen Fraktionen mit einer analytischen HPLC analysiert (260 nm). Abbildung 6-22 A zeigt das Chromatogramm der analytischen HPLC bei 260 nm. Neben den Verunreinigungen ist ein minimaler Peak bei 32 min erkennbar (grün), welcher eine charakteristische Absorption bei 422 nm aufweist. Retentionszeiten und UV-Absorption stimmen mit denen, des synthetischen dargestellten F_0 (schwarz) überein. Zur Kontrolle wurde erneut der Zellextrakt auf die HPLC aufgetragen und diesmal neben der UV-Absorption (422 nm) auch die Fluoreszenz bei der, für das F_0 charakteristischen Wellenlänge von 475 nm, detektiert (Abb. 6-22 B/C). Auch in diesem Fall waren die Retentionszeiten und Absorptionen des Extrakts identisch zu denen des synthetisch dargestellten F_0 Cofaktors.

6 Ergebnisse und Diskussion

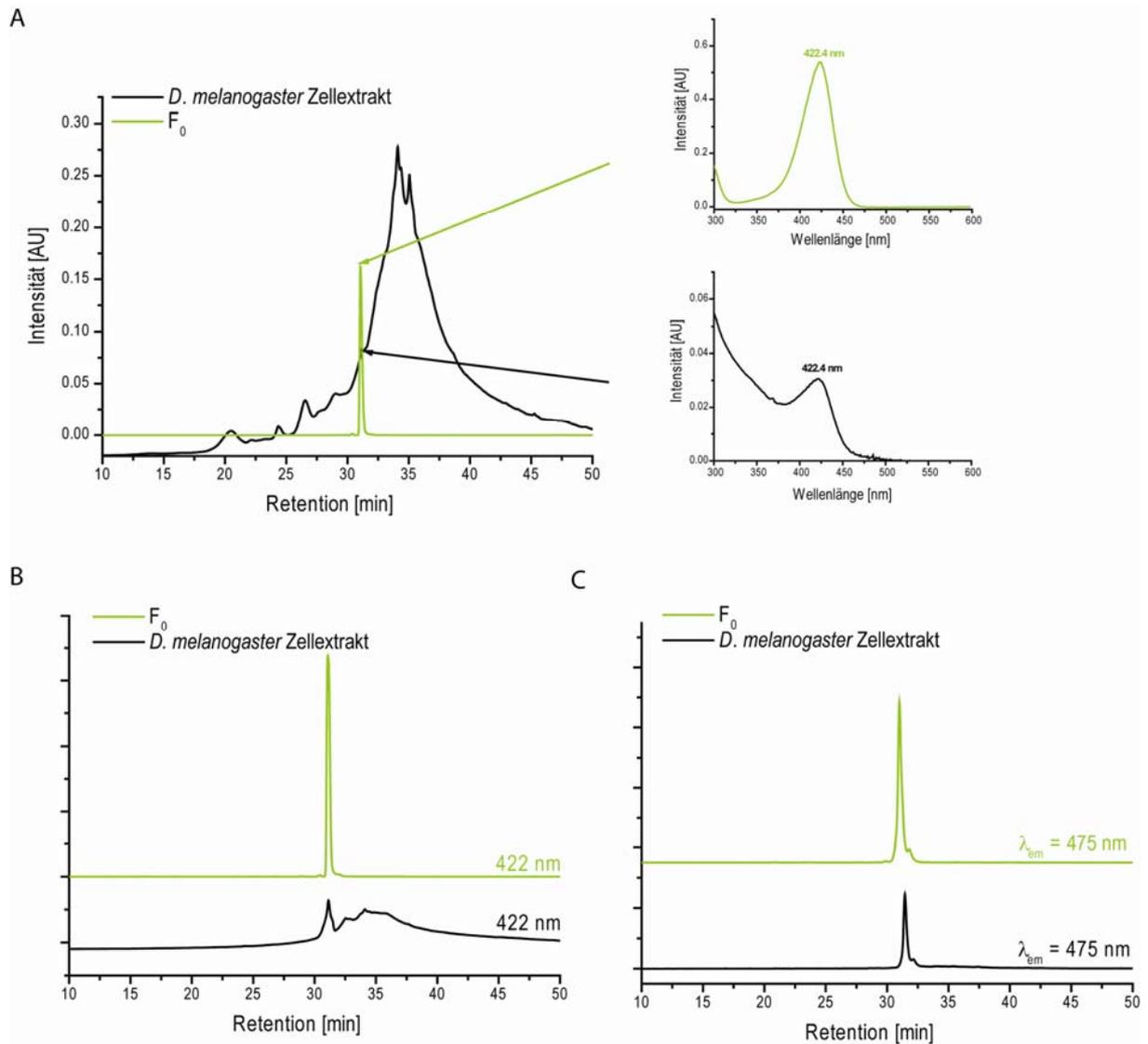


Abbildung 6-22: (A) Analytische HPLC des *Drosophila melanogaster* Zellextraktes bei 260 nm, (B) Detektion der Absorption bei 422 nm und (C) Detektion der Fluoreszenz bei $\lambda_{ex}=420$ nm and $\lambda_{em}=475$ nm.

Co-Kristallisation der (6-4) Photolyase

6.4.1 Kristallisation mit T(6-4)T und T(6-4)C-Schaden enthaltender DNA

Die Grundvoraussetzung um Proteinstrukturen auf atomarer Ebene mittels Röntgenstrahlung zu lösen, ist die Anzucht von Proteinkristallen. Erste Kristallisationsversuche mit der verkürzten Version der (6-4) Photolyase alleine bzw. Co-Kristallisation mit T(6-4)T Schaden enthaltenden 6mer und 8mer DNA-Einzelsträngen (**ODN1**, **ODN2** und **ODN3**) lieferten keine Kristalle. Für weitere Kristallisationsstudien wurde das Protein in HepA Puffer auf 8.5 mg/mL aufkonzentriert und verschiedene, kommerziell erhältliche Screens (Nextal/Qiagen) damit getestet. Dazu wurden mit dem *Hydra II* Kristallisationsroboter zu 0.2 µL Proteinlösung, 0.2 µL Reservoirlösung gemischt und die Platten bei 18 °C gelagert. Im Fall von Co-Kristallisationsversuchen wurde das Protein zuvor mit der entsprechenden DNA im Verhältnis 1:1.1 vorinkubiert, wobei alle Schritte unter Lichtausschluss stattfanden. Die vielversprechendsten Ergebnisse zeigten sich jedoch erst bei der Verwendung doppelsträngiger 15mer DNA mit Überhang (5'-ACAGCGGT(6-4)TGCAGGT-3';5'-TACCTGCAACCGCTG-3') unter den Bedingungen **40** (0.1 M Hepes pH 7.0, 20 % PEG 6000) der *pH-Clear Suite* sowie den Bedingungen **16** (0.1 M MIB pH 9.0, 25 % PEG 1500), **18** (0.1 M MIB pH 9.0, 25 % PEG 1500) und **31** (0.1 M Hepes pH 7.0, 0.2 M NaCl, 20 % PEG 6000) der *PACT Suite* in Form von kleinen, dünnen Nadeln. Diese Treffer wurden weiter mit der *hanging-drop vapour-diffusion* Methode optimiert, um größere Kristalle zu erhalten. Neben der Tropfengröße (1, 2 und 3 µL), der Proteinkonzentration (6.5, 7.0, 8.5, 10.0 und 12.5 mg/mL), verschiedenen Oligonukleotiden bzw. Protein:DNA Verhältnissen (1:1.1, 1:1.3, 1:1.5), der Konzentration an Puffer und PEG und dem pH-Wert wurden auch verschiedene Additive (*Hampton Research, Additive Screen*) getestet. Die Platten wurden bei 4 °C und 18 °C gelagert. Die optimalen Bedingungen wurden mit der Sequenz 5'-ACAGCGGT(6-4)TGCAGGT-3'; 5'-TACCTGCAACCGCTG-3' und der Reservoirlösung 0.1 M Hepes, pH 7.0, 15–20 % PEG 4000 oder 0.1 M MIB Puffer, pH 8.6, 20–25 % PEG 1500 mit 1 µL Protein:DNA (Verhältnis 1:1.1;

Proteinkonzentration 8.5 mg/mL) und 1 μ L Reservoirlösung bei 4 °C nach 2–48 h, erhalten. Um die vorzeitige Reparatur der DNA zu vermeiden, wurde die Kristallisation unter Rotlicht durchgeführt. Außerdem wurde das Licht des Mikroskops mit einem 2 mm dicken RG630 Filter abgeschirmt (ITOS, Mainz, Germany) oder einer roten Glassichthülle abgedeckt. Unter den optimierten Bedingungen wurde Analog dazu das T(6-4)C Dimer kristallisiert. Erste Kristalle zeigten sich nach 5-10 Tagen bei 0.1 M Hepes pH 7.0 und 19 % PEG4000 sowie bei 0.15 M Hepes pH 7.0 und 17 % PEG 3350.

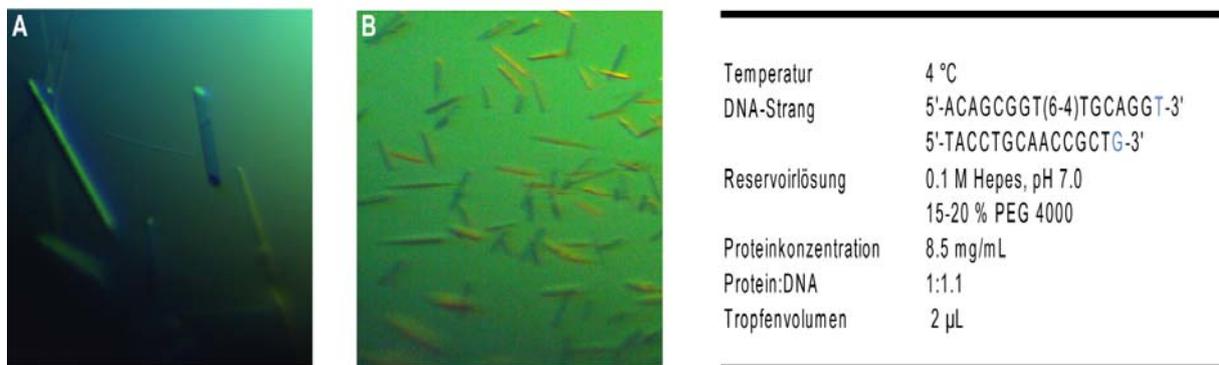


Abbildung 6-23: Co-Kristallisation der (6-4) Photolyase in der *hanging-drop vapour-diffusion* Methode. (A) Kristalle unter den, in der Tabelle angegebenen, Standardbedingungen. (B) Kristalle unter den Standardbedingungen mit 22 % PEG 4000.

6.4.2 Diffraktionsanalyse der (6-4) Photolyase

Die anschließenden Messungen wurden von der Arbeitsgruppe um *Prof. Dr. Ilme Schlichting* (MPI, Heidelberg) durchgeführt und sind hier im Kurzen aufgeführt.

Die Kristalle wurden zunächst in Cryoprotektionslösung gewaschen (25 % PEG, 0.1 M Tris-HCl pH 7.8, 15 % Ethylenglycol) bevor sie in Flüssigstickstoff schockgefroren wurden. Um strukturellen Einblick in die pH-Abhängigkeit der Reparaturaktivität zu bekommen (maximale Reparaturaktivität im Kristall bei pH=7.8), wurden die Kristalle in Cryoprotektionslösung getränkt (anstelle von 0.1 M Tris-HCl

pH 7.8) 0.1 M Na-Citrat pH 4.6, 0.1 M Na-Hepes, pH 7.0, 0.1 M Tris-HCl pH 7.6 oder 0.1 M Tris-HCl pH 9.0. Die DNA Reparatur wurde durch das Tränken der Kristalle für 30 s in Stickstoff-gesättigter Cryoprotektionslösung mit 50 mM Na-Dithionit initiiert, gefolgt von einer 20 sekündigen Rotation der Kristalle in 1 cm Abstand zu einer Leica KL1500 LCD Lichtquelle die, vor der Kühlung in Flüssigstickstoff, mit maximaler Leistung betrieben wurde. Die Datenerfassung erfolgte an der *Beamline X10SA* der *Swiss Light Source*, Villigen, Schweiz. Die Kristalle wurden dabei konstant bei 100 K aufbewahrt, die Datenverarbeitung erfolgte mit der *XDS program suite*.⁽¹⁵⁹⁾

Für die experimentelle Phasenbestimmung wurde das Protein zusätzlich im Methionin auxotrophen *E.coli* Stamm B834 (DE3) in Selenomethionin-haltigem *LeMaster* Medium überexprimiert.⁽¹³⁷⁾ Das mit 12 Selenomethioninen markierte Protein verhielt sich während der Expression, Reinigung und Kristallisation ähnlich wie die wildtyp (6-4) Photolyase. Aufgrund des Minimalmediums, benötigten die Bakterien jedoch für eine optische Dichte (OD_{600}) von 0.4 etwa 6 h. Um die Expression ü.N. stattfinden lassen zu können wurde bereits bei dieser Dichte induziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen wie üblich durch Zentrifugation geerntet, wobei sich zeigte, dass die Zellpellets deutlich kleiner als die der wildtyp Photolyase ausfielen.

6.4.3 Strukturanalyse der (6-4) Photolyase

Die Struktur der (6-4) Photolyase wurde mittels der *single-wavelength anomalous scattering* Methode und Selenomethionin markierten Proteinkristallen erhalten. Die Phasenbestimmung erfolgte dabei mit SHARP.^(160, 161) Nach Bearbeitung der Daten erhielt man eine einfach zu interpretierende Elektronendichte. Ein erstes Proteinmodell (98 % der (6-4) Photolyase Sequenz) wurde automatisch mit ARP/wARP^(162, 163) erstellt und in COOT⁽¹⁶⁴⁾ manuell erweitert. Während mehrerer zyklischer Verfeinerungsrunden mit Refmac und manuellem modellieren, wurden die DNA, das FAD und Lösungsmittelmoleküle mit in das Modell einbezogen.⁽¹⁶⁵⁾ Das finale Modell zeigte gute Stereochemie. Strukturbezogene Sequenzvergleiche

wurden mit SSM,⁽¹⁶⁶⁾ welches in COOT⁽¹⁶⁴⁾ implementiert ist, durchgeführt. Oberflächenkalkulationen wurden mit AREAIMOL⁽¹⁶⁷⁾ berechnet. Protein-DNA Interaktionen wurden mit LIGPLOT⁽¹⁶⁸⁾ analysiert und die Strukturabbildungen in PyMol⁽⁸³⁾ bearbeitet. Die erfassten Daten und die Refinement Statistik sind in Tabelle 9-4 im Anhang dargestellt.

Insgesamt wurden vier Co-Kristallstrukturen des nativen Proteins, mit einem Protein/DNA-Komplex pro asymmetrischer Einheit und der Raumgruppensymmetrie P2₁2₁2₁, erhalten: Zunächst das Enzym im Komplex mit dem T(6-4)T Schaden im aktiven Zentrum bei 2.0 Å Auflösung sowie dem T(6-4)C Schaden bei 2.9 Å; des Weiteren das Enzym im Komplex mit dem T(6-4)T Schaden und dem gebundenen F₀ Cofaktor bei 2.1 Å Auflösung; und letztlich die (6-4) Photolyase im Komplex mit dem T(6-4)T Schaden nach Reduktion mit Na-Dithionit und Belichtung der Kristalle mit Weißlicht (2.7 Å Auflösung). In dieser Struktur konnte das reparierte TpT im aktiven Zentrum nachgewiesen werden. Alle dem T(6-4)T Schaden folgenden Strukturen wurden durch molekularen Ersatz gelöst.

Außerdem konnten Strukturen der Mutanten H365N sowie H369M mit einer Auflösung von je 3.2 Å erhalten werden. Co-Kristallisationsexperimente mit dem T(6-4)T und dem T(6-4)C Dewar-Valenz Isomer lieferten in beiden Fällen erste Datensätze (bis 2.6 Å für T(6-4)C Dewar, bis 2.9 Å für T(6-4)T Dewar). Allerdings waren die Ergebnisse der erhaltenen Elektronendichten nicht eindeutig. Möglicherweise wird das Dewar Isomer während der Messung am Synchrotron durch das energiereiche Licht teilweise wieder in den (6-4) Schaden umgewandelt.

Ähnlich wie die CPD Photolyasen und die Cryptochrome besitzt die (6-4) Photolyase N-terminal eine α/β -Domäne (AS 1-167) sowie eine C-terminale FAD-bindende, helikale Domäne (AS 223-521), die über einen interdomänen *Loop* miteinander verbunden sind (AS 168-224) (Abb. 6-24 A/B).^(2, 65, 67, 78, 105, 106, 119) Überlagert man die Struktur des Enzyms mit seinen Homologen, liegt die Standardabweichung lediglich zwischen 1.8-3.4 Å bei einer Sequenzidentität von weniger als 30 % (Tabelle 9-3, Anhang).

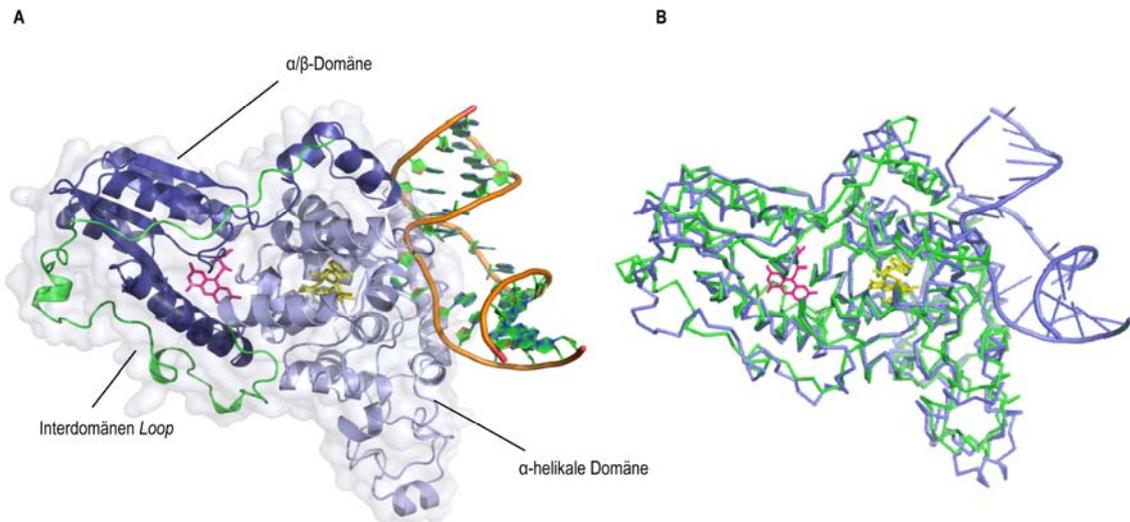


Abbildung 6-24: (A) Struktur der (6-4) Photolyase aus *Drosophila melanogaster* im Komplex mit dem (6-4) Schaden Die N-terminale Domäne ist in dunkelblau und die katalytische α -helikale Domäne ist in hellblau dargestellt. Über das Modell wurde eine semitransparente Proteinoberfläche gelegt. Der FAD und F_0 Cofaktor sind in gelben und pinken Farben abgebildet. Die DNA-Protein Grenzfläche beträgt 1094 \AA^2 . (B) Vergleich der Strukturen von CPD Photolyase aus *Anacystis nidulans*⁽²⁾ (grün) und (6-4) Photolyase aus *Drosophila melanogaster* (blau).

Die Darstellung des Potentials in Abbildung 6-25 der Proteinoberfläche zeigt deutlich eine positiv geladene Furche entlang des Enzyms, in deren Mitte sich eine Öffnung befindet, welche die exakten Maße und Ladung für das Binden des T(6-4)T-Dimers besitzt.

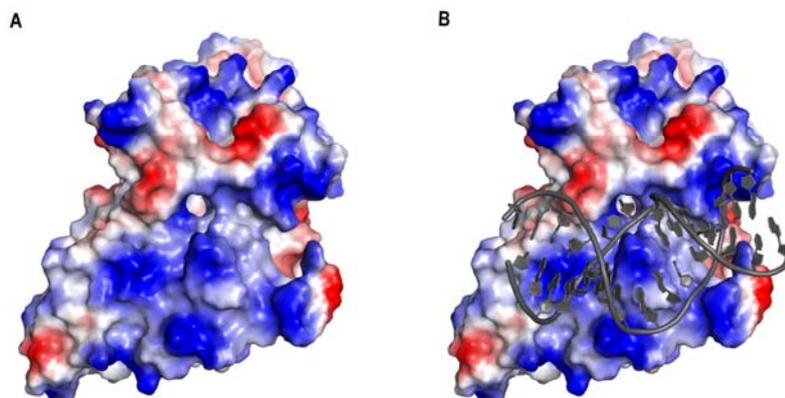


Abbildung 6-25: Oberflächenladung der (6-4) Photolyase (Pymol)⁽⁸³⁾ (A) Protein ohne DNA und (B) mit DNA. Rote und blaue Färbungen zeigen negativ und positiv geladene Bereiche.

Während der Schadenserkenkung öffnet die (6-4) Photolyase die DNA vollständig, das Dimer wird analog der CPD Photolyasen⁽²⁾ dabei um fast 180° aus der DNA in die aktive Tasche des Enzyms gedreht (*dinucleotide-flipping*). Abb. 6-26 zeigt schematisch die zusätzlichen Protein-DNA-Wechselwirkungen, die während der Schadenserkenkung und Reparatur den Komplex vorübergehend stabilisieren. Arg421, ein hoch konservierter Rest in (6-4) Photolyasen, ragt in die Duplex, überlagert die Guanin Base am 3'-Ende und interagiert mit dem Phosphatrückgrat der neunten (3.1 Å) und zehnten (3.1 Å) Base des geschädigten Stranges. Auf ähnliche Weise stehen Lys431 und Ser424 in Kontakt mit dem Phosphatsauerstoff der elften Base des geschädigten Stranges (beide 2.8 Å). Außerdem bilden Lys161 und Arg502 Salzbrücken zum Phosphatrückgrat der Basen 14 und 12 (2.6 Å und 3.0 Å) des ungeschädigten Stranges in 3'-Richtung aus. Der Protein-DNA-Komplex wird zusätzlich durch elf, von Wassermolekülen, vermittelte Protein-Rückgrat-Kontakte stabilisiert.

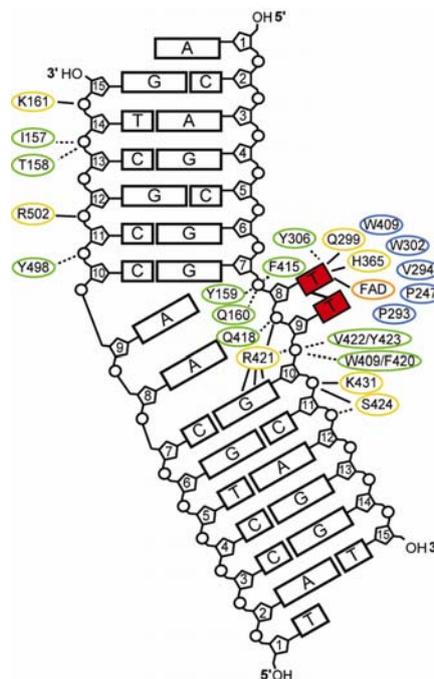


Abbildung 6-26: Schematische Darstellung der Protein-DNA-Kontakte. Der herausgedrehte Schaden ist rot gezeichnet, direkte H-Bindungen/elektrostatische Interaktionen sind gelb umrandet; Wasser-vermittelte Kontakte sind durch grüne sowie gestrichelte Linien dargestellt. Die hydrophobe Bindetasche um die Pyrimidin-Untereinheit ist in blau abgebildet.

6.4.4 Co-Kristallisationsversuche mit F₀

Außer dem FAD-Chromophor in der helikalen Domäne zeigt die Struktur der (6-4) Photolyase eine Kavität in der α/β -Domäne, die große Homologie zu der F₀ Bindungsstelle der bakteriellen Klasse I CPD Photolyasen aufweist. Co-Kristallisationsexperimente mit MTHF, FMN und F₀ zeigten im Fall von F₀ die Komplexierung des Cofaktors. Dieses Ergebnis stimmt mit den spektroskopischen Daten und der Steigerung der Reparatureffizienz aus Kapitel 6.3.4. Die 2.1 Å Diffraktionsdaten ergaben eine offensichtliche Elektronendichte für F₀ sowie die Neuordnung eines an der Proteinoberfläche befindlichen *Loops* (Aminosäuren 47-65). Nach Bindung des Cofaktors befindet sich Ile50 (Abb. 6-27, weiße Struktur) dicht über dem Deazaflavinringsystem, wobei Trp53 die Bindetasche gegenüber dem Lösungsmittel abgrenzt.

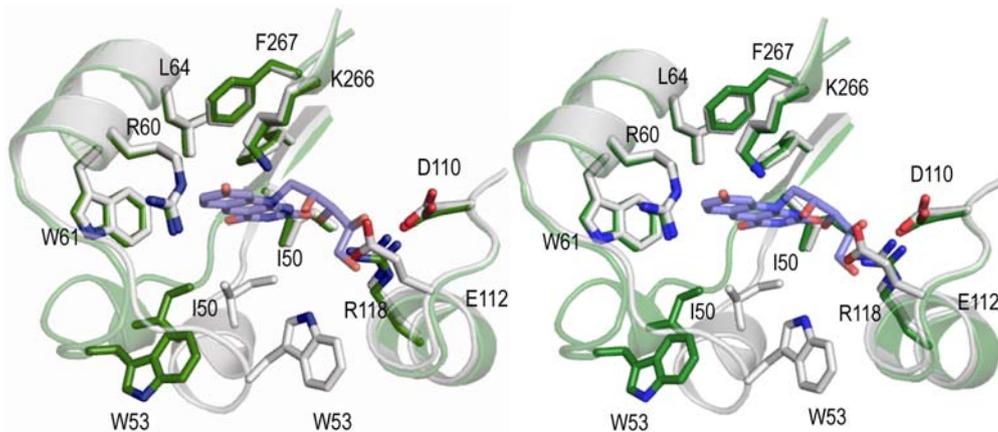


Abbildung 6-27: Stereoabbildung der F₀-Bindetasche vor (grün) und nach (weiß) Bindung des Cofaktors (blau).

Zusammengefasst betrachtet, gleichen Struktur der F₀ Bindungstasche und die Abstände (Abb. 6-28) zwischen den Zentren der heterozyklischen Ringe in F₀ und FAD (17.2 Å) denen der Photolyasen aus *A. nidulans* (18.2 Å, PDB code 1QNF)⁽⁶⁷⁾ bzw. *T. thermophilus* (15.4 Å, PDB code 2J07)⁽¹⁰⁶⁾ und denen des Cryptochroms aus

S. tokodaii (17.3 Å, PDB code 2E0I),⁽⁷⁸⁾ wobei die hydrophoben Reste den unteren Bereich umschließen (Abb. 6-27).

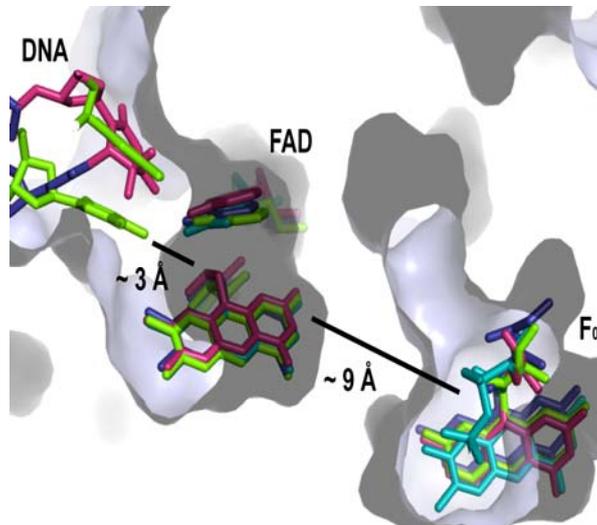


Abbildung 6-28: Schwarz: Mittlere Abstände zwischen dem T(6-4)T bzw. CPD Schaden und den beiden Cofaktoren der *D. melanogaster* (6-4) Photolyase (pink), der *A. nidulans* CPD Photolyase (grün), der *T. thermophilus* CPD Photolyase (blau) und dem *S. tokodaii* Cryptochrom (türkis).

6.4.5 Das aktive Zentrum

Aufgrund der Homologien im aktiven Zentrum von CPD und (6-4) Photolyase, konnten zwei Histidine (His354 und His358) in der *Xenopus laevis* (6-4) Photolyase identifiziert werden, die maßgeblich an der DNA Reparatur beteiligt sind. Die beiden Reste befinden sich in der Nähe des FAD-Cofaktors und liegen in allen bekannten (6-4) Photolyasen hoch-konserviert vor (Abb. 6-1, rote Pfeile). Sie ersetzen die beiden konservierten Aminosäuren Asn345 und Met341 in der *E. coli* CPD Photolyase (Abb. 6-2), deren Struktur bereits bekannt war. Es wurde vermutet, dass die beiden Histidine die Bildung eines Oxetan-Intermediates katalysieren, welches im Anschluss in die beiden intakten Basen zerfällt. Im Gegensatz zu den CPD Photolyasen, weisen die (6-4) Photolyasen eine ausgeprägte pH-Abhängigkeit auf. Wie bereits in Kapitel 6.3.1 dargestellt, ist die Reparaturaktivität der

(6-4) Photolyase aus *D. melanogaster* bei einem pH-Wert von 7.6 am Höchsten, bei pH 6.0 und 8.6 dagegen sinkt die Reparatur auf ca. 60 % ab, dass auf die Abhängigkeit der Enzymaktivität von den Protonierungszuständen der Histidine hindeutet. Die Ergebnisse von ENDOR-spektroskopischen Untersuchungen ergaben, dass das His358 in der *X. leavis* Photolyase (His369 in *D. melanogaster*) deprotoniert vorliegt, während das His354 (His369 in *D. melanogaster*) protoniert ist und als Protonendonator fungiert, welcher vermutlich die Oxetanbildung initiiert.

Die Strukturdaten der (6-4) Photolyase aus *D. melanogaster* zeigen in der Tat eine hohe Strukturhomologie des aktiven Zentrums zu den CPD Photolyasen. Die aktive Tasche, in der das FAD gebunden ist, ist hoch-konserviert zwischen den beiden Photolyasen. Von den 34 Aminosäuren die im Van-der-Waals Radius um das FAD lokalisiert vorliegen, sind 16 identisch zur Struktur der CPD Photolyase. Wie bei den CPD Photolyasen und den Cryptochromen liegt das FAD tief in der helikalen Domäne, in einer ungewöhnlichen U-förmigen Konformation vor, dass den Elektronentransfer auf den Schaden erleichtern soll (Abb. 6-29) ^(2, 65, 67, 78, 105, 106, 119). Der Adeninrest faltet sich zurück zur Ribitylkette und ragt dabei aus dem Flavinringsystem heraus, das durch Wasserstoffbrückenbindungen von N1 und dem NH₂-Rest von Asp406 (3.1 und 3.2 Å) stabilisiert wird. Der Schaden selbst interagiert mit dem Protein durch Watson-Crick Wasserstoffbrückenbindungen über Gln299, dem Pyrimidin N3 (2.8 Å) und O2 (3.2 Å), sowie einer Wasserstoffbrückenbindung des Pyrimidin C5 Hydroxyls und His365 (2.8 Å) (Abb. 6-29 B). Der Schaden ist in einer auffallend hydrophoben Tasche lokalisiert, bestehend aus Trp302, Trp409, Pro247, Pro293 und Val294. In der Tasche befindet sich ein einziges Wassermolekül, welches eine Wasserstoffbrückenbindung zum C5-Hydroxyl (2.9 Å) des Pyrimidinrestes ausbildet (Abb. 6-29 A).

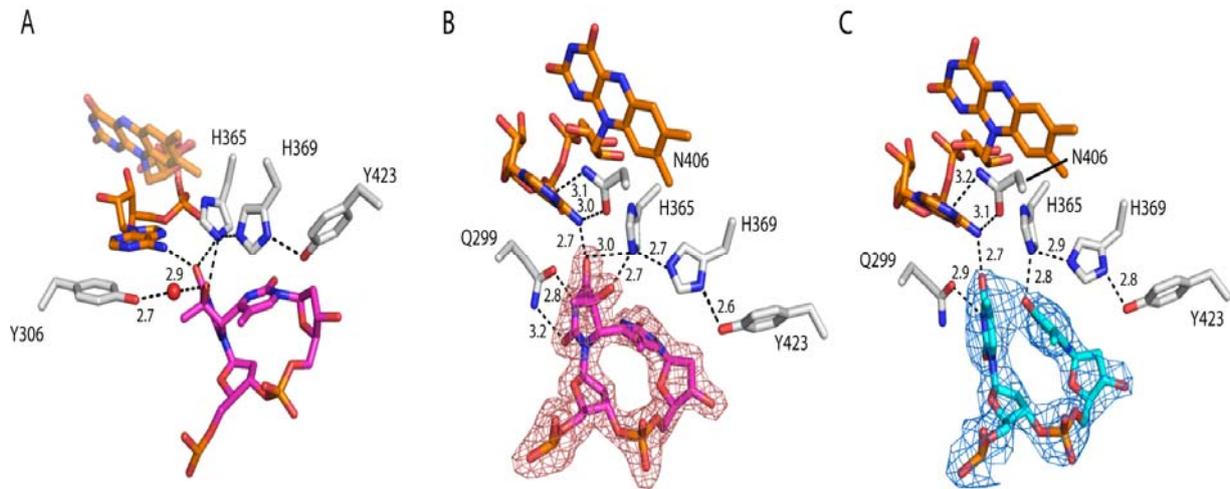


Abbildung 6-29: Struktur der aktiven Tasche der (6-4) Photolyase. (A) Katalytische Reste und Wasserstoffbrückenbindungen zu O5 des Pyrimidins und Tyr306 des Wassermoleküls. (B-C), Fo-DFc-Elektronendichtekarte des Schadens nach *simulated annealing* in CNS. (B) T(6-4)T Schaden vor (in pink) und nach Reparatur. (C) Türkis, kontouriert auf 3 σ . FAD ist in orange dargestellt und ausgewählte Reste des aktiven Zentrums in grau.

Deutlich sind in den Strukturen auch die beiden, katalytisch wichtigen Histidine erkennbar, die zwischen dem katalytischen Cofaktor und dem Schaden liegen. Die Daten zeigen, dass die C5-OH-Gruppe der Pyrimidinuntereinheit des Schadens Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Wasser 276 (2.9 Å) und dem His365 (2.8 Å) eingeht. His365 steht wiederum in Kontakt mit His369 (2.8 Å), welches mit der OH-Gruppe von Tyr423 (2.6 Å) interagiert (Abb. 6-29 A). In der Struktur des reparierten TpT bleibt His365 weiterhin in Kontakt mit dem ursprünglichen C5 Sauerstoffatom, welches sich nach der Übertragung des Sauerstoffatoms an Position C4 der Thymin Base am 3'-Ende befindet (Abb. 6-29 C). Neben dem Transfer des Sauerstoffatoms sind kaum strukturelle Veränderungen im aktiven Zentrum zu beobachten. Besonders interessant ist, dass im reparierten Komplex Glu299 nur eine einzige H-Bindung zum TpT-Dinukleotid ausbildet, was möglicherweise das Zurückdrehen des erfolgreich reparierten Schadens erleichtert. Aus der Stereoansicht der Überlagerung des T(6-4)T Schadens in grau sowie des T(6-4)C Schadens in blau sind die analogen Interaktionen zwischen Protein und Schaden ersichtlich. Beim Vergleich beider Strukturen ist die geringe Auflösung des

T(6-4)C Schadens (2.95 Å), und dadurch eine mögliche Beeinflussung durch das Model zu beachten.

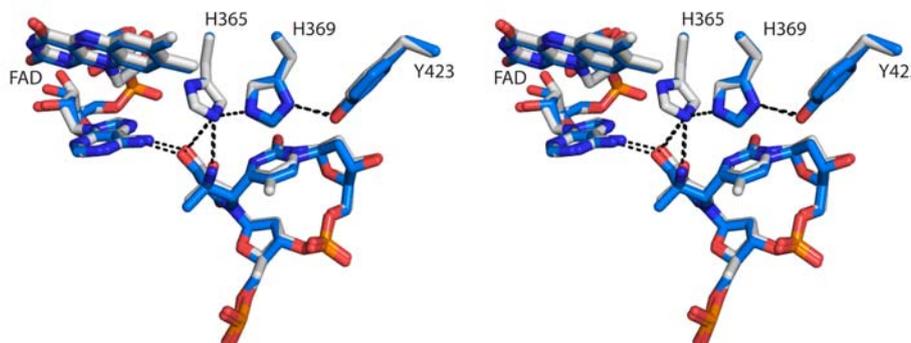


Abbildung 6-30: Stereoabbildung der Überlagerung des T(6-4)T (grau) und des T(6-4)C Schadens (blau) im Komplex mit der (6-4) Photolyase.

Um weiteren Einblick in den Mechanismus zu bekommen und die Beobachtung von *Todo und Weber et al.* zu bestätigen wurden die beiden Histidine, His365 und His369 sowie Tyr423, die in direkter Nachbarschaft zum Schaden liegen und offensichtlich essentiell für die Reparaturaktivität sind, stufenweise mutiert und Aktivitäts- sowie Strukturstudien durchgeführt.

6.4.6 His365, His369 und Tyr423 sind essentiell für die Funktion der (6-4) Photolyase

Beide Histidine der Triade His365-His369-Tyr423 sowie das Tyrosin, welches mit His369 interagiert, wurden sukzessiv mutiert. Die Expression, Reinigung und Kristallisation wurde analog der wildtyp (6-4) Photolyase durchgeführt. In Übereinstimmung mit den Literaturdaten war die Mutante His365 zu Asn365 nicht in der Lage den (6-4) Schaden zu reparieren (Abb. 6-31).⁽⁹⁴⁾ Die 3.2 Å Struktur der H365N Mutante zeigt, dass die Carbamoylgruppe der Asn Seitenkette die gleiche Position einnimmt wie das N ϵ des wildtyp Histidin Restes (Abb. 6-32 A) und somit die

Inaktivierung des Enzyms aufgrund rein struktureller Effekte ausgeschlossen werden kann. Im Gegensatz dazu weist die Mutante H369M eine stark verringerte, aber dennoch detektierbare Restaktivität auf (Abb. 6-31). Die 3.2 Å Struktur der H369M Mutante zeigt, dass die Methionin Seitenkette dieselbe räumliche Anordnung wie das wildtyp Histidin einnimmt und nebenbei das His365 richtig orientiert ist (Abb. 6-32 B). Die Substituenten der Histidine an den Positionen 365 und 369 wurden nicht willkürlich gewählt, sondern entsprechen, wie bereits zuvor erwähnt, den Aminosäureresten im katalytischen Zentrum der CPD Photolyasen (Abb. 6-2).⁽²¹⁾ Interessanterweise zeigt die Doppelmutante H365N/H369M weder im Fall des (6-4) noch im Fall des CPD Schadens Reparaturaktivität. Zudem konnte während des Reinigungsprozesses eine zunehmende Instabilität dieser Mutante verzeichnet werden. Die Proteinausbeute nach dem zweiten Reinigungsschritt, der Heparinsäule, lag deutlich unter den Mengen der beiden anderen Mutanten. Die geringe Konzentration und die Instabilität des Enzyms verhinderten weitere Co-Kristallisationsexperimente.

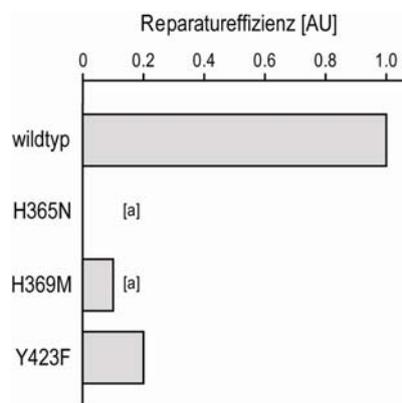


Abbildung 6-31: Reparatureffizienz der wildtyp (6-4) Photolyase im Vergleich zu den Mutanten. [a] Für die beiden Assays würde ein 30-facher Überschuss an Protein verwendet.

Die letzte Mutation der Triade, Tyr423 zu Phe423, führt ebenfalls zur Reduktion der Reparaturaktivität, die jedoch eindeutig geringer ausfällt (Abb. 6-31), als die der H369M Substitution. Deutlich ist der Einfluss der drei Aminosäuren auf die

Reparaturaktivität des Enzyms zu erkennen, die mit sinkendem Abstand zum Schaden ansteigt, was für eine ladungsabhängige, stabilisierende Funktion spricht.

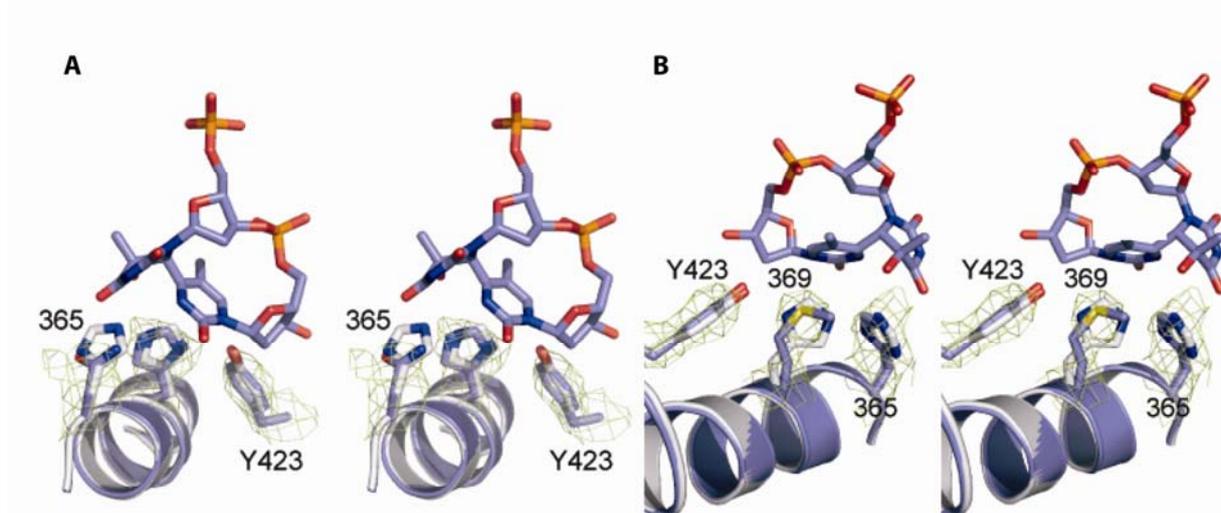


Abbildung 6-32: Stereochemische Abbildungen: Verfeinerte 2mFo-DFc Elektronendichte (Refmac5) für die beiden Mutanten (A) H365N und (B) H369M, kontouriert bei 1σ . Die verfeinerten Strukturen der Mutanten (blau) wurden mit der 2.0 Å Struktur der wildtyp Photolyase überlagert (weiß). Die Positionen His365, His369, Tyr423 sowie des T(6-4)T DNA Schadens sind im Stabmodell dargestellt.

6.5 Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

Um Einblick in die Funktion und Zusammensetzung der bisher wenig charakterisierten (6-4) Photolyasen zu erhalten, sollte die atomare Struktur des Proteins aus *Drosophila melanogaster* gelöst und zusätzliche biochemische Studien durchgeführt werden. Nach ersten Expressions- und Reinigungsversuchen zeigte sich ein proteolytischer Verdau des Proteins am C-terminalen Ende. Da eine inhomogene Proteinlösung ein Problem für die Kristallisationsversuche darstellt, wurde das Protein um 20 AS am C-terminus verkürzt, wobei zuvor anhand eines Sequenzvergleichs der (6-4) Photolyasen eine sehr geringe bis fehlende Sequenzhomologie am C-terminalen Ende des Proteins festgestellt wurde, das auf eine geringe Funktionalität hindeutete. Des Weiteren stellte die hohe Affinität des Enzyms zu unspezifischer, genomischer DNA aus dem Expressionsorganismus ein Problem für die Reinheit der (6-4) Photolyase dar, wodurch es zur Co-Reinigung anderer Proteinen und der DNA kam. Um das Protein in möglichst reiner, homogener Form zu erhalten und DNA Verunreinigungen zu minimieren, wurde der Proteinextrakt vor dem ersten Reinigungsschritt mit DNase I behandelt. Im Anschluss erfolgte eine zweistufige Reinigung über eine *Strep-TagII* Säule und eine Heparin Säule. Das Protein konnte somit mit einer Reinheit von > 95 % in aktiver und monomerer Form erhalten werden.

Zusätzlich konnte mit Hilfe des *BLAST search* (NCBI) eine weitere (6-4) Photolyase aus der Grünalge *Ostreococcus tauri* identifiziert werden, was durch Aktivitätsstudien des überexprimierten und gereinigten Enzyms eindeutig bestätigt wurde.⁽¹⁴⁸⁾ In Anbetracht der phylogenetischen Entwicklung überrascht dieses Ergebniss nicht, da die einzellige Grünalge, als Vorläufer des heutigen Pflanzenreiches und photosynthetisch aktiver Eukaryot, im Allgemeinen hohen Lichtintensitäten ausgesetzt ist.

Mit dem gereinigten Protein aus *D. melanogaster* wurden im Rahmen der biochemischen Charakterisierung Rekonstituierungsversuche durchgeführt, die die Frage nach einem zweiten, möglichen lichtsammelnden Cofaktor klären sollten. Das für die Studie benötigte F₀, welches kommerziell nicht erhältlich ist, wurde dafür

zunächst auf dem Weg der chemischen Synthese dargestellt. Die spektroskopische Analyse zeigte weder im Fall von FAD, FMN noch MTHF eine Änderung des Spektrums. Lediglich die Rekonstituierung der zuvor reduzierten (6-4) Photolyase mit F_0 ergab ein neues Absorptionsmaximum bei 440 nm. Die bathochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums von 420 nm auf 440 nm des Enzymgebundenen Chromophors wurde bereits bei CPD Photolyasen festgestellt.⁽⁶⁴⁾ Bestätigt wurde dieses Ergebnis zusätzlich durch Fluoreszenzmessungen. Dabei lag das Emissionsmaximum bei 475 nm ($\lambda_{EX}=400$ nm). Beide Messungen zeigen, dass ein chinoides Deazaflavin als zweiter Cofaktor in einem Eukaryoten vorliegt.

Die Tatsache, dass das F_0 an die (6-4) Photolyase eines höheren Eukaryoten bindet und auch in aktiver Form vorliegt, ist äußerst überraschend. Bislang konnte dieser Cofaktor nur in Archaea, Methanobakterien und Cyanobakterien, wie in der Photolyase aus *Anacystis nidulans* nachgewiesen werden.⁽¹²²⁾ Allerdings bestätigt diese Beobachtung auch einen früheren Bericht von *Eker et al.*, der das Vorhandensein des F_0 -Cofaktors in der Photolyase der Grünalge, *Scenedesmus acutus*, nachweisen konnte.⁽⁷⁶⁾ Höhere Eukaryoten benötigen scheinbar diesen Cofaktor, sind aber nicht in der Lage ihn selber zu synthetisieren. Ihnen fehlt das, für das FbiC Protein, codierende Gen *fbiC*, welches für die Umsetzung des Pyrimidindion zu F_0 benötigt wird. Möglicherweise kann das Deazaflavin von bakteriellen Quellen bzw. Endosymbionten, oder auch aus der Nahrung bezogen werden. Im Fall von *D. melanogaster* handelt es sich eventuell um *Wolbachia*, ein Bakterium welches im Verdauungstrakt der Fruchtfliegen zu finden ist.^(169, 170)

In wie weit die katalytische Aktivität des Enzyms durch den gebundenen, lichtsammelnden Cofaktor beeinflusst wird, konnte in einem einfachen Photoreaktivierungsassay überprüft werden. Der HPLC basierende Assay ermöglicht es die Aktivität der (6-4) Photolyase schneller und zuverlässiger als bisherige Assays, basierend auf Experimenten von *Todo* und *Iwai*, zu kontrollieren.^(92, 94, 155) Nach Optimierung der Assaybedingungen hinsichtlich der eingesetzten Substrat- bzw. Enzymmenge sowie der Belichtungszeit und des pH-Optimums (pH 7.6) des verwendeten Assaypuffers, konnten für alle folgenden Versuche Standardbedingungen festgelegt werden, bei der eine vollständige Reparatur des

Schadens erfolgte. Die Reparatur war unabhängig von Sequenzlänge und der Verwendung von Einzel- oder Doppelstrang-DNA.

Der zusätzliche lichtsammelnde Cofaktor zeigt im Vergleich zur nicht-rekonstituierten Form des Enzyms eine Steigerung der katalytischen Aktivität um das 5-fache. Dieses Ergebnis beweist, dass das Chromophor nicht nur von der (6-4) Photolyase gebunden wird, sondern auch physiologisch aktiv ist und in der deprotonierten Form vorliegt und dieser die Lichtenergie gebündelt an das FADH^- überträgt. Um zu zeigen, dass es sich bei der F_0 Bindetasche nicht um ein evolutionäres Relikt handelt und der Cofaktor tatsächlich auch in den Fliegen anwesend ist, wurde der Cofaktor aus den Fliegen extrahiert und mittels HPCL analysiert. Das Chromatogramm des Zellextrakts zeigte sowohl im Fall der UV- (422 nm) als auch der Fluoreszenzmessung ($\lambda_{\text{Em}} = 475 \text{ nm}$) die gleichen Absorptionsmaxima und Retentionszeiten wie die des synthetisch hergestellten Deazaflavins. Das Chromophor ist somit auch *in vivo* vorhanden ist und ist deshalb kein Artefakt der Rekonstitution.

Neben den biochemisch relevanten Daten wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals vier Co-Kristallstrukturen der (6-4) Photolyase aus *Drosophila melanogaster* im Komplex mit (6-4) Schaden enthaltender Duplex-DNA erhalten. Als Substrat wurde ein 15mer-Doppelstrang mit einer Base Überhang verwendet, der mittig einen T(6-4)T bzw. T(6-4)C Schaden enthielt. Bei den Co-Kristallstrukturen handelt es sich um das Enzym im Komplex mit dem T(6-4)T (2.0 Å) sowie dem T(6-4)C Schaden (2.9 Å) im aktiven Zentrum, das Enzym im Komplex mit dem T(6-4)T Schaden und dem gebundenen F_0 Cofaktor (2.1 Å) und schließlich die Photolyase mit dem T(6-4)T Schaden nach Reparatur durch Reduktion mit Na-Dithionit und Weißlicht (2.7 Å). Im Rahmen der Mutationsstudien des potentiellen aktiven Zentrums, konnten ebenfalls die Strukturen zweier Mutanten, H365N und H369M, erhalten werden (beide 3.2 Å). Darüber hinaus lieferten Co-Kristallisationsexperimente mit dem T(6-4)T und dem T(6-4)C Dewar-Valenz Isomer in beiden Fällen erste Datensätze (bis 2.6 Å für T(6-4)C Dewar, bis 2.9 Å für T(6-4)T Dewar). Aus den Elektronendichten konnten jedoch keine eindeutigen Aussagen getroffen werden, da

möglicherweise das Dewar Isomer während der Messung am Synchrotron durch das energiereiche Licht teilweise wieder in den (6-4) Schaden umgewandelt wird. Weitere Messungen der Kristalle unter gleichzeitiger Aufnahme eines Absorptionsspektrums könnten Einblick in den vorliegenden Schaden geben.

Ähnlich wie die bereits bekannten Strukturen aus der Familie der Photolyasen und Cryptochrome, gliedert sich auch hier die Struktur in eine N-terminale α/β -Domäne sowie eine C-terminale FAD-bindende, helikale Domäne, die über einen interdomänen *Loop* miteinander verbunden sind. Zudem öffnet die (6-4) Photolyase wie die CPD Photolyase⁽²⁾ während der Schadenserkennung die DNA vollständig und das Dimer wird um fast 180° in die aktive Tasche des Enzyms gedreht (*Dinucleotide-Flipping*). Co-Kristallisationsstudien mit verschiedenen Chromophoren stützten die vorangegangenen Rekonstituierungsexperimente, und zeigten lediglich das F₀ als zweiten Cofaktor in der Struktur. Zudem verursacht die Bindung des Chromophors die Neuordnung eines sich an der Oberfläche befindlichen *Loops* (Aminosäuren 47-65).

Während in der Literatur noch bis vor kurzem davon ausgegangen wurde, dass der Reparaturprozess des (6-4) Schadens über ein Oxetan- bzw. Azetidinintermediat stattfindet, konnten in dieser Arbeit keine Hinweise gefunden werden, die diese Annahme weiterhin stützen. Die Tatsache, dass die Kristalle ihre enzymatische Aktivität beibehielten und in der Lage waren, durch Belichtung das (6-4) Photoprodukt wieder in die intakten Basen zu überführen, bekräftigt diese Vermutung.

Für die Klärung des Reparaturmechanismus ist die Wechselwirkung der C5-OH Gruppe mit dem Protein maßgeblich. Diese OH-Gruppe am C5 der Pyrimidin-Untereinheit des Schadens muss zum C4 der Pyrimidon-Untereinheit transferiert werden. Der direkte Transfer der C5-OH-Gruppe während der Reparatur wurde mit ¹⁸O-markiertem Wasser in Reparatorexperimenten bestätigt; dabei konnte die vollständige Beibehaltung von ¹⁶O in der reparierten DNA nachgewiesen werden. Zusätzlich wird die Hypothese des direkten Atom-Transfers durch die Beobachtung

gestützt, dass auch der T(6-4)C Schaden effizient repariert wird, da hier die NH₂-Gruppe des Pyrimidin-Rings ohne die Anwesenheit ammoniakalischer Lösung zur Pyrimidon Substruktur übertragen werden muss.

Wie bereits aus den Struktur- bzw. Mutationsstudien und den ENDOR-spektroskopischen Messungen von *Weber et al.*⁽⁴⁶⁾ hervorgeht, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Triade His365-His369-Tyr423 verantwortlich für die Protonierung der C5-OH Gruppe ist, wobei His365 als Protonendonator fungiert d.h. das Proton wird direkt auf die C5-OH Gruppe übertragen, wobei diese in eine gute Abgangsgruppe umgewandelt (Abb. 6-33 I) wird. Die protonierte 5'-OH Gruppe zusammen mit der Pyrimidon-Untereinheit in einer stark hydrophoben Umgebung macht es dem 5'-OH unmöglich, das Acylimin direkt anzugreifen und das Oxetan zu bilden (II). Hingegen greift vermutlich das abgehende Wassermolekül das Acylimin an (III, IV) um ein Intermediat zu bilden (V), welches, nach dem Transfer des Elektrons zurück zum FAD und dem Verlust des Protons, sehr schnell in die aktiven Basen fragmentiert (V).

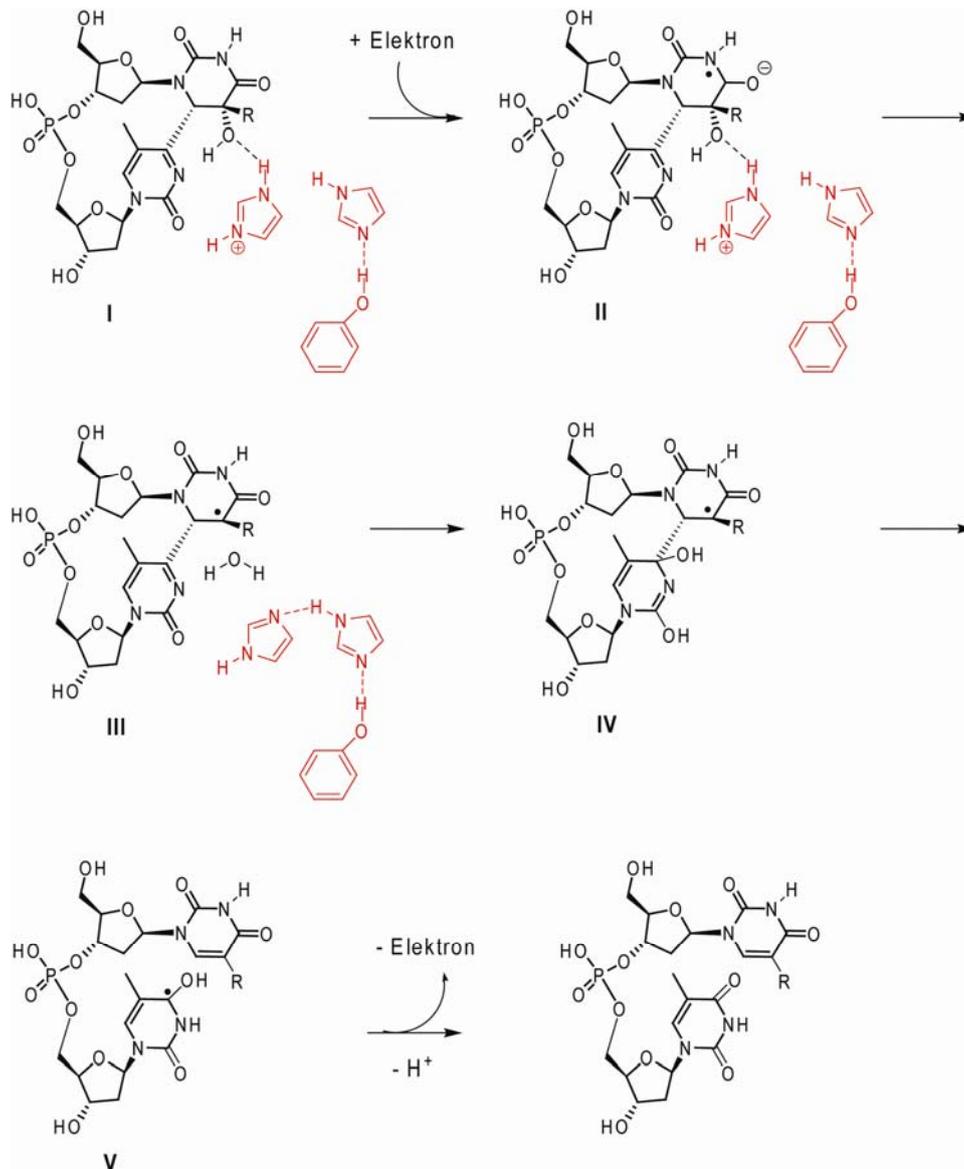


Abbildung 6-33: Möglicher Reparaturmechanismus, basierend auf den Ergebnissen der Kristallisation und der Mutationsstudien.

Um die neue These der Bildung eines radikalischen Pyrimidin C5 Intermediates zu stützen und weiteren Einblick in den Mechanismus der Reparatur des (6-4) Photoprodukts zu bekommen, wurde die Reparatur von T(6-4)T mit U(6-4)T Schaden enthaltender DNA verglichen. Im Gegensatz zum T(6-4)T Schaden der an Position 5 des Pyrimidins eine Methylgruppe besitzt, welche in der Lage ist das Radikal zu stabilisieren, fehlt dem U(6-4)T-Schaden diese Gruppe. Dadurch wird die stabilisierende Funktion des radikalischen Intermediates reduziert, was in einer

deutlich verlangsamten Reparaturaktivität resultiert. Die Reparaturassays wurden unter den Standardbedingungen durchgeführt und zeigten, wie in Abbildung 6-34 dargestellt, tatsächlich eine starke Reduktion der Aktivität. Dies spricht zusätzlich für die Bildung des radikalischen Intermediates. Bei einem normalerweise vollständigen Umsatz des Substrates T(6-4)T (dunkelgrün) wird weniger als ein Viertel des U(6-4)T Schadens (grau) repariert. Allerdings bleibt die Reparaturrate konstant niedrig und kommt unter diesen Bedingungen nicht zum Erliegen.

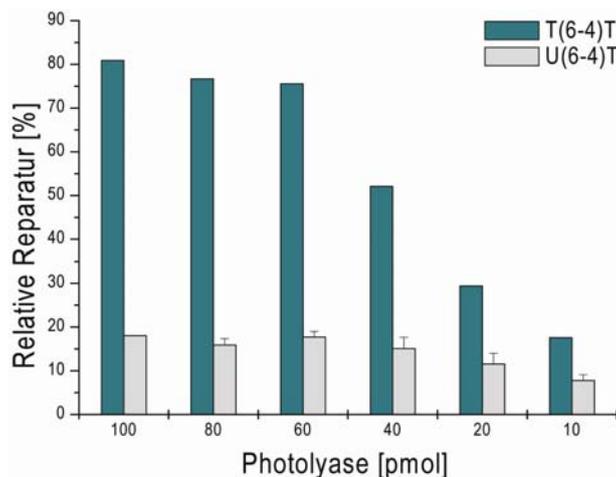


Abbildung 6-34: Relative Reparatur des T(6-4)T-Schadens (dunkelgrün) und des U(6-4)T Schadens (grau).

Trotz all der neuen biochemischen und strukturellen Ergebnisse kann auch der hier aufgestellte Reparaturmechanismus nicht eindeutig belegt werden. Zur Lösung dieser Frage werden weitere Aktivitäts- und Co-Kristallisationsstudien mit Substratanalogen nötig sein, welche den Reparaturprozess in den entscheidenden Schritten festhalten und somit darstellen können.

Des Weiteren wäre es von großem Interesse, andere, eukaryotische (6-4) Photolyasen auf ihren zweiten Cofaktor hin zu untersuchen, um damit das außergewöhnliche Auftreten der Deazaflavine in Eukaryoten zu bestätigen, wodurch möglicherweise auch die Quelle des Cofaktors festgestellt werden könnte.

7 Abkürzungsverzeichnis

8-HDF	8-Hydroxydesazaflavin
A	Adenin
Å	Angström
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
AcOH	Essigsäure
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
C	Cytosin
CPD	Cyclobutanpyrimidindimer
Cry	Cryptochrom
CV	<i>column volumes</i>
d	Tage
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
ds	doppel
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

7 Abkürzungsverzeichnis

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Em	Emission
eq.	Äquivalente
ESI	Elektronenspray-Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
Ex.	Anregung, (<i>excitation</i>)
F ₀	8-Hydroxydeazaflavin (8-HDF)
FAD/FADH ⁻	Flavinadenindunukleotid oxidiert/reduziert
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
G	Guanin
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde(n)
His	Histidin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-ethansulfonsäure
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HV	Hochvakuum (10 ⁻³ -10 ⁻² mbar)
hν	Photoreaktion
I	Intensität
IgG	Immunglobulin G

7 Abkürzungsverzeichnis

IPTG	Isopropylthiogalactosid
<i>J</i>	Kopplungskonstante
K_s	Bindungskonstante
kb	Kilobase(n)
L	Liter
LB	<i>Luria Bertani</i>
LC	<i>liquid chromatography</i>
LPS	Lipopolysaccharide
Lsg.	Lösung
M	Masse
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MHZ	Megahertz
min	Minute(n)
mL	Milliliter
μL	Mikroliter
MS	Massenspektrum
MTHF	5,10-Methenyltetrahydrofolat
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid reduziert
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NEt_3	Triethylamin

7 Abkürzungsverzeichnis

ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
ori	<i>origin of replication</i>
ox	oxidiert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pg	<i>prep grade</i>
ppm	<i>parts per million</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNS	<i>reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RP	<i>reversed phase</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T	Temperatur
TB	<i>terrific broth</i>

7 Abkürzungsverzeichnis

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TEAA	Triethylamoniumacetat
TLS	<i>trans lesion sythesis</i>
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
u	<i>units</i>
U	Uracil
ü.N.	über Nacht
ÜNK	über Nacht Kultur
UV	ultraviolett
V	Volt
Vis	<i>visible</i>
W	Watt
δ	NMR: chemische Verschiebung
λ	Wellenlänge

8 Literaturverzeichnis

- (1) Todo, T., Tsuji, H., Ootoshi, E., Hitomi, K., Kim, S. T., and Ikenaga, M., *Mutat. Res.* **1997**. Characterization of a human homolog of (6-4) photolyase. *384*, 195-204.
- (2) Mees, A., Klar, T., Gnau, P., Hennecke, U., Eker, A. P., Carell, T., and Essen, L. O., *Science* **2004**. Crystal structure of a photolyase bound to a CPD-like DNA lesion after in situ repair. *306*, 1789-93.
- (3) Watson, J. D., and Crick, F. H., *Nature* **1953**. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *171*, 737-8.
- (4) Watson, J. D., and Crick, F. H., *Jama* **1993**. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. 1953. *269*, 1967-9.
- (5) Crick, F., *Nature* **1974**. The double helix: a personal view. *248*, 766-9.
- (6) Lindahl, T., Nyberg, B., *Biochemistry* **1972**. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *11*, 3610-3618.
- (7) Lindahl, T., Nyberg, B., *Biochemistry* **1974**. Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid. *13*, 3405-3410.
- (8) Cadet, J., Bellon, S., Berger, M., Bourdat, A.-G., Douki, T., Duarte, V., Frelon, S., Gasparutto, D., Muller, E., Ravanat, J.-L., and Sauvaigo, S., *Biol. Chem.* **2002**. Recent aspects of oxidative DNA damage: guanosine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *383*, 933-943.
- (9) Xue, W., and Warshawsky, D., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage. A review. *206*.
- (10) Friedel, M. G., Cichon, M. K., and Carell, T., *CRC Press, Boca Raton* **2004**. CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology (2nd Edition). 141/141-141/122.
- (11) Pierce, A. J., Stark, J. M., Araujo, F. D., Moynahan, M. E., Berwick, M., and Jasin, M. C., *Trends Cell Biol.* **2001**. Double-strand breaks and tumorigenesis. *11*.
- (12) Yang, W., *Cell Res.* **2008**. Structure and mechanism for DNA lesion recognition. *18*, 184-97.
- (13) Friedberg, E. C., *Nature* **2003**. DNA damage and repair. *421*, 436-440.
- (14) Li, G.-M., *Cell Res.* **2008**. Mechanism and functions of DNA mismatch repair. *18*, 85-98.
- (15) Shuck, S. C., Short, E. A., and Turchi, J. J., *Cell Res.* **2008**. Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *18*, 64-72.
- (16) Friedberg, E. C., Walker, G. C., Siede, W., Wood, R. D., Schultz, R. A., and Ellenberger, T., *Washington, DC: ASM Press* **2005**. DNA Repair and Mutagenesis.
- (17) Friedberg, E. C., *Cell Res.* **2008**. A brief history of the DNA repair field. *18*, 3-7.

- (18) Kelner, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1949**. Effect of visible light on the recovery of *Streptomyces griseus* conidia from ultraviolet irradiation injury. *35*, 73-79.
- (19) Carbonare, M. D., and Pathak, M. A., *J. Photochem. Photobiol.* **1992**. Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging. *14*, 105-124.
- (20) Rahn, R. O., and Hosszu, J. L., *Photochem. Photobiol.* **1969**. Photochemical studies of thymine in ice. *10*, 131-7.
- (21) Sancar, A., *Chem. Rev.* **2003**. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *103*, 2203-37.
- (22) Sancar, G. B., and Sancar, A., *Meth. Enzymol.* **2006**. Purification and characterization of DNA photolyases. *408*, 121-56.
- (23) Khattak, M. N., and Wang, S. Y., *Tetrahedron* **1972**. The photochemical mechanism of pyrimidine cyclobutyl dimerization. *14*, 954-957.
- (24) Wacker, A., Dellwe, H., Trauager, L., Kornhauser, A., Lodemann, E., Türck, G., Selzer, R., Chandra, P., and Ishimoto, M., *Photochem. Photobiol.* **1964**. Organic photochemistry and nucleic acids. *3*, 369-394.
- (25) Park, H. W., Zhang, A. H., Ren, Y., Nadji S., Sinha, N., Taylor, J. S., and Kang, C. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**. Crystal structure of a DNA decamer containing a *cis-syn* thymine dimer. *103*.
- (26) Mitchell, D. L., and Nairn, R. S., *Photochem. Photobiol.* **1989**. The biology of the (6-4) photoproduct. *49*, 805-19.
- (27) Varghese, A. J., and Wang, S. Y., *Science* **1967**. Ultraviolet irradiation of DNA in vitro and in vivo produces a 3d thymine-derived product. *156*, 955-7.
- (28) Varghese, A. J., and Wang, S. Y., *Science* **1968**. Thymine-thymine adduct as a photoproduct of thymine. *160*, 186-7.
- (29) Wang, S. Y., Patrick, M. H., Varghese, A. J., and Rupert, C. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1967**. Concerning the Mechanism of Formation of UV-Induced Thymine Photoproducts in DNA. *57*, 465-472.
- (30) Fujiwara, Y., and Iwai, S., *Biochemistry* **1997**. Thermodynamic studies of the hybridization properties of photolesions in DNA. *36*, 1544-50.
- (31) Kim, J. K., and Choi, B. S., *Eur. J. Biochem.* **1995**. The solution structure of DNA duplex-decamer containing the (6-4) photoproduct of thymidylyl(3'->5')thymidine by NMR and relaxation matrix refinement. *228*.
- (32) Lee, H. J., Hwang, G. S., and Choi, B. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**. Solution structure of a DNA decamer duplex containing stable 3'-TG base pair of the pyrimidine(6-4)pyrimidone photoproduct [(6-4) adduct]: Implications for the highly specific 3'T->C transition of the (6-4) adduct. *96*, 6632-6636.
- (33) Johns, H. E., Pearson, M. L., Leblanc, J. C., and Helleiner, C. W., *J. Mol. Biol.* **1964**. The Ultraviolet Photochemistry of Thymidylyl-(3'-5')-Thymidine. *9*, 503-24.
- (34) Taylor, J. S., Garrett, D. S., and Cohrs, M. P., *Biochemistry* **1988**. Solution-state structure of the Dewar pyrimidinone photoproduct of thymidylyl-(3'----5')-thymidine. *27*, 7206-15.
- (35) Cadet, J., Sage, E., and Douki, T., *Mutat. Res.* **2005**. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *571*, 3-17.
- (36) Hwang, G. S., Kim, J. K., and Choi, B. S., *Eur. J. Biochem.* **1996**. NMR structural studies of DNA decamer duplex containing the dewar photoproduct

- of thymidyl(3'→5') thymidine. Conformational changes of the oligonucleotide duplex by photoconversion of a (6-4) adduct to its Dewar valence isomer. *235*, 359-365.
- (37) Burger, A., Fix, D., Liu, H., Hays, J., and Bockrath, R., *Mutat. Res.* **2003**. In vivo deamination of cytosine-containing cyclobutane pyrimidine dimers in *E. coli*: A feasible part of UV-mutagenesis. *522*, 145-156.
- (38) Gibbs, P. E. M., Borden, A., and Lawrence, C. W., *Nucleic Acids Res.* **1995**. The T-T pyrimidine (6-4) pyrimidone UV photoproduct is much less mutagenic in yeast than in *Escherichia coli*. *23*, 1919-1922.
- (39) LeClerc, E. J., Borden, A., and Lawrence, C. W., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**. The thymine-thymine pyrimidine-pyrimidone(6-4) ultraviolet light photoproduct is highly mutagenic and specifically induces 3' thymine-to-cytosine transitions in *Escherichia coli*. *88*.
- (40) Gruijl, F. R., van Kranen, H. J., and Mullenders, L. H., *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **2001**. UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *63*, 19-27.
- (41) Hussein, M. R., *J. Cutan. Pathol.* **2005**. Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *32*, 191-205.
- (42) Sarasin, A., *Mutat. Res.* **1999**. The molecular pathways of ultraviolet-induced carcinogenesis. *428*, 5-10.
- (43) Garinis, G. A., Jans, J., and van der Horst, G. T., *Future Oncol* **2006**. Photolyases: capturing the light to battle skin cancer. *2*, 191-9.
- (44) Lo, H. L., Nakajima, S., Ma, L., Walter, B., Yasui, A., Ethell, D. W., and Owen, L. B., *BMC Cancer* **2005**. Differential biologic effects of CPD and 6-4PP UV-induced DNA damage on the induction of apoptosis and cell-cycle arrest. *5*, 135.
- (45) Sancar, A., *J. Biol. Chem.* **2008**. Structure and function of photolyase and in vivo enzymology: 50th anniversary. *283*, 32153-7.
- (46) Weber, S., *Biochim. Biophys. Acta* **2005**. Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase. *1707*, 1-23.
- (47) Kanai, S., Kikuno, R., Toh, H., Ryo, H., and Todo, T., *J. Mol. Evol.* **1997**. Molecular evolution of the photolyase-blue-light photoreceptor family. *45*, 535-48.
- (48) Sancar, A., Smith, F. W., and Sancar, G. B., *J. Biol. Chem.* **1984**. Purification of *Escherichia coli* DNA photolyase. *259*, 6028-32.
- (49) Sancar, G. B., *Nucleic Acids Res.* **1985**. Sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* PHR1 gene and homology of the PHR1 photolyase to *E. coli* photolyase. *13*, 8231-46.
- (50) Sancar, G. B., Smith, F. W., Lorence, M. C., Rupert, C. S., and Sancar, A., *J. Biol. Chem.* **1984**. Sequences of the *Escherichia coli* photolyase gene and protein. *259*, 6033-8.
- (51) Öztürk, N., Kao, Y. T., Selby, C. P., Kavakli, I. H., Partch, C. L., Zhong, D., and Sancar, A., *Biochemistry* **2008**. Purification and characterization of a type III photolyase from *Caulobacter crescentus*. *47*, 10255-61.
- (52) Todo, T., Takemori, H., Ryo, H., Ihara, M., Matsunaga, T., Nikaido, O., Sato, K., and Nomura, T., *Nature* **1993**. A new photoreactivating enzyme that specifically repairs ultraviolet light-induced (6-4) photoproducts. *361*, 371-4.

-
- (53) Brudler, R., Hitomi, K., Daiyasu, H., Toh, H., Kucho, K., Ishiura, M., Kanehisa, M., Roberts, V. A., Todo, T., Tainer, J. A., and Getzoff, E. D., *Mol. Cell* **2003**. Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution. *11*, 59-67.
- (54) Selby, C. P., and Sancar, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**. A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *103*, 17696-700.
- (55) Cashmore, A. R., *Cell* **2003**. Cryptochromes: enabling plants and animals to determine circadian time. *114*, 537-43.
- (56) Hsu, D. S., Zhao, X., Zhao, S., Kazantsev, A., Wang, R. P., Todo, T., Wei, Y. F., and Sancar, A., *Biochemistry* **1996**. Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins. *35*, 13871-7.
- (57) Öztürk, N., Song S.-H., Özgür, S., Selby, C. P., Morrison, L., Partch, C., Zhong, D., and Sancar, A., *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **2007**. Structure and function of animal cyrptochromes. *72*, 119-131.
- (58) Dulbecco, R., *Nature* **1949**. Reactivation of ultra-violet-inactivated bacteriophage by visible light. *163*, 949.
- (59) Lucas-Lledo, J. I., and Lynch, M., *Mol. Biol. Evol.* **2009**. Evolution of mutation rates: phylogenomic analysis of the photolyase/cryptochrome family.
- (60) Lynch, M., *Sinauer Associates, Inc. Publishers.* **2007**. The origins of genome architecture.
- (61) Lynch, M., *Genetics* **2008**. The cellular, developmental and population-genetic determinants of mutation-rate evolution. *180*, 933-43.
- (62) Kim, S. T., Li, Y. F., and Sancar, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**. The third chromophore of DNA photolyase: Trp-277 of *Escherichia coli* DNA photolyase repairs thymine dimers by direct electron transfer. *89*, 900-4.
- (63) Ramsey, A. J., Alderfer, J. L., and Jorns, M. S., *Biochemistry* **1992**. Energy transduction during catalysis by *Escherichia coli* DNA photolyase. *31*, 7134-42.
- (64) Malhotra, K., Kim, S. T., Walsh, C., and Sancar, A., *J. Biol. Chem.* **1992**. Roles of FAD and 8-hydroxy-5-deazaflavin chromophores in photoreactivation by *Anacystis nidulans* DNA photolyase. *267*, 15406-11.
- (65) Park, H. W., Kim, S. T., Sancar, A., and Deisenhofer, J., *Science* **1995**. Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*. *268*, 1866-72.
- (66) Park, H. W., Sancar, A., and Deisenhofer, J., *J. Mol. Biol.* **1993**. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of *Escherichia coli* DNA photolyase. *231*, 1122-5.
- (67) Tamada, T., Kitadokoro, K., Higuchi, Y., Inaka, K., Yasui, A., de Ruiter, P. E., Eker, A. P., and Miki, K., *Nat. Struct. Biol.* **1997**. Crystal structure of DNA photolyase from *Anacystis nidulans*. *4*, 887-91.
- (68) Kato, T., Jr., Todo, T., Ayaki, H., Ishizaki, K., Morita, T., Mitra, S., and Ikenaga, M., *Nucleic Acids Res.* **1994**. Cloning of a marsupial DNA photolyase gene and the lack of related nucleotide sequences in placental mammals. *22*, 4119-24.
- (69) Yasui, A., Eker, A. P., Yasuhira, S., Yajima, H., Kobayashi, T., Takao, M., and Oikawa, A., *EMBO J.* **1994**. A new class of DNA photolyases present in various organisms including aplacental mammals. *13*, 6143-51.

-
- (70) Sancar, A., *Biochemistry* **1994**. Structure and function of DNA photolyase. 33, 2-9.
- (71) Jorns, M. S., Sancar, G. B., and Sancar, A., *Biochemistry* **1984**. Identification of a neutral flavin radical and characterization of a second chromophore in *Escherichia coli* DNA photolyase. 23, 2673-9.
- (72) Payne, G., Heelis, P. F., Rohrs, B. R., and Sancar, A., *Biochemistry* **1987**. The active form of *Escherichia coli* DNA photolyase contains a fully reduced flavin and not a flavin radical, both in vivo and in vitro. 26, 7121-7.
- (73) Aubert, C., Mathis, P., Eker, A. P., and Brettel, K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**. Intraprotein electron transfer between tyrosine and tryptophan in DNA photolyase from *Anacystis nidulans*. 96, 5423-7.
- (74) Aubert, C., Vos, M. H., Mathis, P., Eker, A. P., and Brettel, K., *Nature* **2000**. Intraprotein radical transfer during photoactivation of DNA photolyase. 405, 586-90.
- (75) Cichon, M. K., Arnold, S., and Carell, T., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**. A (6-4) photolyase model: Repair of DNA (6-4) lesions requires a reduced and deprotonated Flavin. 114, 793-796.
- (76) Eker, A., *Biochemistry* **1988**. Photoreactivating Enzyme from the Green Alga *Scenedesmus acutus*. Evidence for the Presence of Two Different Flavin Chromophores. 27, 1758-1765.
- (77) Johnson, J. L., Hamm-Alvarez, S., Payne, G., Sancar, G. B., Rajagopalan, K. V., and Sancar, A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**. Identification of the second chromophore of *Escherichia coli* and yeast DNA photolyases as 5,10-methenyltetrahydrofolate. 85, 2046-50.
- (78) Fujihashi, M., Numoto, N., Kobayashi, Y., Mizushima, A., Tsujimura, M., Nakamura, A., Kawarabayashi, Y., and Miki, K., *J. Mol. Biol.* **2007**. Crystal structure of archaeal photolyase from *Sulfolobus tokodaii* with two FAD molecules: implication of a novel light-harvesting cofactor. 365, 903-10.
- (79) Ueda, T., Kato, A., Kuramitsu, S., Terasawa, H., and Shimada, I., *J. Biol. Chem.* **2005**. Identification and characterization of a second chromophore of DNA photolyase from *Thermus thermophilus* HB27. 280, 36237-43.
- (80) Payne, G., and Sancar, A., *Biochemistry* **1990**. Absolute action spectrum of E-FADH₂ and E-FADH₂-MTHF forms of *Escherichia coli* DNA photolyase. 29, 7715-27.
- (81) Kim, S. T., Heelis, P. F., and Sancar, A., *Biochemistry* **1992**. Energy transfer (deazaflavin-->FADH₂) and electron transfer (FADH₂-->T<>T) kinetics in *Anacystis nidulans* photolyase. 31, 11244-8.
- (82) Baker, N. A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M. J., and McCammon, J. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. 98, 10037-41.
- (83) DeLano, W. L. (2002), DeLano Scientific, San Carlos, CA.
- (84) Husain, I., and Sancar, A., *Nucleic Acids Res.* **1987**. Binding of *E. coli* DNA photolyase to a defined substrate containing a single T mean value of T dimer. 15, 1109-20.
- (85) Sancar, G. B., Smith, F. W., and Sancar, A., *Biochemistry* **1985**. Binding of *Escherichia coli* DNA photolyase to UV-irradiated DNA. 24, 1849-55.

-
- (86) Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Unsal-Kacmaz, K., and Linn, S., *Annu. Rev. Biochem.* **2004**. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *73*, 39-85.
- (87) Sancar, A., and Rupp, W. D., *Cell* **1983**. A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region. *33*, 249-60.
- (88) Kim, S. T., Malhotra, K., Smith, C. A., Taylor, J. S., and Sancar, A., *J. Biol. Chem.* **1994**. Characterization of (6-4) photoproduct DNA photolyase. *269*, 8535-40.
- (89) Nakajima, S., Sugiyama, M., Iwai, S., Hitomi, K., Otoshi, E., Kim, S. T., Jiang, C. Z., Todo, T., Britt, A. B., and Yamamoto, K., *Nucleic Acids Res.* **1998**. Cloning and characterization of a gene (UVR3) required for photorepair of 6-4 photoproducts in *Arabidopsis thaliana*. *26*, 638-44.
- (90) Todo, T., Ryo, H., Yamamoto, K., Toh, H., Inui, T., Ayaki, H., Nomura, T., and Ikenaga, M., *Science* **1996**. Similarity among the *Drosophila* (6-4) photolyase, a human photolyase homolog, and the DNA photolyase-blue-light photoreceptor family. *272*, 109-12.
- (91) Zhao, X., Liu, J., Hsu, D. S., Zhao, S., Taylor, J. S., and Sancar, A., *J. Biol. Chem.* **1997**. Reaction mechanism of (6-4) photolyase. *272*, 32580-90.
- (92) Hitomi, K., Kim, S. T., Iwai, S., Harima, N., Otoshi, E., Ikenaga, M., and Todo, T., *J. Biol. Chem.* **1997**. Binding and catalytic properties of *Xenopus* (6-4) photolyase. *272*, 32591-8.
- (93) Mizukoshi, T., Hitomi, K., Todo, T., and S., I., *J. Am. Chem. Soc.* **1998**. Studies on the Chemical Synthesis of Oligonucleotides Containing the (6-4) Photoproduct of Thymine-Cytosine and its Repair by (6-4) Photolyase. *120*, 10634-10642.
- (94) Hitomi, K., Nakamura, H., Kim, S. T., Mizukoshi, T., Ishikawa, T., Iwai, S., and Todo, T., *J. Biol. Chem.* **2001**. Role of two histidines in the (6-4) photolyase reaction. *276*, 10103-9.
- (95) Asgatay, S., Petermann, C., Harakat, D., Guillaume, D., Taylor, J. S., and Clivio, P., *J. Am. Chem. Soc.* **2008**. Evidence that the (6-4) photolyase mechanism can proceed through an oxetane intermediate. *130*, 12618-9.
- (96) Walsh, C., *Acc. Chem. Res.* **1986**. Naturally Occuring 5-Deazaflavin Coenzymes: Biological Redox Roles. *19*, 216-221.
- (97) Ahmad, M., and Cashmore, A. R., *Nature* **1993**. HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *366*, 162-6.
- (98) King, D. P., and Takahashi, J. S., *Annu. Rev. Neurosci.* **2000**. Molecular genetics of circadian rhythms in mammals. *23*, 713-42.
- (99) Liedvogel, M., Maeda, K., Henbest, K., Schleicher, E., Simon, T., Timmel, C. R., Hore, P. J., and Mouritsen, H., *PLoS ONE* **2007**. Chemical magnetoreception: bird cryptochrome 1a is excited by blue light and forms long-lived radical-pairs. *2*, e1106.
- (100) Lin, C., *Trends Plant Sci.* **2000**. Plant blue-light receptors. *5*, 337-42.
- (101) Maeda, K., Henbest, K. B., Cintolesi, F., Kuprov, I., Rodgers, C. T., Liddell, P. A., Gust, D., Timmel, C. R., and Hore, P. J., *Nature* **2008**. Chemical compass model of avian magnetoreception. *453*, 387-90.

-
- (102) Yang, H. Q., Wu, Y. J., Tang, R. H., Liu, D., Liu, Y., and Cashmore, A. R., *Cell* **2000**. The C termini of Arabidopsis cryptochromes mediate a constitutive light response. *103*, 815-27.
- (103) Pokorny, R., Klar, T., Hennecke, U., Carell, T., Batschauer, A., and Essen, L. O., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**. Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. *105*, 21023-7.
- (104) Brautigam, C. A., Smith, B. S., Ma, Z., Palnitkar, M., Tomchick, D. R., Machius, M., and Deisenhofer, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**. Structure of the photolyase-like domain of cryptochrome 1 from *Arabidopsis thaliana*. *101*, 12142-7.
- (105) Huang, Y., Baxter, R., Smith, B. S., Partch, C. L., Colbert, C. L., and Deisenhofer, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**. Crystal structure of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana* and its implications for photolyase activity. *103*, 17701-6.
- (106) Klar, T., Pokorny, R., Moldt, J., Batschauer, A., and Essen, L. O., *J. Mol. Biol.* **2007**. Cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*: structural and functional analysis of its complex with a folate light antenna. *366*, 954-64.
- (107) Kleine, T., Lockhart, P., and Batschauer, A., *Plant J.* **2003**. An Arabidopsis protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. *35*, 93-103.
- (108) Ozgur, S., and Sancar, A., *Biochemistry* **2003**. Purification and properties of human blue-light photoreceptor cryptochrome 2. *42*, 2926-32.
- (109) Song, S. H., Dick, B., Penzkofer, A., Pokorny, R., Batschauer, A., and Essen, L. O., *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **2006**. Absorption and fluorescence spectroscopic characterization of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana*. *85*, 1-16.
- (110) Müller, M., and Glas, A. F., *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**. Structural Biology of DNA Photolyases and Cryptochromes.
- (111) Lin, C., and Todo, T., *Genome Biol.* **2005**. The cryptochromes. *6*, 220.
- (112) Bouly, J. P., Giovani, B., Djamei, A., Mueller, M., Zeugner, A., Dudkin, E. A., Batschauer, A., and Ahmad, M., *Eur. J. Biochem.* **2003**. Novel ATP-binding and autophosphorylation activity associated with *Arabidopsis* and human cryptochrome-1. *270*, 2921-8.
- (113) Partch, C. L., Clarkson, M. W., Ozgur, S., Lee, A. L., and Sancar, A., *Biochemistry* **2005**. Role of structural plasticity in signal transduction by the cryptochrome blue-light photoreceptor. *44*, 3795-805.
- (114) Fischer, M., and Bacher, A., *Nat Prod Rep* **2005**. Biosynthesis of flavocoenzymes. *22*, 324-50.
- (115) O'Brien, D. E., Weinstock, L.T., Cheng, C.-C., *J. Heterocycl. Chem.* **1970**. Synthesis of 10-Deazariboflavin and Related 2,4-Dioxypyrimido (4,5-B) Quinolines. *7*, 99-105.
- (116) Eirich, L. D., Vogels, G. D., and Wolfe, R. S., *Biochemistry* **1978**. Proposed structure for coenzyme F420 from Methanobacterium. *17*, 4583-93.
- (117) Walsh, C., *Acc. Chem. Res.* **1980**. Flavin Coenzymes: At the Crossroads of Biological Redox Chemistry. *13*, 148-155.
- (118) Lessner, D. J., Li, L., Li, Q., Rejtar, T., Andreev, V. P., Reichlen, M., Hill, K., Moran, J. J., Karger, B. L., and Ferry, J. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*

- 2006.** An unconventional pathway for reduction of CO₂ to methane in CO-grown *Methanosarcina acetivorans* revealed by proteomics. *103*, 17921-6.
- (119) Kort, R., Komori, H., Adachi, S., Miki, K., and Eker, A., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004.** DNA apophotolyase from *Anacystis nidulans*: 1.8 Å structure, 8-HDF reconstitution and X-ray-induced FAD reduction. *60*, 1205-13.
- (120) Graham, D. E., Xu, H., and White, R. H., *Arch. Microbiol.* **2003.** Identification of the 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin synthase required for coenzyme F(420) biosynthesis. *180*, 455-64.
- (121) Forouhar, F., Abashidze, M., Xu, H., Grochowski, L. L., Seetharaman, J., Hussain, M., Kuzin, A., Chen, Y., Zhou, W., Xiao, R., Acton, T. B., Montelione, G. T., Galinier, A., White, R. H., and Tong, L., *J. Biol. Chem.* **2008.** Molecular insights into the biosynthesis of the f420 coenzyme. *283*, 11832-40.
- (122) Eker, A. P., Kooiman, P., Hessels, J. K., and Yasui, A., *J. Biol. Chem.* **1990.** DNA photoreactivating enzyme from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *265*, 8009-15.
- (123) DiMarco, A. A., Bobik, T. A., and Wolfe, R. S., *Annu. Rev. Biochem.* **1990.** Unusual coenzymes of methanogenesis. *59*, 355-94.
- (124) Reuke, B., Korn, S., Eisenreich, W., and Bacher, A., *J. Bacteriol.* **1992.** Biosynthetic precursors of deazaflavins. *174*, 4042-9.
- (125) Jaenchen, R., Schonheit, P., and Thauer, R. K., *Arch. Microbiol.* **1984.** Studies on the biosynthesis of coenzyme F420 in methanogenic bacteria. *137*, 362-5.
- (126) Choi, K. P., Bair, T. B., Bae, Y. M., and Daniels, L., *J Bacteriol* **2001.** Use of transposon Tn5367 mutagenesis and a nitroimidazopyran-based selection system to demonstrate a requirement for fbiA and fbiB in coenzyme F(420) biosynthesis by *Mycobacterium bovis* BCG. *183*, 7058-66.
- (127) Choi, K. P., Kendrick, N., and Daniels, L., *J Bacteriol* **2002.** Demonstration that fbiC is required by *Mycobacterium bovis* BCG for coenzyme F(420) and F₀ biosynthesis. *184*, 2420-8.
- (128) Graupner, M., Xu, H., and White, R. H., *J. Bacteriol.* **2002.** The pyrimidine nucleotide reductase step in riboflavin and F(420) biosynthesis in archaea proceeds by the eukaryotic route to riboflavin. *184*, 1952-7.
- (129) Li, H., Xu, H., Graham, D. E., and White, R. H., *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003.** Glutathione synthetase homologs encode alpha-L-glutamate ligases for methanogenic coenzyme F420 and tetrahydrosarcinapterin biosyntheses. *100*, 9785-90.
- (130) Ghisla, S., and Mayhew, S. G., *J. Biol. Chem.* **1973.** Identification and structure of a novel flavin prosthetic group associated with reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase from *Peptostreptococcus elsdenii*. *248*, 6568-70.
- (131) Goldberg, M., Pecht, I., Kramer, H.E.A., Traber, R., Hemmerich, P., *Biochim. Biophys.* **1981.** Structure and Properties of 5-Deazaflavin Radicals as Compared to Natural Flavosemiquinones. *673*, 570-593.
- (132) Rokita, S. E., Walsh, C.T., *J. Am. Chem. Soc.* **1984.** Flavin and 5-Deazaflavin Photosensitized Cleavage of Thymine Dimer: A Model of an in Vivo Light-Requiring DNA Repair. *106*, 4589-4595.

- (133) Yamaguchi, H., Koshiro, A., Harima, Y., Mori, K., Yoneda F., *Spectrochimica Acta* **1981**. Magnetic Circular Dichroism and Fluorescence Spectra of 5-Deazaflavins. *37A*, 51-55.
- (134) Carell, T., Burgdorf, L. T., Kundu, L. M., and Cichon, M., *Curr Opin Chem Biol* **2001**. The mechanism of action of DNA photolyases. *5*, 491-8.
- (135) Todo, T., Ryo, H., Borden, A., Lawrence, C., Sakaguchi, K., Hirata, H., and Nomura, T., *Mutat. Res.* **1997**. Non-mutagenic repair of (6-4)photoproducts by (6-4)photolyase purified from *Drosophila melanogaster*. *385*, 83-93.
- (136) Rupert, C. S., Goodgal, S. H., and Herriott, R. M., *J. Gen. Physiol.* **1958**. Photoreactivation in vitro of ultraviolet-inactivated *Hemophilus influenzae* transforming factor. *41*, 451-71.
- (137) LeMaster, D. M., and Richards, F. M., *Biochemistry* **1985**. ¹H-¹⁵N heteronuclear NMR studies of Escherichia coli thioredoxin in samples isotopically labeled by residue type. *24*, 7263-8.
- (138) Chen, J. J., Mitchell, D. L., and Britt, A. B., *Plant Cell* **1994**. A Light-Dependent Pathway for the Elimination of UV-Induced Pyrimidine (6-4) Pyrimidinone Photoproducts in *Arabidopsis*. *6*, 1311-1317.
- (139) Jiang, C. Z., Yee, J., Mitchell, D. L., and Britt, A. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**. Photorepair mutants of *Arabidopsis*. *94*, 7441-5.
- (140) Kim, S. T., Malhotra, K., Taylor, J. S., and Sancar, A., *Photochem. Photobiol.* **1996**. Purification and partial characterization of (6-4) photoproduct DNA photolyase from *Xenopus laevis*. *63*, 292-5.
- (141) Yuan, Q., Metterville, D., Briscoe, A. D., and Reppert, S. M., *Mol. Biol. Evol.* **2007**. Insect cryptochromes: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. *24*, 948-55.
- (142) Kobayashi, Y., Ishikawa, T., Hirayama, J., Daiyasu, H., Kanai, S., Toh, H., Fukuda, I., Tsujimura, T., Terada, N., Kamei, Y., Yuba, S., Iwai, S., and Todo, T., *Genes Cells* **2000**. Molecular analysis of zebrafish photolyase/cryptochrome family: two types of cryptochromes present in zebrafish. *5*, 725-38.
- (143) Essen, L. O., and Klar, T., *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**. Light-driven DNA repair by photolyases. *63*, 1266-77.
- (144) McCreedy, S., and Marcello, L., *Biochem. Soc. Trans.* **2003**. Repair of UV damage in *Halobacterium salinarum*. *31*, 694-8.
- (145) Palenik, B., Grimwood, J., Aerts, A., Rouze, P., Salamov, A., Putnam, N., Dupont, C., Jorgensen, R., Derelle, E., Rombauts, S., Zhou, K., Otilar, R., Merchant, S. S., Podell, S., Gaasterland, T., Napoli, C., Gendler, K., Manuell, A., Tai, V., Vallon, O., Piganeau, G., Jancek, S., Heijde, M., Jabbari, K., Bowler, C., Lohr, M., Robbens, S., Werner, G., Dubchak, I., Pazour, G. J., Ren, Q., Paulsen, I., Delwiche, C., Schmutz, J., Rokhsar, D., Van de Peer, Y., Moreau, H., and Grigoriev, I. V., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**. The tiny eukaryote *Ostreococcus* provides genomic insights into the paradox of plankton speciation. *104*, 7705-10.
- (146) Derelle, E., Ferraz, C., Rombauts, S., Rouze, P., Worden, A. Z., Robbens, S., Partensky, F., Degroeve, S., Echeynie, S., Cooke, R., Saeys, Y., Wuyts, J., Jabbari, K., Bowler, C., Panaud, O., Piegu, B., Ball, S. G., Ral, J. P., Bouget, F. Y., Piganeau, G., De Baets, B., Picard, A., Delseny, M., Demaille, J., Van de Peer, Y., and Moreau, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**. Genome

- analysis of the smallest free-living eukaryote *Ostreococcus tauri* unveils many unique features. *103*, 11647-52.
- (147) Courties, C., Perasso, R., Chrétiennot-Dinet, M.-J., Gouy, M., Guillou, L., and Troussellier, M., *J. Phycol.* **1998**. Phylogenetic analysis and genome size of *Ostreococcus tauri*. *34*, 844-849.
- (148) Kaya, E., *LMU München (München)* **2007**.
- (149) Jorns, M. S., Wang, B. Y., Jordan, S. P., and Chanderkar, L. P., *Biochemistry* **1990**. Chromophore function and interaction in *Escherichia coli* DNA photolyase: reconstitution of the apoenzyme with pterin and/or flavin derivatives. *29*, 552-61.
- (150) Kuhn, R., Weygand, F., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1935**. 1282-1288.
- (151) Maley, G. F., Plaut, G. W. E., *J. Biol. Chem.* **1959**. The Isolation, Synthesis and Methabolic Properties of 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazine. *234*, 641.
- (152) Kimachi, T., Tanaka, K., Yoneda, F., *J. Heter. Chem.* **1991**. Synthesis of a Proposed Isomer of F420 Having a α -Glutamyl Bonding. *28*, 439-443.
- (153) Hamm-Alvarez, S., Sancar, A., and Rajagopalan, K. V., *J. Biol. Chem.* **1989**. Role of enzyme-bound 5,10-methenyltetrahydropteroylpolyglutamate in catalysis by *Escherichia coli* DNA photolyase. *264*, 9649-56.
- (154) Smith, C. A., and Taylor, J. S., *J. Biol. Chem.* **1993**. Preparation and characterization of a set of deoxyoligonucleotide 49-mers containing site-specific cis-syn, trans-syn-I, (6-4), and Dewar photoproducts of thymidylyl(3'-->5')-thymidine. *268*, 11143-51.
- (155) Iwai, S., Shimizu, M., Kamiya, H., and Ohtsuka, E., *J. Am. Chem. Soc.* **1996**. Synthesis of a Phosphoramidite Coupling Unit of the Pyrimidine (6-4) Pyrimidone Photoproduct and Its Incorporation into Oligodeoxynucleotides. *118*, 7642-7643.
- (156) Satou, K., Komatsu, Y., Torizawa, T., Kato, K., Shimada, I., Nikaido, O., and E., O., *Tetrahedron Lett.* **2000**. Efficient chemical synthesis of a pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduct analog and its properties. *41*, 2175-2179.
- (157) Sage, E., *Photochem. Photobiol.* **1993**. Distribution and repair of photolesions in DNA: genetic consequences and the role of sequence context. *57*, 163-74.
- (158) Steglich, W., and Zechlin, L., *J. Biosci.* **1977**. 3-Methylriboflavin from *Panellus serotinus* (*Agaricales*). *32C*, 520-522.
- (159) Kabsch, W., *J. Appl. Crystallogr.* **1993**. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *26*, 795-800.
- (160) de La Fortelle, E., and Bricogne, G., *Meth. Enzymol.* **1997**. Maximum-Likelihood Heavy-Atom Parameter Refinement for the Multiple Isomorphous Replacement and Multiwavelength Anomalous Diffraction Methods. *276*, 472-494.
- (161) Vonrhein, C., Blanc, E., Roversi, P., and Bricogne, G., *Methods Mol. Biol.* **2007**. Automated structure solution with autoSHARP. *364*, 215-30.
- (162) Perrakis, A., Harkiolaki, M., Wilson, K. S., and Lamzin, V. S., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2001**. ARP/wARP and molecular replacement. *57*, 1445-50.
- (163) Perrakis, A., Morris, R., and Lamzin, V. S., *Nat. Struct. Biol.* **1999**. Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *6*, 458-63.

- (164) Emsley, P., and Cowtan, K., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**. Coot: model-building tools for molecular graphics. *60*, 2126-32.
- (165) Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1997**. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *53*, 240-55.
- (166) Krissinel, E., and Henrick, K., *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**. Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *60*, 2256-68.
- (167) CCP4, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **1994**. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *50*, 760-3.
- (168) Wallace, A. C., Laskowski, R. A., and Thornton, J. M., *Protein Eng.* **1995**. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *8*, 127-34.
- (169) Holden, P. R., Jones, P., and Brookfield, J. F., *Genet. Res.* **1993**. Evidence for a *Wolbachia* symbiont in *Drosophila melanogaster*. *62*, 23-9.
- (170) Mateos, M., Castrezana, S. J., Nankivell, B. J., Estes, A. M., Markow, T. A., and Moran, N. A., *Genetics* **2006**. Heritable endosymbionts of *Drosophila*. *174*, 363-76.

9 Anhang

Tabelle 9-1: Tabelle zur Bestimmung der PCR Primer-Annealingtemperatur anhand der empirisch ermittelten Schmelzpunkte in °C.

GC	bp																	
	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1	28.7	31.2	33.5	35.5	37.2	38.9	40.3	41.6	42.8	43.9	44.9	45.9	46.7	47.6	48.3	49.0	49.7	50.3
2	31.4	33.8	35.9	37.7	39.4	40.9	42.3	43.5	44.6	45.6	46.6	47.5	48.3	49.0	49.7	50.4	51.0	51.6
3	34.2	36.4	38.3	40.0	41.6	43.0	44.2	45.3	46.4	47.3	48.2	49.0	49.8	50.5	51.1	51.7	52.3	52.8
4	36.9	38.9	40.7	42.3	43.7	45.0	46.2	47.2	48.2	49.1	49.9	50.6	51.3	51.9	52.5	53.1	53.6	54.1
5	39.6	41.5	43.1	44.6	45.9	47.1	48.1	49.1	50.0	50.8	51.5	52.2	52.8	53.4	54.0	54.5	54.9	55.4
6	42.4	44.1	45.5	46.9	48.0	49.1	50.1	50.9	51.7	52.5	53.1	53.8	54.3	54.9	55.4	55.8	56.3	56.7
7	45.1	46.6	47.9	49.1	50.2	51.2	52.0	52.8	53.5	54.2	54.8	55.3	55.9	56.3	56.8	57.2	57.6	58.0
8	47.8	49.2	50.4	51.4	52.4	53.2	54.0	54.7	55.3	55.9	56.4	56.9	57.4	57.8	58.2	58.6	58.9	59.2
9	50.6	51.7	52.8	53.7	54.5	55.3	55.9	56.5	57.1	57.6	58.1	58.5	58.9	59.3	59.6	59.9	60.2	60.5
10	53.3	54.3	55.2	56.0	56.7	57.3	57.9	58.4	58.9	59.3	59.7	60.1	60.4	60.7	61.0	61.3	61.6	61.8
11	56.0	56.9	57.6	58.2	58.8	59.4	59.8	60.3	60.6	61.0	61.3	61.6	61.9	62.2	62.4	62.7	62.9	63.1
12	58.8	59.4	60.0	60.5	61.0	61.4	61.8	62.1	62.4	62.7	63.0	63.2	63.4	63.7	63.9	64.0	64.2	64.4
13	61.5	62.0	62.4	62.8	63.1	63.5	63.7	64.0	64.2	64.4	64.6	64.8	65.0	65.1	65.3	65.4	65.5	65.6
14	64.2	64.6	64.8	65.1	65.3	65.5	65.7	65.8	66.0	66.1	66.3	66.4	66.5	66.6	66.7	66.8	66.8	66.9
15	67.0	67.1	67.2	67.4	67.5	67.6	67.6	67.7	67.8	67.8	67.9	68.0	68.0	68.1	68.1	68.1	68.2	68.2
16	69.7	69.7	69.7	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.6	69.5	69.5	69.5	69.5	69.5	69.5	69.5	69.5
17	72.4	72.2	72.1	71.9	71.8	71.7	71.5	71.4	71.3	71.3	71.2	71.1	71.0	71.0	70.9	70.9	70.8	70.8
18	75.2	74.8	74.5	74.2	73.9	73.7	73.5	73.3	73.1	73.0	72.8	72.7	72.6	74.4	72.3	72.2	72.1	72.1

Tabelle 9-2: Verwendete DNA Stränge (Andreas Glas).

Name	Sequenz (5' → 3')	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺ (exakte Masse)
ODN 1	AAT(6-4)TAA	1800.20	1799.21
ODN 2	GGT(6-4)TGG	1864.20	1863.14
ODN 3	AGGT(6-4)TGCC	2466.57	2465.60
ODN 4	CAGGT(6-4)TGGCA	3068.94	3069.10
ODN 5	ACAGGT(6-4)TGCCAG	3711.34	3710.27
ODN 6	ACAGCGGT(6-4)TGCAGGT	4633.89	4632.94
ODN 7	GGACAGCGGT(6-4)TGCAGGTG	5621.48	5620.58
ODN 8	GGT(6-4)CGG	1849.19	1848.23
ODN 9	AGGT(6-4)CGGC	2451.56	2450.51
ODN 10	ACAGCGGT(6-4)CGCAGGT	4618.88	4617.98

9 Anhang

Tabelle 9-3: Vergleich der(6-4) Photolyase Struktur mit homologen Strukturen verschiedener Photolyasen und Cryptochrome (*BLAST search*, NCBI). Angegeben sind u.a. die Standardabweichung der Strukturen und die Anzahl der verglichenen Aminosäuren (COOT).

PDB code	Organismus	Funktion	r.m.s.d (Å)	Sequenz ID (%)	Anzahl der Reste im Alignment / Gesamtzahl der Reste	Cofaktoren
1QNF	<i>Anacystis nidulans</i>	CPD Photolyase	2.1	29.5	430 / 475	FAD/F ₀
1U3C	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cryptochrom	1.7	26.1	414 / 485	FAD/-
2IJG	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CPD Photolyase	1.98	25.4	394 / 492	FAD/MTHF
1DNP	<i>Escherichia coli</i>	CPD Photolyase	1.97	28.8	416 / 470	FAD/MTHF
2E10	<i>Sulfolobus tokadaii</i>	CPD Photolyase	1.9	29.1	399 / 428	FAD/FAD
1NP7	<i>Synechocystis</i>	Cryptochrom	3.4	28.7	421 / 483	FAD/MTHF
2J07	<i>Thermus thermophilis</i>	CPD Photolyase	1.8	27.0	381 / 419	FAD/F ₀

9 Anhang

Tabelle 9-4: Experimentelle Daten, Prozessierungs- und Verfeinerungsstatistik der Co-Kristallstrukturen.

Structure, pdb code	SeMet 64PL SAD dataset	Native 64PL / Photolesion, 3CVU	Native 64PL / Photolesion and F ₀ , 3CVV	Native H365N 64PL / Photolesion, 3CVW	Native H369M 64PL / Photolesion, 3CVX	Native 64PL / Repaired Photolesion, 3CVY
Data collection						
X-ray source	SLS X10SA	SLS X10SA	SLS X10SA	SLS X10SA	SLS X10SA	SLS X10SA
Wavelength	0.97886	0.978589	0.97925	0.97895	0.97895	0.97925
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell param.[Å]	a=86.9, b=88.6, c=89.3	a=87.0, b=89.4, c=91.3	a=84.6, b=88.3, c=91.1	a=86.5, b=89.5, c=89.3	a=87.4, b=89.0, c=90.2	a=83.4, b=86.6, c=88.8
Resolution (highest shell)	20-2.5 (2.6-2.5)	20-2.0 (2.1-2.0)	40-2.1 (2.15-2.1)	20-3.2 (3.3-3.2)	20-3.2 (3.3-3.2)	40-2.7 (2.8-2.7)
No. unique reflections	45797 (5024)	47357 (6065)	39271 (4836)	10625 (526)	11606 (933)	17459 (1642)
Completeness (highest shell)	99.4% (98.4%)	97.2% (92.9%)	97.0% (93.0%)	89.2% (52.2%)	96.0% (90.8%)	95.8% (90.2%)
Rmerge (highest shell)	0.124 (0.344)	0.046 (0.297)	0.082 (0.362)	0.089 (0.308)	0.086 (0.327)	0.087 (0.338)
I/σ(I) (highest shell)	23.2 (11.0)	20.8 (5.7)	15.2 (5.0)	17.8 (3.1)	15.1 (4.8)	13.0 (4.8)
Redundancy	17.6	4.8	5.2	5.7	4.0	4.4
Wilson B-factor [Å ²]	31.8	30.7	27.4	65.5	75.2	58.7
Phasing statistics	FOM (after SHARP, 12 sites) 0.44 Phasing power (anomalous) 1.92	Not applicable				
Refinement						
Resolution in refinement [Å]		20-2.0	40-2.1	20-3.2	20-3.2	40-2.7
Rwork/Rfree		0.184/0.212	0.166/0.213	0.272/0.329	0.230/0.282	0.212/0.266
Number of atoms		5093	5435	4817	4791	4781
Protein		4110	4259	4117	4116	4110
FAD/DNA/F ₀		53/608/-	53/609/26	53/609/26	53/609/-	53/608/-

9 Anhang

Water	320	468/16	12	13	9
mol./((HOCH ₂) ₂)					

Average B-factors [Å ²]					
Protein	33.2	34.4	Overall refined B-factor 49.9	Overall refined B- factor 44.6	42.3
FAD/DNA/F ₀	33.3/42.6	27.3/46.2/28.2			38.3/67.1
Water	37.4	44.6/52.9			29.4
mol./((HOCH ₂) ₂)					

R.m.s deviations from target values					
Bond lengths [Å]	0.009	0.009	0.005	0.006	0.007
Bond angles [°]	1.257	1.393	0.881	0.956	1.112

Nr. residues in regions of Ramachandran plot (percentage)	Not applicable				
Most favoured	392 (89.7%)	411 (90.7%)	388 (88.6%)	385 (87.9%)	394 (90.2%)
Allowed	43 (9.8%)	39 (8.6%)	48 (11.0%)	50 (11.4%)	41 (9.4%)
Generously allowed	1 (0.2%)	2 (0.7%)	1 (0.2%)	2 (0.5%)	1 (0.2%)
Disallowed*	1 (0.2%)	1 (0.2%)	1 (0.2%)	1 (0.2%)	1 (0.2%)
Overall G-factors from Procheck	0.14	0.12	0.24	0.20	0.15

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 06.02.1981

Geburtsort: Würzburg

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

09/87 – 07/89 Grundschule Aura/Saale

09/87 - 07/91 Grundschule Hammelburg

09/91 – 07/00 Frobenius-Gymnasium Hammelburg

Abitur (Note 1.8)

Studium

09/00 – 02/01 Studium der Chemie an der Johann-Wolfgang von Goethe Universität,
Frankfurt/Main

03/01 – 03/05 Studium der Biopharmazeutischen Technologie an der
Fachhochschule Gießen-Friedberg

03/04 – 08/04 Praxissemester bei Roche Diagnostics GmbH, Penzberg

09/04 – 03/05 Diplomarbeit bei Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
(Thema: »Expression and Purification of mouse xxx«)
(Note 1.3)

03/05 Hochschulabschluss: Dipl.-Ing. für Biopharmazeutische Technologie
(Gesamtnote 1.7)

Promotion

Seit 04/05 Promotionsstudium in der Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. T. Carell* an der
Ludwig-Maximilians-Universität in München

München, 05.05.2009